

## RESUMEN

La investigación corresponde a la detección de glucomacropéptido por electroforesis, como indicador de adulteración de leche con suero de quesería. El objetivo fue determinar la mencionada adulteración, mediante la detección del glucomacropéptido, proteína que solo se encuentra en el suero. Se realizó en la empresa TESTFARM, ubicado en Santo Domingo. Mediante un diseño experimental, se aisló el glucomacropéptido por precipitación secuencial con ácido tricloroacético; por electroforesis en gel de poliacrilamidodecil y sulfato de sodio, al separar proteínas nativas y desnaturalizadas. Como materiales se usaron muestras de leche fresca, adulteradas intencionalmente con suero en proporción de 0%, 5%, 10%, 20% y 40%, y el electrofotometómetro.

Los resultados obtenidos demostraron que la detección de glucomacropéptido por electroforesis fueron positivas en leches con 5%, 10%, 20% y 40% de adulteración, es decir la técnica planteada determina la adulteración. El glucomacropéptido se evidenció como una banda de 20.9 kDa en la lectura.

Se concluyó que el método utilizado determinó una adulteración y es un parámetro específico y sensible en esta determinación, lo que no sucede con la evaluación de los parámetros físico-químicos de la leche. Solamente el pH y las características organolépticas tienden a disminuirse a medida que se incrementa el porcentaje de suero.

Se recomienda realizar un mayor número de estudios en el Ecuador para determinar la dimensión real de la adulteración de la leche, igualmente para validar la metodología y mediante la misma aplicar a la industria de productos lácteos. También se debería comparar el método empleado con otros como ELISA y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

## ABSTRACT

The research is for the detection of glycomacropeptide by electrophoresis, as an indicator of adulteration of milk with whey. The objective was to determine said alteration, by detecting the glycomacropeptide, protein found only in the serum. It was held in the company TESTFARM, in Santo Domingo. Using experimental design, glycomacropeptide was isolated by sequential precipitation with trichloroacetic acid, gel electrophoresis and poliacrilamidododecil sodium sulfate, separating native and denatured proteins. Materials were used as samples of fresh milk, intentionally adulterated with whey in a ratio of 0%, 5%, 10%, 20% and 40%, and the electrofotometómetro.

The results shown that glycomacropeptide detection of electrophoretically milks were positive with 5%, 10%, 20% and 40% adulteration, it means that the raised technique determines adulteration. The glycomacropeptide was evident as a band of 20.9 kDa in reading.

It was concluded that the method used determined adulteration and is a specific and sensitive parameter in this determination, which does not happen with the evaluation of physical and chemical parameters of milk. Only pH and organoleptic characteristics tend to decrease as the percentage increases of whey.

It is recommended to carry out larger number of studies in Ecuador to determine the true extent of the adulteration of milk. Also it validates the methodology and the application to the dairy industry. A comparison between the method with other like ELISA and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is recommended to be performed.

## **I. INTRODUCCIÓN**

La leche y sus derivados constituyen excelentes fuentes nutritivas para la alimentación humana y su uso es fundamental en la dieta de las personas. Es un alimento completo, que brinda a sus consumidores principalmente grandes aportes de proteína y vitaminas, esenciales para la buena nutrición de las personas. La leche se describe como el alimento más perfecto de la naturaleza. Para el ser humano recién nacido, la leche es la única fuente de nutrientes en los primeros meses de su vida y en muchos países constituye el principal aporte alimenticio en la dieta del desarrollo de los niños.

Debido a la importancia nutricional que la leche tiene, es necesario que la misma sea de alta calidad y que no sufra de adulteración en ninguno de los procesos hasta que llega a la mesa de los consumidores.

En el último Censo Agropecuario, efectuado en el 2000, se reflejó que la ganadería en el país se maneja de forma extensiva, lo que significa que la gran mayoría de UPAs están muy poco tecnificadas y que por ende el riesgo de adulteración de la leche producida en dichas condiciones, puede ser una gran posibilidad. Siendo el Ecuador un país ganadero y productor de leche, principalmente en su callejón interandino, es necesario la implementación de técnicas modernas para evitar la adulteración de este alimento básico y primordial. Dentro del proceso de recolección, transporte y procesamiento de la leche fresca, se pueden presentar diversas formas de adulteración de la misma, lo cual representa fraudes económicos tanto para el consumidor como para los industrializadores de leche.

Un producto se considera adulterado cuando su naturaleza o composición no correspondan con lo que se etiqueta, anuncia, expende, suministra, o cuando no corresponda a las especificaciones de su autorización; o haya sufrido tratamiento que disimule su alteración, se encubran defectos en su proceso, o en la calidad sanitaria de las materias primas utilizadas.

La adulteración pretende obtener mayores rendimientos en el producto final, con la consecuente ganancia económica. Con base en lo anterior, los productos alimenticios son susceptibles de sufrir adulteraciones y la leche no es una excepción.

Existen diversas maneras en las que la leche puede ser adulterada, destacándose los siguientes: la adición de agua, la presencia de agentes neutralizantes y la incorporación de suero de quesería.

Uno de los principales problemas de adulteración de la leche y de difícil detección, constituye la presencia de suero derivado de queserías, dado que este no se percibe sensorialmente y que además es de precio y calidad inferior comparado a la leche. A más que en el país el uso industrial del suero de quesería es muy limitado.

La adulteración de la leche con suero de quesería constituye un fraude al consumidor, competencia desleal al productor y afecta la cadena productiva lechera.

Industrias comercializadoras y procesadoras de leche tienen problemas de adulteración de leche con suero de quesería, debido a su bajo costo y a que no se percibe sensorialmente ni por los métodos físico químicos de rutina.

Grandes industrializadores de leche tienen el problema de que muchos productores realizan mezclas de leche y suero fresco o en polvo para bajar los costos y obtener más utilidad, con las consecuentes pérdidas económicas en el momento de la industrialización de la leche, ya que la producción se ve afectada y la productividad también.

Para la detección de suero existen diferentes métodos y todos ellos requieren mucho trabajo y tiempo, además de presentar problemas de sensibilidad y precisión a bajas concentraciones.

La técnica se basa en el aislamiento del GMP por precipitación secuencial con ácido tricloroacético (ATC), a través de electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS), al separar proteínas nativas y desnaturalizadas.

Así mismo se desea conocer la influencia del suero de quesería en las características físico-químicas, microbiológicas y sensoriales de la leche.

Los objetivos del presente estudio son:

#### OBJETIVOS:

a. GENERAL:

Determinar la adulteración de leche fresca con suero de quesería, a través de electroforesis.

b. ESPECÍFICOS:

- Verificar la presencia de varios porcentajes de suero de quesería en leche fresca.
- Conocer la influencia de suero de quesería en las características físico-químicas, microbiológicas y sensoriales de la leche.
- Detallar la técnica planteada para determinar la adulteración de leche fresca con suero de quesería.

La hipótesis del estudio es:

- H0: Comprobar que el método usado no verifica la presencia de suero de quesería en leches adulteradas con dicho subproducto.
- H1: Comprobar que el método usado si verifica la presencia de suero de quesería en leches adulteradas con dicho subproducto.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **A. LECHE Y SUERO DE LECHE**

#### **1. Definición de leche**

Para el Codex Alimentarius (Codex Stan 206-1999), la Leche es la secreción mamaria normal de animales lecheros obtenidos mediante uno o más ordeños sin ningún tipo de adición o extracción, destinados al consumo en forma de leche líquida o la elaboración ulterior.

La Norma INEN 0009:08, en su Cuarta Revisión, indica que la leche “es el producto de la secreción normal de las glándulas mamarias, obtenida a partir del ordeño íntegro e higiénico de vacas sanas, sin adición ni sustracción alguna, exento de calostro y libre de materias extrañas a su naturaleza, destinado al consumo en su forma natural o a la elaboración ulterior”

Paltrinieri, (2001), indica que la leche representa un elemento importante en la alimentación humana. Puede consumirse en forma natural o transformada en sus productos derivados.

Para Meyer, (1997), con el término leche se distingue la leche de vaca; si se trata de leche de otros animales se especifica, como leche de cabra, leche de oveja, etc.

La leche es un producto alimenticio de gran importancia por sus propiedades nutritivas y alto valor biológico. (Galindo, L. et al. 2006).

#### **2. Definición de suero**

Para el Codex Alimentarius (Codex Stan 289-1999), el Suero es el producto lácteo líquido obtenido durante la elaboración del queso, la caseína o productos similares, mediante la separación de la cuajada, después de la coagulación de la leche y/o los

productos derivados de la leche. La coagulación se obtiene mediante la acción de, principalmente, enzimas del tipo del cuajo.

La Norma INEN 2594:2011, indica que el suero de leche “es el producto lácteo líquido obtenido durante la elaboración del queso, la caseína o productos similares, mediante la separación de la cuajada, después de la coagulación de la leche pasteurizada y/o los productos derivados de la leche pasteurizada. La coagulación se obtiene mediante la acción de, principalmente, enzimas del cuajo.

FRANCHI, 2010, define al suero de leche como el líquido remanente luego de la separación de la cuajada, al momento de hacer queso, o también al separar la caseína luego de la coagulación de ésta. Es el residuo líquido de la producción de quesos y es uno de los más grandes reservorios de proteína alimenticia que actualmente no ha alcanzado su punto máximo de aprovechamiento.

## **B. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA LECHE Y SUERO DE LECHE**

### **1. Composición química de la leche**

Los principales componentes de la leche son:

- Agua.
- Proteínas y enzimas.
- Sales minerales.
- Lactosa.
- Grasa.
- Vitaminas.
- Sólidos totales y sólidos no grasos.

Para Meyer, M. (1997), la siguiente tabla proporciona el promedio de la composición de algunos tipos de leche:

Especie	Agua	Grasa	Proteína	Lactosa	Sales minerales
Mujer	87.6%	3.6%	1.9%	6.6 %	0.2%
Vaca	87.6%	3.7%	3.2%	4.8 %	0.7%
Cabra	87.5%	4.1%	3.4%	4.2 %	0.8%
Oveja	81.5%	7.5%	5.6%	4.4 %	1.0%
LLama	86.5%	3.2%	3.9%	5.6 %	0.8%

Para Silva, (1998), la composición cuantitativa de la leche de vaca es:

Constituyente principal	Límites de variación (%)	Valor medio (%)
Agua	8.5 – 89.5	87.5
Sólidos totales	10.5 – 14.5	13.0
Grasa	2.5 – 6.0	3.9
Proteínas	2.9 – 5.0	3.4
Lactosa	3.6 – 5.5	4.8
Minerales	0.6 – 0.9	0.8

Aproximadamente el 85% de la leche es agua. En esta agua se encuentran los otros componentes en diferentes formas de solución. Las sales y la lactosa se encuentran disueltas en el agua formando una solución verdadera. La mayoría de las sustancias proteínicas no son solubles y forman conjuntos de varias moléculas. Sin embargo estos conjuntos son tan pequeños, que la mezcla tiene aparentemente las mismas características que una solución verdadera. Este tipo de solución se llama solución coloidal. (Meyer, M. 1997).

Para SILVA, 1998, los principales componentes de la leche son agua, grasa, proteínas, lactosa y sales minerales. Indica que la leche también contiene pequeñas trazas de otras sustancias tales como pigmentos, enzimas, vitaminas, fosfolípidos y gases.

La grasa es insoluble al agua y por eso se encuentra en la leche en forma de glóbulos grasos formando una emulsión. Una emulsión es la mezcla de pequeñas gotas de un líquido en otro líquido sin que lleguen a disolverse. Una emulsión puede ser estable o



inestable. La leche cruda es una emulsión inestable de grasa en agua. Después de un cierto tiempo, la grasa se estratifica en forma de nata. (Meyer, M. 1997).

Si se deja en reposo la leche, se formará una capa de nata en su superficie. Vista al microscopio, la nata consta de una gran cantidad de esferas de tamaño variable, flotando libremente en la leche. Cada esfera está rodeada por una delgada membrana. Estas diminutas esferas son glóbulos de grasa y la membrana consta de proteínas y fosfolípidos. (Silva, 1998)

Las sustancias proteínicas de la leche se dividen en proteínas y enzimas. Estas sustancias están compuestas de aminoácidos en la molécula determina las características de la sustancia. (Meyer, 1997).

En la leche de vaca europea, el contenido total de proteínas se encuentra entre 2.8 y 3.5%, correspondiendo alrededor de 80% a las caseínas. Entre éstas las más importantes son las caseínas,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$  (kapa). (Villegas, 2003).

Los elementos constitutivos de mayor importancia en la leche de las diferentes especies de mamíferos son las proteínas, las cuales están presentes a nivel de 3,2% de este alimento. El 80% de estas proteínas son caseínas y el 20% restante está representado por las proteínas séricas  $\gamma$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina, albúmina del suero bovino, euglobulina, pseudoglobulina, mucinas, proteínas de la membrana del glóbulo graso, otras albúminas, así como numerosas enzimas (Galindo, L. et al. 2006).

Las proteínas en la leche son la caseína, la albúmina y la globulina. La caseína de la leche se encuentra combinada con calcio y fosfato en forma coloidal. La caseína es la materia prima para la elaboración de los quesos. Si se acidifica la leche hasta un pH de 4.7, el calcio y el fosfato se separan de la caseína. La última es insoluble y se deposita. Si se acidifica la leche aún más, la caseína vuelve a disolverse. La albúmina y la globulina son solubles, pero se vuelven insolubles por un calentamiento a más de 65 °C. Este cambio de estado físico por calentamiento se llama desnaturalización de la proteína. (Meyer, M. 1997).

Proteína sérica es un término utilizado con frecuencia como sinónimo de proteínas del suero de la leche. (Silva, 1998).

Las caseínas son un grupo de proteínas que contienen fósforo y son específicas de la leche, en donde se encuentran casi siempre en forma de micelas y precipitan a un pH de 4,6. Se conocen seis tipos de caseínas:  $\alpha$  s1 (alfa s1),  $\alpha$  s2 (alfa s2),  $\beta$  (beta),  $\gamma$  (gamma),  $\kappa$  (kappa) y  $\lambda$  (lambda). La caseína  $\kappa$  tiene propiedades físico-químicas únicas, si se compara con las otras proteínas de la leche. Algunas de estas propiedades son: insensibilidad a precipitación por iones calcio, por lo que se mantiene soluble en soluciones de calcio con concentraciones que precipitan a todas las demás caseínas; efecto estabilizador sobre las otras caseínas cuando el calcio está presente en la suspensión; sufren hidrólisis por quimosina en un enlace peptídico específico, lo que resulta en la desestabilización de las micelas y la formación de precipitados; además, es la única de las caseínas que contiene residuos de cisteína y glúcidos en su estructura (Galindo, L. et al. 2006).

Cuadro 1. CANTIDADES Y TIPOS DE PROTEÍNAS PRESENTES EN LA LECHE DE VACA.

Tipo de proteína	% aproximado en leche desnatada	% aproximado total de proteínas en leche desnatada	% aproximado en proteínas de leche entera
Caseínas	2,6		80
$\alpha$ -caseína		50	
$\kappa$ -caseínas		12	
$\beta$ -caseínas		30	
Proteínas del suero	0,6		19
Seroalbúminas bovinas		1	
$\beta$ -lactoglobulinas		10	

$\alpha$ -lactoalbúminas	4	
Inmunoglobulinas	3	
Proteínas de la membrana del glóbulo graso		5

Fuente: Silva, (1998).

Elaboración: El Autor.

Las enzimas son compuestos proteínicos que aceleran los compuestos biológicos. La acción de las enzimas depende de la temperatura y del pH del medio. Las temperaturas bajas reducen su actividad. A temperaturas elevadas, entre 70 y 85 °C, se inactiva la mayor parte de las enzimas. (Meyer, M. 1997).

Para Meyer, M. (1997), en la leche cruda normalmente se encuentran las siguientes enzimas:

- Fosfatasa: se inactiva a temperaturas mayores a los 70 °C. La presencia de esta enzima indica que la leche no se ha pasteurizado a la temperatura adecuada.
- Peroxidasa: se inactiva a temperaturas mayores a los 80 °C. Si esta enzima está ausente significara que la leche ha sido pasteurizada a una temperatura elevada.
- Catalasa: Esta enzima se encuentra en cantidades mínimas en la leche de vacas sanas. Vacas enfermas de mastitis producen leche con una cantidad mayor de esta enzima. Además, algunas bacterias ajenas a la leche la producen. La catalasa se inactiva por una pasteurización a temperatura baja.
- Lipasa: Esta enzima separa la grasa en glicerina y sus ácidos grasos. Los ácidos provocan olores y sabores desagradables en la leche, en la crema y en la mantequilla. Esta enzima se inactiva por una pasteurización a temperatura baja.
- Xantinoxidasa: Su presencia es importante en la elaboración de los quesos de pasta firme, como el tipo holandés. En presencia de nitratos de potasio ayuda a combatir la acción de las bacterias butíricas, que producen grietas en este tipo de queso. Se inactiva por una pasteurización a temperatura elevada.

Otra enzima que puede encontrarse en la leche, es la reductasa. Esta sustancia no es una enzima láctea, pero es producida por microorganismos. La presencia de la reductasa en la leche indica que la leche está contaminada con microorganismos. (Meyer, M. 1997).

La cantidad de grasa en la leche es variable y depende de la raza y de la alimentación de la vaca. La grasa contribuye mucho al sabor y a las propiedades físicas de la leche y de los productos lácteos. La grasa puede constar de glicerina y uno, dos o tres ácidos grasos. La combinación de glicerina con tres ácidos grasos se llama triglicérido. (Meyer, M. 1997).

La grasa está distribuida en la leche en forma de gotitas o glóbulos, rodeados de una película que contiene lecitina y proteína. Esta película permite que los glóbulos queden en emulsión. (Meyer, M. 1997).

La lactosa da el sabor dulce a la leche. La lactosa está compuesta de glucosa de la galactosa. Las bacterias lácticas pueden transformar la lactosa en ácido láctico. Esta acidificación no es deseable en el caso de la leche para consumo, pero en la obtención de productos lácteos, como yogurt, mantequilla y queso, la fermentación de la lactosa en ácido láctico ejerce una acción conservadora. (Meyer, M. 1997).

Las sales minerales o cenizas de la leche son cloruros, fosfatos, sulfatos, carbonatos y citratos. Los minerales principales son calcio, sodio, potasio, magnesio y hierro. Los citratos intervienen en el aroma de la mantequilla. El contenido de sales cálcicas es importante en la alimentación, porque éstas favorecen el crecimiento de los huesos. (Meyer, M. 1997).

Además, las sales de calcio tienen gran influencia en la coagulación de la leche cuando se elabora queso. Sin embargo, al pasteurizar la leche, una parte de estas sales de calcio se vuelven insolubles. Por esto se añade una cantidad de cloruro de calcio a la leche pasteurizada destinada a la elaboración de queso. (Meyer, M. 1997).

En la leche también encontramos vitaminas A, B1, B2 y D. (Meyer, M. 1997).

Para SILVA, 1998, los principales componentes de la leche son agua, grasa, proteínas, lactosa y sales minerales. Indica que la leche también contiene pequeñas trazas de otras sustancias tales como pigmentos, enzimas, vitaminas, fosfolípidos y gases.

## **2. Composición química del suero de leche**

Las proteínas del suero de la leche en general y la  $\alpha$ -lactoalbúmina en particular son de un alto valor nutritivo. Su composición en aminoácidos es muy cercana a la que es considerada biológicamente óptima. Los preparados de proteína de suero son muy utilizados en la industria alimentaria. (Silva, 1998).

Para FRANCHI, 2010, la composición típica del suero de leche es:

Sólidos totales	6.4 – 6.5
Agua	93.5 – 93.6
Grasa	0.05 – 0.37
Proteínas	0.6 – 1.0
Lactosa	4.4 – 5.2
Minerales	0.5 – 0.8
Calcio	0.043 – 0.12
Fósforo	0.040 – 0.065
Sodio	0.05
Potasio	0.16
Cloro	0.11
Ácido láctico	0.05 – 0.4

## **C. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LA LECHE**

La leche tiene un sabor ligeramente dulce y un aroma delicado. El sabor dulce proviene de la lactosa, mientras que el aroma viene principalmente de la grasa. Sin embargo la

leche absorbe fácilmente olores del ambiente como el olor del establo o de pintura recién aplicada. Además, ciertas clases de forrajes consumidos por las vacas proporcionan cambios en sabor y olor a la leche. (Meyer, M. 1997).

Para SILVA, 1998, El aspecto opaco de la leche es debido a su contenido en partículas suspendidas de grasa, proteínas y ciertas sales minerales. El color varía desde blanco a amarillo, según la coloración de la grasa. La leche desnatada es más transparente, con un ligero tinte azulado.

La leche tiene un color ligeramente blanco amarillento debido a la grasa y a la caseína. Los glóbulos de grasa y en menor grado la caseína, impiden que la luz pase a través de ella, por lo cual la leche parece blanca. (Meyer, M. 1997).

La acidez de la leche se expresa en la cantidad de ácido que puede neutralizarse con hidróxido de sodio al 0.1%. De esta forma, se mide el ácido presente en la solución. Esta clase de acidez se llama acidez real. La acidez promedio de la leche cruda fresca es de 0.165%. (Meyer, M. 1997).

La leche normal tiene un pH de 6.6 – 6.7. (Silva, 1998). La leche cruda fresca tiene un pH 6.6, es decir, que es una solución ligeramente ácida. (Meyer, M. 1997).

La densidad de la leche varía normalmente entre 1.028 y 1.034, dependiendo de su composición. La leche es por lo tanto, ligeramente más densa que el agua (1.0). (Silva, 1998). La densidad promedio de leche es aproximadamente 1.030 g/ml a 20 °C. Meyer, M. 1997).

#### **D. TIPOS DE COAGULACIÓN DE LA LECHE Y FORMACIÓN DE GLUCOMACROPÉPTIDO**

Para Villegas, (2003), al referirse a la coagulación de la leche, en realidad se está haciendo alusión implícita a sus proteínas; fundamentalmente a las caseínas.

Las caseínas se asocian en estructuras quasi-esféricas, y éstas se agregan por medio de un material “cementante” formado por fosfato-cálcico (en algunas de sus variantes), dando origen a las llamadas micelas caseínicas cuya forma es también quasi-esférica, con un diámetro situado entre 80 y 300 nanómetros. Estas micelas forman la fase coloidal proteica de la leche que es necesario perturbar para elaborar queso.

Para Silva, (1998), Las sales cálcicas de la  $\alpha$ -caseína y de la  $\beta$ -caseína son casi insolubles en agua, mientras que las de la  $\kappa$ -caseína en la superficie de las micelas son normalmente solubles. Debido a la situación dominante de la  $\kappa$ -caseína en la superficie de las micelas, la solubilidad del  $\kappa$ -caseinato cálcico dominará sobre la insolubilidad de las otras dos sales de las micelas y la micela completa será soluble como un coloide.

Existen principalmente, dos vías o formas para cuajar la leche (Villegas, 2003):

### 1. Vía ácida

Por precipitación puramente ácida de las caseínas. Esta forma de coagulación de las caseínas implica la acción de ácidos orgánicos tales como el láctico, el acético y el cítrico; primero sobre las micelas caseínicas y luego sobre las moléculas de caseína o las submicelas. (Villegas, 2003).

El pH bajará si se añade un ácido a la leche o si se deja que en la misma crezcan bacterias acidificantes. Esto cambiará el medio ambiente en que se desenvuelven las micelas de caseína en dos sentidos. En primer lugar, el hidróxifosfato cálcico presente en la leche se disolverá y formará calcio ionizado que penetra en la estructura de las micelas creando unas fuertes uniones internas cálcicas. En segundo lugar, el pH de la solución se acercará y superará los puntos isoeléctricos de las especies individuales de caseína (Silva, 1998).

El fundamento de la precipitación se da por la desmineralización gradual de las micelas, al migrar el calcio y los fosfatos hacia el plasma (fase acuosa) por acción de los iones hidrógeno ( $H^+$ ), proporcionados por el ácido. De esta manera, a medida que va

descendiendo el pH desde aproximadamente 6.8 (pH normal de la leche) hacia 5.0, la estructura micelar se desintegra gradualmente. (Villegas, 2003).

Los puntos isoeléctricos de los componentes de la caseína dependen de los iones de otras clases preferentes en la solución. Valores teóricos que tiene validez bajo ciertas condiciones, son pH 5.1 a 5.3. En soluciones salinas, similares a la condición de la leche, la gama óptima de precipitación es a pH 4.5 a 4.9. Un valor práctico para la precipitación de la caseína de la leche es un pH de 4.7. (Silva, 1998).

Si se alcanza un pH alrededor de 4.7, las moléculas de caseína precipitan al arribar a su punto isoeléctrico. Así una cuajada obtenida por vía ácida estará prácticamente desmineralizada, en tanto que el suero contendrá una elevada concentración de minerales (calcio, fósforo, magnesio, potasio, etc). (Villegas, 2003).

## **2. Vía enzimática**

Para Villegas, (2003), por medio de renina u otras enzimas coagulantes o proteolíticas (pepsina, enzimas bacterianas y vegetales).

Se basa en el empleo de una enzima como la renina o quimosina, producida en el abomaso de los rumiantes lactantes, terneros o cabritos. Esta enzima está presente, activa, en el llamado “cuajo” comercial, que no es más que la solución extractora de la enzima. (Villegas, 2003).

La renina actúa cuando las condiciones de la leche sustrato son adecuadas, ataca a la caseína  $\kappa$  la cual junto con las caseínas  $\alpha$  y  $\beta$  forman la micela. Estas últimas se vuelven “precipitables” por el ión  $\text{Ca}^{++}$  del suero, iniciándose así la formación de una red o malla tridimensional de fosfo-caseinato de calcio que es el origen de la cuajada y del queso. (Villegas, 2003).



En realidad el fenómeno de la coagulación no es simple, y no se conoce aún en todos sus detalles; no obstante, se considera que involucra dos reacciones, que se pueden indicar simplídicamente así (Villegas, 2003).

#### Reacción 1

Caseína  $\kappa$   $\xrightarrow{\text{renina}}$  Para caseína  $\kappa$  + Glucomacropéptido

#### Reacción 2

Para-caseína  $\kappa$  + caseína  $\alpha$  + caseína  $\beta$   $\xrightarrow{\text{Ca}^{++} \text{ P}}$  fosfocaseinatos de calcio

La red de fosfocaseinatos de calcio, desde su formación, experimenta una contracción gradual (sinéresis) que expulsa una gran proporción de la fase acuosa de la leche original en forma de suero; éste contiene la mayor cantidad de lactosa, proteínas séricas, minerales, etc., así como microorganismos. Así mismo, el gel formado atrapa la mayor parte de la materia grasa (más del 80% de la original), cierta proporción del suero, sustancias solubles y microorganismos. (Villegas, 2003).

Para Silva, (1998), la cadena aminoácida que forma la molécula de  $\kappa$ -caseína consta de 169 aminoácidos. Desde un punto de vista enzimático, el enlace entre los aminoácidos 105 (fenilalanina) y 106 (metionina) es particularmente débil. Gran número de enzimas proteolíticas son capaces de atacar este enlace y romper la cadena.

Una de las partes formadas contiene los aminoácidos 106 a 148 y, junto con ellos todos los hidratos de carbono de la  $\kappa$ -caseína que daban a la molécula sus propiedades hidrófilas. Esa parte de la molécula de  $\kappa$ -caseína se la conoce como MACROPÉPTIDO y es eliminada con el suero durante el proceso de fabricación del queso. (SILVA, 1998).

El glicomacropéptido (GMP) es liberado al suero por acción de la renina sobre la  $\kappa$ -caseína durante la elaboración del queso y en muestras de leche, este factor constituye un marcador de adulteración de la misma. (Galindo, L. et al. 2006).

La parte que resta de la  $\kappa$ -caseína consta de los aminoácidos 1 al 105 y es bastante insoluble y permanece con las caseínas  $\alpha$  y  $\beta$  en el coágulo del queso. Esta porción se llama para- $\kappa$ -caseína. Antiguamente, se decía que todo el coágulo estaba formado de para-caseína. La formación del coágulo es debida a la eliminación repentina del macropéptido hidrófilo y al desequilibrio que esto causa en las fuerzas intermoleculares. (Silva, 1998).

## **E. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ADULTERACIÓN POR SUERO**

Existen varios métodos para detectar la presencia y en algunos casos conocer la cantidad de suero como agente adulterante en la leche en sus diferentes presentaciones, dichos métodos pueden clasificarse como directos e indirectos (Alcázar, C. et al. 1998):

### **1. Métodos indirectos**

Entre los métodos indirectos se encuentra la determinación de la proporción de caseína del suero presente en la leche, que se hace a través de la cuantificación del nitrógeno no caseínico; la cuantificación de grupos sulfhidrilos por gramo de proteína; la determinación del aumento de los niveles de amonio en leche mediante el uso de un potenciómetro, así como la determinación del complejo cisteína-caseína, a través de un método polarográfico. (Alcázar, C. et al. 1998).

### **2. Métodos directos**

Entre los métodos directos se encuentra la detección de un péptido específico, el glucomacropéptido (GMP), que se libera al entrar la leche en contacto con la enzima renina que actúa sobre la caseína kappa de la leche, y se convierte las micelas de la caseína en susceptibles a la formación de agregados, lo cual constituye el proceso de elaboración del queso. Esta enzima elimina el enlace fenilalanina-metionina (105-106) de la caseína kappa, liberando la para-kappa caseína y el péptido mencionado

anteriormente, este último no es posible encontrarlo en forma libre en la leche a menos que esta contenga suero adicionado. (Alcázar, C. et al. 1998).

De los métodos más usados para detectar y lactosuero se encuentra la detección y cuantificación de un glucomacropéptido (GMP) que está presente sólo en suero de quesería y no en leche (Chávez, et al. 2010).

La electroforesis se ha utilizado ampliamente para separar proteínas nativas de las desnaturalizadas, la cual permite detectar el GMP mediante aislamiento del mismo por ácido tricloroacético (ATC). (Galindo, et al. 2006).

La NORMA INEN 2401:2008, indica que la Determinación de suero de quesería en la leche fluida y en polvo, se la debe realizar mediante el Método de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

Otro método corresponde a la detección mediante un sistema ELISA.

## **2.1 DETECCIÓN POR HPLC:**

De acuerdo a la Norma NTE INEN 2400:2008, se pone en manifiesto la presencia de suero de quesería mediante la determinación de glicomacropéptidos por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) previa la eliminación de grasas con ácido tricloroacético.

Como muestra patrón se usa leche fresca exenta de suero de quesería.

Para preparar la muestra se homogeniza la leche líquida a 40 °C y tomar 20 ml de leche y llevar a 25 °C. Añadir en 2 minutos 10.0 ml de la solución de ácido tricloroacético agitando constantemente con la ayuda de un agitador. (Norma NTE INEN 2400:2008)

Antes de proceder al análisis cromatográfico de las muestras, inyectar el patrón de leche las veces que sean necesarias hasta que el área y el tiempo de retención del pico correspondiente a los glicomacropéptidos (GMP) sea constante. Inyectar en la columna

un volumen de 15 a 30 µl, medidos con exactitud, del filtrado del patrón exento de suero, del patrón de la muestra, en el aparato de cromatografía líquida de alta eficacia con un flujo de 1.0 ml/min de la solución eluyente o en las condiciones adecuadas de acuerdo con la columna usada. (Norma NTE INEN 2400:2008)

En cada interrupción lavar las columnas con agua y en toda interrupción superior a veinticuatro horas, después del lavado con agua, se les debe pasar solución de lavado por lo menos tres horas a un flujo de 0.2 ml por minuto o seguir las instrucciones del fabricante. (Norma NTE INEN 2400:2008)

Se realiza el cálculo de las áreas de los picos para la determinación de suero de quesería añadido. (Norma NTE INEN 2400:2008)

El cálculo del coeficiente de respuesta:

$$R = \frac{P}{A(5) - A(0)}$$

En donde:

R = es el coeficiente de respuesta

A(5) = es el área del pico III obtenido del análisis cromatográfico del patrón de leche adicionada 5% (m/m) de suero de quesería

A(0) = es el área del pico III obtenido del análisis cromatográfico del patrón de leche exento de suero de quesería

P = es el porcentaje de suero de quesería presente en el patrón (en este caso 5%)

Cálculo del área relativa del pico III obtenido del análisis cromatográfico de la muestra.

$$S(E) = R \times A(E)$$

En donde:

S(0) = área relativa del pico III en la muestra

A(E) = área correspondiente al pico III obtenida en el análisis

R = cromatográfico de la muestra  
 R = Coeficiente de respuesta, calculado con el paso anterior.

Cálculo del tiempo de retención relativo del pico III en la muestra.

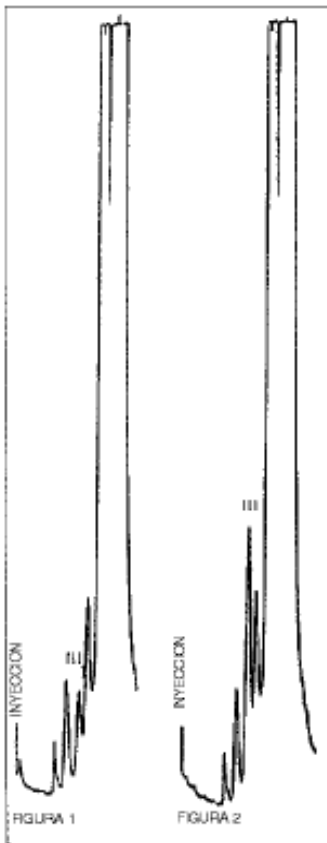
$$TRR(E) = \frac{TR(E)}{TR(S)}$$

En donde:

TRR (E) = tiempo de retención relativo del pico III de la muestra

TR (E) = tiempo de retención del pico III obtenido en el análisis cromatográfico de la muestra

R = tiempo de retención del pico III obtenido en el análisis cromatográfico del patrón de la leche adicionada suero de quesería



Por la experimentación está demostrado que existe relación lineal entre el tiempo relativo del pico III en la muestra y el porcentaje de suero de quesería añadido hasta el 10%.

a) Con un contenido < 5%, el TRR (E) es > 1.000

b) Con un contenido ≥ 5%, el TRR (E) es = 1.000

La incertidumbre admitida para los valores del TRR (E) es de ± 0.002.

Cálculo del porcentaje de suero de queserías presente en la muestra:

$$W = S(E) - [1,3 + (S(0) - 0,9)]$$

En donde:

W = porcentaje m/m desuero de quesería presente en la muestra

S (E)	=	área relativa del pico III para la muestra obtenido del segundo cálculo
1.3+	=	media experimental del área relativa del pico III expresada en gramos de suero de quesería en 100 g de leche no adulterada
S (0)	=	área relativa del pico III para el patrón de leche exenta de suero de quesería, obtenida según el tercer cálculo
S (0)-0.9	=	corrección que hay que efectuar en el área relativa media 1.3 cuando el valor S (0) no es igual a 0.9

Repetitividad: La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas simultáneamente o en un corto intervalo de tiempo por el mismo analista que utilice los mismos aparatos, con la misma toma de muestra, no debe sobrepasar el 0.2% m/m. (Norma NTE INEN 2400:2008)

Reproductividad: La diferencia entre dos resultados individuales e independientes obtenidos en dos laboratorios diferentes, con la misma toma de muestra no debe sobrepasar el 0.4% m/m. (Norma NTE INEN 2400:2008)

Límite de detección: Se considerará que una muestra contiene suero de quesería añadido cuando el porcentaje cuantificado sea superior al 5% para las leches UHT y superior a 3% en leches pasteurizadas, esterilizadas y en polvo. (Norma NTE INEN 2400:2008)

## **2.2 DETECCIÓN POR ELISA:**

Para la detección del GMP se desarrolló un sistema ELISA tipo sándwich, para lo cual se conjugaron anticuerpos puros anti-GMP con un éster de la biotina utilizando un estuche comercial. Los Anticuerpos anti-GMP se fijan a una fase sólida y actúan como anticuerpos de captura del antígeno problema (GMP o suero de quesería). Los antígenos son reconocidos por los mismos anticuerpos conjugados con la biotina y el complejo formado se detecta con el conjugado.

## **F. LA ELECTROFORESIS:**

### **1. Concepto:**

Para Morales. 2008, La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico a través de una matriz porosa, la cual finalmente las separa por tamaños moleculares y carga eléctrica, dependiendo de la técnica que se use. La técnica clásica utiliza una tira recubierta de una sustancia porosa impregnada de un electrolito. Sus extremos se sumergen en dos depósitos independientes que contienen ambos al electrolito y están unidos a los electrodos del generador de corriente. La muestra se deposita en forma de un pequeño trazo transversal en la tira. La distancia de migración se mide en relación un marcador interno. Las placas son reveladas con sales de plata, azul de Coomassie, o reactivos en particular.

Para García. 2000, la electroforesis es un método analítico – semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga u bajo la acción de un campo eléctrico. Fue empleado por primera vez por Toselius en el año 1937. Raymond y Weintraub en 1959 emplearon como soporte para la electroforesis un gel de poliacrilamida (PAGE), posteriormente el método fue perfeccionado por varios investigadores como Davis y Ornstein. La popularidad de este creció rápidamente y se logró un aumento de la resolución. El dodecil sulfato de sodio (SDS) se introduce en esta técnica en 1970, y ya en 1972 se emplean agentes reductores y SDS en la determinación del peso molecular de proteínas en lo que se denominó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

### **2. Fundamentos y Conceptos Básicos:**

La electroforesis capilar (CE) es una técnica de separación que se ha desarrollado gracias a los avances de la cromatografía líquida de alta eficacia junto con los procedimientos más tradicionales de electroforesis. Esta técnica permite separar

bastante bien biomoléculas, donde la cromatografía líquida se muestra menos eficaz, y compuestos de pequeña masa molecular, difíciles de estudiar por los procedimientos clásicos de electromigración en soporte. (MORALES, 2008).

La electroforesis capilar constituye una adaptación particular de la técnica de electroforesis. Esta técnica separativa se basa en la migración de las especies de la muestra en disolución, portadoras de una carga eléctrica global, bajo el efecto de un campo eléctrico y en contacto con un soporte (medio de desplazamiento) adecuado. En electroforesis capilar la tira se reemplaza por un tubo capilar abierto en sus extremos, fabricado con un diámetro pequeño (15 a 150 $\mu\text{m}$ ). El capilar oscila entre 20 y 80cm, y está lleno de una solución buffer. Un detector se encuentra ubicado en un extremo del capilar, cerca del compartimiento catódico. La señal obtenida es la base de la obtención del *electroferograma*, que muestra el registro de la composición de la muestra. Solo las especies que se dirigen hacia el cátodo serán detectadas. (MORALES, 2008).

Para García. 2000, el fundamento de la electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos  $-$  y  $+$ ), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. Es de destacar que a escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza. Se pueden conocer también mediante estas técnicas, las características ácido-básicas de las proteínas presentes en un extracto crudo, lo que da la información necesaria si se pretende realizar una separación cromatográfica basada en diferencias de carga. Es útil además para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoelectrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas.

La velocidad de migración ( $v$ ) de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga efectiva ( $q$ ) y el gradiente de potencial eléctrico ( $E$ ) e inversamente proporcional al coeficiente de fricción ( $f$ ) relativo a la talla y forma de la molécula, o sea, a la resistencia que le ofrece el medio.



$$V = q E / f$$

La movilidad electroforética (Me) es un caso particular de la velocidad de migración de un ión, cuando se aplica un campo eléctrico de 1 V/cm. Su signo es igual al de la carga de la partícula. La velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga / peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis. El voltaje no se puede incrementar indiscriminadamente porque se genera un excesivo calor. En contraste, al aplicar bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación, por causa de la difusión por tiempo muy prolongado de la corrida electroforética. La mayoría de las biomacromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos) poseen determinada carga eléctrica con grupos aniónicos y catiónicos capaces de disociarse. La carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con pequeñas moléculas de iones u otras macromoléculas. De lo anterior se deduce que el pH influye sobre la velocidad de migración de las moléculas. En el punto isoeléctrico de la biomolécula, pH al cual su carga neta es 0, esta no migra. Por debajo del punto isoeléctrico tiene carga neta positiva y migra hacia el cátodo, y por encima del punto isoeléctrico tienen carga neta negativa y migra hacia el ánodo (GARCÍA, 2000).

### **3. Métodos de Detección:**

En la detección UV-Vis se mide la intensidad de la luz que pasa a través del capilar en una pequeña zona en la que se ha eliminado el revestimiento opaco. La detección por fluorescencia resulta más sensible si se emplea una fuente láser muy intenso, asociado a menudo a un procedimiento de preformación de derivados de los analitos portadores de un fluoróforo. (MORALES, 2008).

### **4. Técnicas Electroforéticas:**

#### ***4.1. Electroforesis capilar en zona o en disolución libre (CZE)***

Es el procedimiento de electroforesis más habitual, en el cual el capilar es recorrido por el electrolito a través de un medio buffer que puede ser ácido (fosfato o citrato), básico

(borato), o anfótero (carácter ácido y básico). El flujo electroosmótico crece con el pH del medio electroforético. (MORALES, 2008).

Son útiles para lograr la separación de componentes de mezclas complejas. Se aplican pequeñas cantidades de la disolución de proteínas a un soporte sólido, que se impregna con una solución de tampón. Los soportes son en general polímeros y forman un gel poroso que restringe el movimiento de las moléculas a través del medio durante la electroforesis y disminuyen los flujos de convección del solvente. Como soportes han sido utilizados papel (celulosa), almidón, poliacrilamida, agarosa, acetato de celulosa, etcétera. (GARCÍA, 2000).

Este método tiene gran poder resolutivo porque se aplica una cantidad pequeña de proteína a una zona estrecha, mientras que la longitud del trayecto es mucho mayor que la zona de aplicación. El equipamiento requerido es simple (fuente de poder y cubeta vertical u horizontal donde se coloca el soporte y 2 electrodos). Con el desarrollo de la ciencia se han diseñado equipos automatizados de electroforesis como el PhastSystem. (GARCÍA, 2000).

#### ***4.2. Electroforesis capilar en gel (CGE)***

Esta es la transposición de la electroforesis en gel de poliacrilamida o de agarosa. El capilar está relleno con un electrolito que contiene al gel. Se produce un efecto de filtración que ralentiza a las grandes moléculas y que minimiza los fenómenos de convección o de difusión. Los oligonucleótidos, poco frágiles, se pueden separar de este modo. (MORALES, 2008).

La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de que variando la

concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro. (GARCÍA, 2000).

#### ***4.3. Isoelectroenfoque capilar (CIEF)***

Esta técnica, también conocida como electroforesis en soporte, consiste en crear un gradiente de pH lineal en un capilar con pared tratada que contiene un anfótero. Cada compuesto migra y se enfoca al pH que tenga igual valor que su punto isoeléctrico (al  $pI$  su carga neta es nula). Seguidamente, bajo el efecto de una presión hidrostática y manteniendo el campo eléctrico, se desplazan las especies separadas hacia el detector. Las altas eficiencias obtenidas con este procedimiento permiten separar péptidos con  $pI$  que apenas difieren entre sí 0.02 unidades de pH. (MORALES, 2008).

#### ***4.4. Electroforesis capilar electrocinética micelar (MEKC)***

En esta variante del procedimiento anterior se añade a la fase móvil un compuesto catiónico o aniónico para formar micelas cargadas. Estas pequeñísimas gotitas inmiscibles con la disolución retienen a los compuestos neutros de un modo más o menos eficaz, por afinidad hidrófila-hidrófoba. Se puede utilizar este tipo de electroforesis para moléculas que tienen tendencia a migrar sin separación, como es el caso de algunos enantiómeros. (MORALES, 2008).

#### ***4.5. Electro cromatografía Capilar***

Este tipo de separación asocia la electromigración de los iones, propio de la electroforesis, y los efectos de separación entre fases presentes en la cromatografía. La técnica consiste en la utilización de un capilar relleno con una fase estacionaria, cuyo papel es doble: actúa como material selectivo que debe, por otro lado, participar en la migración del electrolito. (MORALES, 2008).

El factor de separación es muy elevado, pero existen un cierto número de problemas que limitan su aplicación, como el efecto de los modificadores orgánicos sobre el flujo

electroosmótico y la dificultad de un control preciso del volumen de muestra introducido en el capilar. (MORALES, 2008).

## **G. ELECTROFORESIS POR PAGE-SDS:**

SDS-PAGE es el acrónimo en inglés de *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico). Es una técnica ampliamente utilizada en bioquímica, genética, biología molecular y ciencia forense para separar las proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética (en función de la longitud de la cadena polipeptídica, masa molecular, modificaciones postraduccionales y otros factores). Gracias al SDS la mayoría de proteínas adquieren una relación carga/masa idéntica, por lo que se obtiene un fraccionamiento que obedece a: a la diferencia de peso, a la longitud de la cadena (tamaño) y a la forma de la proteína. Es el método de electroforesis empleado con mayor profusión para analizar proteínas. (GARCIA. 2000).

La disolución de proteínas que se van a analizar se mezcla en primer lugar con SDS, un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas, eliminando sus estructuras secundaria y terciaria (pero sin alterar los enlaces disulfuro y además confiere una carga negativa a cada proteína en proporción a su masa. Sin SDS, las distintas proteínas que tienen masas moleculares similares migran de forma diferente debido a diferencias en la proporción carga/masa, ya que cada proteína tiene un punto isoeléctrico distinto. Si la electroforesis se realiza así, sin añadir SDS, se habla de PAGE nativa. El problema se resuelve añadiendo SDS, puesto que al unirse y desplegar la proteína, le proporciona una carga negativa casi uniforme a lo largo de la longitud de la cadena polipeptídica. GARCIA. 2000).

El SDS se une en una proporción de aproximadamente 1,4 g SDS por 1,0 g de proteína (aunque las proporciones de unión pueden variar entre 1,1 y 2,2), proporcionando una relación carga/masa aproximadamente uniforme para la mayor parte de las proteínas, de modo que se puede asumir que la distancia de migración en el gel está directamente vinculada sólo al tamaño de la proteína desplegada (longitud de su cadena, número de

aminoácidos o masa molecular). Se puede añadir un colorante trazador a la disolución de proteínas para permitir al experimentador seguir el curso de la electroforesis. (GARCIA. 2000).

Existen 3 formas diferentes de realizar electroforesis en geles de poliacrilamida: lámina vertical, varilla cilíndrica y lámina horizontal. Los geles más finos son más económicos porque emplean menos reactivos y pueden ser eficientemente refrigerados durante la corrida, por lo tanto pueden ser corridos a mayor voltaje, lográndose así una alta resolución en corto tiempo. Los tiempos de tinción y destinción son menores también porque la difusión es muy rápida; sin embargo como el gel es tan fino es más propenso a perturbaciones y problemas en la polimerización. Se ha planteado que la resolución de las moléculas generalmente aumenta con la disminución del grosor del gel. (GARCIA. 2000).

La electroforesis con SDS es un excelente método para identificar y monitorear las proteínas durante un proceso de purificación; también se emplea para la determinación del peso molecular de las subunidades de proteínas. La estructura del detergente SDS empleado en esta variación de la electroforesis en gel de poliacrilamida es  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2=\text{SO}_3\text{-Na}^+$ . El anión se une a las proteínas por absorción no específica (aproximadamente una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos, con una relación SDS/proteína máximo de 1,4 g/g). El SDS desnatura por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie y todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa (que excede la carga intrínseca de las cadenas de aminoácidos). Las proteínas reaccionan con SDS a relativamente alta concentración, pero se ha demostrado que 0,4 % de SDS es el nivel mínimo necesario para saturar los sitios de unión de la proteína, sin embargo, se emplea 1 % para lograr un margen de seguridad.<sup>8</sup> El Rf es una medida convencional de la movilidad de la proteína relativa al frente de migración<sup>4</sup> y se define como la distancia desde el inicio del gel separador hasta el centro de cada banda dividida entre la distancia a la que ha migrado el ión líder. (GARCIA. 2000).

La concentración apropiada de SDS en el tampón superior, se determina incrementando la cantidad de SDS hasta que no exista variación en el Rf. Se ha demostrado que concentraciones en el rango de 0,02 a 0,025% de SDS en el tampón superior es suficiente, sin embargo se utiliza 0,03 % para obtener un margen de seguridad. (GARCIA. 2000).

El complejo SDS-proteína tiene forma de varilla con un diámetro aproximado de 18 Å y una longitud proporcional al peso molecular de la cadena polipeptídica. El tratamiento concomitante con un agente reductor de puentes bisulfuro, como el beta mercaptoetanol ( $\beta$  ME) o el DTT desnaturaliza las proteínas y las rompe en las subunidades que la componen. Por lo que el complejo SDS-proteína tiene generalmente mayor densidad de carga y menor tamaño que las proteínas nativas. Se ha determinado que con 5 min a 95-100°C es suficiente para la formación de enlaces estables SDS-proteína a una concentración de 1 % de SDS, en presencia de EDTA y condiciones reductoras. El complejo SDS-proteína, es estable durante 3 meses a 4°C. El SDS migra más rápido que el complejo proteína-SDS en un gel restrictivo, por lo que el SDS no es necesario adicionarlo en los geles si este está presente en la muestra y en el tampón superior, lo que da la ventaja de asegurar las condiciones y la eficiencia de polimerización de los geles sin SDS. (GARCIA. 2000).

La migración de los derivados proteína-SDS hacia al ánodo es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular ( $\log PM$ ). La relación carga/masa es aproximadamente igual para todas las proteínas de la muestra por lo que la talla de esta deviene en el factor determinante de la separación. El SDS-PAGE se emplea para estimar el peso molecular de las proteínas y se compara con un patrón. (GARCIA. 2000).

Las condiciones pueden ajustarse dependiendo de como se necesite separar las proteínas (en estado completamente desnaturizada, parcialmente desnaturizada o nativa). Las asociaciones covalentes entre las unidades de proteínas pueden mantenerse omitiendo el  $\beta$ ME del tampón de muestras. En ausencia de este agente

reductor los puentes bisulfuro intracatenarios e intercatenarios de la muestra de proteínas permanecen intactos; la movilidad electroforética del complejo SDS proteína se altera bajo estas condiciones de disociación y durante la electroforesis la movilidad de los oligómeros SDS proteínas es menor que con los componentes SDS polipéptidos completamente desnaturalizados. Las proteínas pueden mostrar una respuesta individual característica a la reducción, lo que se determina al comparar los geles corridos con  $\beta$ ME o sin este. Adicionalmente las proteínas no reducidas, pueden no estar del todo saturadas con SDS por lo que puede variar su relación peso/peso en su interacción con el detergente. Esto hace que las determinaciones de peso molecular con estas características no tengan la misma confiabilidad que el análisis hecho con polipéptidos del todo desnaturalizados. Es necesaria la existencia de patrones y proteínas conocidas de igual configuración para una comparación válida. (GARCIA. 2000).

El peso molecular (PM) de las proteínas puede determinarse en electroforesis al comparar las movilidades electroforéticas de varios marcadores de peso molecular conocido. Existen patrones (mezclas de proteínas de peso molecular conocido y que se tiñen uniformemente) de varios rangos de peso molecular, se debe aplicar el que abarque el peso molecular esperado para la proteína que se quiere determinar. Estos patrones deben ser tratados de manera similar a la muestra. En general, cuando las proteínas tienen gran cantidad de carbohidratos en su composición o cuando están unidas a complejos de membrana migran de manera aberrante, por lo que no son recomendadas como marcadores de peso molecular. (GARCIA. 2000).

Al realizar un ploteo del log PM de la proteína patrón como función del valor de Rf, se obtiene un gráfico ligeramente sigmoideo. El peso molecular desconocido puede estimarse por el análisis de regresión lineal o por interpolación en la curva del log de PM contra Rf. El ploteo de Ferguson del log de Rf contra el % T del gel separador para varias proteínas patrones chequea el error sistemático del método, para lo que es importante que estas proteínas muestren uniformidad en su densidad de carga, lo que se determina por la intercepción de sus líneas a 0 % T. Se obtiene un ploteo de Ferguson no lineal el fraccionamiento de pequeñas proteínas a una alta concentración

de gel o de proteínas muy grandes que dan valores de Rf muy pequeños. (GARCIA. 2000).

El coeficiente de retardación (Kr) da una medida de la influencia del tamizaje sobre la movilidad de las biomoléculas, se ha reportado que es función del peso molecular y existe inclusive para moléculas pequeñas. Los valores de Kr podrían minimizarse para todas las proteínas patrones por selección de valores bajos de C. Con el empleo del ploteo de Ferguson se pueden discriminar las diferencias de carga, el peso molecular y las formas de diferentes isómeros, así como determinar el peso molecular de estos; sin embargo se pueden encontrar dificultades técnicas cuando varios multímeros de proteínas se analizan. (GARCIA. 2000).

## **H. TÉCNICAS DE ANÁLISIS:**

### **1. Detección de GMP por Electroforesis:**

Para GALINDO, et al. 2006, y ALCÁZAR, et al. 1998, se debe utilizar 50 ml de cada muestra y del testigo. Luego, para la precipitación de proteínas se debe emplear 25 ml de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 24% en agitación constante durante 2 minutos a temperatura ambiente, dejándose en reposo durante 60 minutos; posteriormente recomiendan remover el precipitado de caseínas y sueroproteínas por filtración, utilizando papel filtro. Indican que se debe transferir 30 ml del filtrado TCA 8% y se añadir 8 ml de una solución TCA al 50% para precipitar las proteínas que no se hubieran desnaturalizado durante el paso anterior. Posteriormente las muestras se deben mantener a 4°C durante 24 horas para luego someterse a centrifugación en condiciones de 7000 r.p.m durante 10 minutos, obteniéndose un precipitado que debe ser lavado con 10 ml de una mezcla de etanol-éter 1:1, sometiéndose a una segunda centrifugación en las mismas condiciones y dejando luego drenar el tubo para eliminar los excesos de la mezcla del lavado. Señalan que una vez obtenido el precipitado se debe utilizar 380 µl de amortiguador 0.05 M TRIS-HCl + 1mM EDTA-Na<sub>2</sub> pH 7.2 y 500 µl de una solución de sacarosa al 50% y 0.002% de azul de bromofenol con el propósito de resuspenderlo; posteriormente las muestras se deben mantener en refrigeración hasta el momento de ser sometidas a la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS



0.375 M pH 8.8 a una concentración del 15% a un voltaje constante de 120v y 80 miliamperes durante 45 minutos, aproximadamente.

La visualización de las bandas de proteína se realizará mediante tinción de los geles con azul de Coomasue R-250 0.2% en metanol: ácido acético: agua (25: 10: 85) a temperatura ambiente, por un tiempo mínimo de 6 horas seguida por decoloración en una solución de metanol: ácido acético: agua (25: 10: 85). (ALCÁZAR, et al. 1998).

En las líneas se observará el perfil de proteínas de leche auténtica y leche adulterada.

En la muestra de leche se observará una zona muy coloreada y extensa entre 30 y 40 kDa, que corresponderá a la zona de las caseínas. El tratamiento con ATC permite precipitar el GMP, por lo tanto, en el PAGE-SDS- de la leche cruda (que no contiene glicomacropéptido) tratados con este ácido no se observará ninguna banda que corresponda con el GMP. (GALINDO, et al. 2006).

La banda de 20.9 kDa es la que corresponde al GMP, pues previamente se ha comparado suero dulce vs suero ácido, y se ha notado que son prácticamente idénticos a excepción de esta banda. (GALINDO, et al. 2006).

## **2. Pruebas físico-químicas:**

### ***2.1. Proteína de la leche: valoración de la proteína bruta (PB): método de KJELDAHL***

La NORMA INEN 16/84 establece que el método para la determinación de proteínas en leche lo se debe realizar en base al Método de Kjeldahl.

Según PALTRINIERI. 2001, la valoración de la proteína bruta por el método de KJELDAHL, se debe desarrollar de la siguiente manera:

#### Fundamento:

Transformación de las distintas formas de Nitrógeno presente en la muestra a forma amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ), mediante una digestión ácida y en caliente en presencia de un catalizador. El  $\text{NH}_4^+$  es posteriormente neutralizado a  $\text{NH}_3$ , mediante una base fuerte en exceso, y destilado por la acción del vapor. El amoniaco liberado es recogido en forma de  $\text{NH}_4^+$  mediante burbujeo del destilado en una disolución de ácido bórico que se valora posteriormente con una solución de ácido clorhídrico diluida de concentración conocida.

#### Material y aparatos:

- Pipeta para muestras de leche de 5 y 10 ml.
- Bloque digestor con termostato.
- Campana de extracción de gases y trompa de agua.
- Tubos de digestión de 250 ml.
- Destilador automático o semi-automático.
- Pipeta automática o dosificador para ácido de 15 ml
- Probeta de 100 ml

#### Reactivos:

- Acido Sulfúrico concentrado al 96% ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).
- Catalizador en pastillas de Cu-Se para Kjeldahl.
- Hidróxido sódico ( $\text{NaOH}$ ) al 35%.
- Acido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) al 1%.
- Acido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ) de factor y normalidad (0.05 ó 0.1 N) conocida.
- Indicador (verde de bromocresol y rojo de metilo).
- Agua destilada

#### Procedimiento completo de digestión, destilación y valoración:

##### a.- Digestión:

- Se debe Pipetear 5 ml de muestra y introducir en los tubos de digestión.
- Se añade 2 pastillas de catalizador.
- Se añade 15 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado.

- Para el ensayo en blanco, se opera de la misma manera sin añadir muestra.
- Se Coloca los tubos de digestión en el bloque digestor bajo campana de extracción de humos, y conectar la trompa de vacío y el extractor. Se ajusta la temperatura del bloque digestor a 420 °C y se digiere durante 90 min. Pasado este tiempo, sacar los tubos del digestor y dejar enfriar en una gradilla bajo la campana de extracción de gases.
- Añadir suavemente 70 ml de agua destilada a cada tubo antes de su destilación.

b.- Destilación - Valoración:

- Comprobar que el equipo esta listo para realizar la destilación y asegurar de que ha sido anotado el valor obtenido previamente.
- Abrir la trampa frontal del destilador, introduciendo el tubo de inyección de vapor en el tubo de digestión y ajustándolo a la boca de destilación. Cerrar la trampa frontal y comprobar que se realizó la descarga de la cantidad de NaOH en exceso previamente fijada (75 ml).
- Esperar hasta que se complete el volumen del vaso de valoración, para asegurar que se ha destilado todo el amonio contenido en la muestra, comprobando que se produce el viraje de color verde a rojo-grisáceo. El equipo debe detener automáticamente la destilación cuando se haya completado el volumen fijado de destilación.
- Anotar el volumen de HCl de la valoración y proceder a continuación a retirar la muestra analizada (utilizando un guante de protección para calor), levantando la trampa frontal del destilador. El equipo realiza la descarga automática del vaso de valoración.
- Vaciar suavemente el contenido del tubo de digestión en el contenedor de residuos, a fin de proceder a su tratamiento y evitar la contaminación de las aguas residuales con el catalizador Cu-Se.

Cálculos (Gráfico 2):

$$\% N = \frac{14.01 \times (V - b) \times N \times f \times 100}{m \times 1000}$$

Donde:

14.01 = Peso atómico del Nitrógeno.

V = Volumen de HCl para la muestra en ml.

b = Volumen de HCl para el blanco en ml.

N = Normalidad del HCl.

f = factor de corrección de la normalidad del HCl.

6.38 = factor Kjeldahl (15.67% de N en la proteína láctea).

m = volumen de muestra (ml)

## **2.2. Grasa de la leche: Método de Gerber**

La NORMA INEN 12/73 establece que el método para la determinación del contenido de grasa en leche se lo debe realizar en base al Método Gerber.

Según PALTRINIERI. 2001, la valoración de materia grasa en leche fluida por el método de Gerber, se debe desarrollar de la siguiente manera:

Se debe utilizar un butirómetro para leche y ácido sulfúrico Gerber. El H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Gerber = 1,82 g/ml, se preparó con 94,2 ml de ácido sulfúrico concentrado (d = 1,84) y 5,8 ml de agua destilada.

Medir con pipeta 10 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Gerber e introducir en un butirómetro para leche, cuidando de no mojar las paredes internas del cuello. Agregar con rapidez 11 ml de leche medidos con pipeta de doble aforo, de manera que forme una capa sobre el ácido sin mezclarse con éste. Agregar inmediatamente 1 ml de alcohol amílico y tapar con el tapón correspondiente. Se toma el butirómetro con un paño seco sujetando el tapón y agitando por inversión suave. Se verifica que estaba bien tapado y se coloca en un baño de agua a

65-70 °C durante 5 a 10 minutos con el tapón hacia abajo. Se retira del baño, se seca y se centrifuga en la centrífuga especial con los tapones hacia afuera. Se lleva nuevamente a baño de agua durante aproximadamente 5 minutos hasta que alcanza la temperatura del agua (65-70 °C) y se lee de inmediato el volumen de fase grasa separada en la parte superior graduada del butirómetro.

El volumen leído corresponde directamente al porcentaje de grasa en la leche.

### **2.3. Densidad de la leche**

La NORMA INEN 11/84 establece que el método para la determinación del contenido de densidad en leche se lo debe realizar en base al Método del lactodensímetro.

Según PALTRINIERI. 2001, la densidad de la leche se determina utilizando un lactodensímetro contrastado a una temperatura determinada (15°C) en comparación con el agua.

#### **MATERIAL**

- Probeta transparente de 100 mL.
- Lactodensímetro Quevenne.
- Termómetro.

#### **PROCEDIMIENTO**

Se coloca en la probeta la leche procediendo de manera cuidadosa para impedir la formación de espuma. Se introduce el lactodensímetro de forma que la leche rebose de la probeta para evitar una posible formación de espuma que dificulte la lectura y se mide la temperatura de la leche teniendo en cuenta que ésta siempre debe permanecer entre 13 y 18°C.

### **2.4. pH de la leche:**

La determinación del pH se realiza por lectura directa introduciendo el electrodo de un pHmetro, previamente ajustado con tampones de pH conocido 4,00 y 7,00, en la leche,

la cual fue calentada y homogeneizada a 40 °C para dispersar la materia grasa y posteriormente enfriada a 20°C.

### **3. Pruebas microbiológicas:**

#### ***3.1 Prueba de la reductasa:***

La NORMA INEN 18/73 establece que el método para el ensayo de reductasa en leche se lo debe realizar en base al Método del azul de metileno.

Según PALTRINIERI. 2001, la prueba de la reductasa se debe desarrollar de la siguiente manera:

En un tubo de ensayo, grande y estéril, se vierte asépticamente 20 ml de muestra y 1 ml de solución de azul de metileno (obtenida por mezcla de 5 ml de su solución alcohólica saturada con 195 ml de agua). Se tapa el tubo y se calienta por 5 minutos a 37°C, luego se invierte varias veces para asegurar la distribución uniforme de la crema y se incuba a 37°-38°C en posición vertical, invirtiendo cada media hora y protegiendo de la luz solar. Se mide el tiempo desde que se inicia la incubación hasta que por lo menos los 4/5 de la leche se han descolorado. La leche cruda y la pasteurizada deben resistir más de 5½ horas sin descolorarse y la destinada a la pasteurización, por lo menos 3 horas.

#### ***3.2 Prueba de lactofermentación:***

Según PALTRINIERI. 2001, la prueba de lactofermentación es una prueba muy importante y sencilla ya que proporciona datos sobre la calidad al mismo tiempo que revela el grado de contaminación y las cualidades sanitarias de la leche. Pone de manifiesto la producción gaseosa, la escasa coagulación, la descomposición pútrida y demás alteraciones de la leche.

La prueba de lactofermentación consiste en incubar la muestra en tubos de ensayo a 34-37°C durante 24 a 36 horas. Al cabo de ese tiempo se interpretó los resultados de la siguiente manera:

- Leche de buena calidad bacteriológica: No coagula a las 12 horas de incubación ni habrá gran separación de suero. Tras 24 horas tendrá olor y sabor ácidos, el coágulo será homogéneo, sin fisuras ni grietas, blanco, firme, sin burbujas o en muy escasa cantidad.
- Leches sospechosas o de mala calidad:
  - Leche no coagulada: Pasadas 24 horas de incubación la leche sigue líquida: presencia de antibióticos o de inhibidores (sustancias químicas, detergentes, pesticidas en el establo, etc.)
  - Fermentación gaseosa: Coágulo con numerosas burbujas y surcos gaseosos causado por bacterias coliformes, aerogenes, etc. Leche ordeñada y conservada en malas condiciones higiénicas. Leches refrigeradas largo tiempo (> 48 horas).
  - Cuajada en forma de grumos: Suero blancuzco, amarillento o de otros colores anormales. Fermentación producida por gérmenes proteolíticos que suelen originar sabores amargos y olores nauseabundos. Leches mamíticas, de final de lactación y leches refrigeradas largo tiempo (> 48 horas).

#### **4. Pruebas organolépticas (sabor, color y olor):**

Finalidad: Señalar a la leche alterada sensorialmente y etiquetarla como leche no apta para el consumo o leche fraudulenta.

*Color:*

Color: Blanco a blanco-amarillento.

- Leche blanca-amarillenta (leche entera).
- Leche blanca-azulada (leche descremada).

Colores anormales:

- Color rojo (calostros, presencia de sangre, crecimiento de *Serratia marcescens* y/o *Bacillus lactis erythrogenes*).
- Color amarillo (crecimiento de *Pseudomonas synxantha*).
- Color azul (crecimiento de *Pseudomonas cyanogenes*).

Olor y sabor:

- Específico a leche.
- Resultado de acción de sustancias sápidas: lactosa, sal, componentes minoritarios.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO**

El análisis de esta investigación se realizó en TESTFARM Laboratorio Agropecuario Ambiental Cía. Ltda.

El Laboratorio se encuentra ubicado en Santo Domingo de los Tsáchilas, en las calles Río Cochambí Mz 610, Lote 20 y Río Yanuncay,

Cantón: Santo Domingo de Tsáchilas

Cabecera cantonal: Santo Domingo

Ubicación: Provincia de Santo Domingo de Tsáchilas

Altura: 625 msnm

Coordenadas: 0° 14'

La duración del experimento fue de un mes.

#### **B. UNIDADES EXPERIMENTALES**

En la presente investigación se utilizó leche de funda de una sola casa comercial y del suero de quesería de la planta de lácteos del sector, haciendo 4 adulteraciones a concentraciones diferentes y una testigo con leche entera (5 muestras), durante un día por cada semana (4 lunes), dándonos un total de 20 unidades experimentales, tomando en consideración que cada unidad experimental corresponde a aproximadamente 5 litros de leche fresca y 5 litros de suero de quesería

#### **C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES**

- Leche fresca y suero de quesería.
- Recipientes de plásticos de capacidad 1 litros y con tapa rosca para cerrado. Las mismas poseen la etiqueta respectiva con el código de la leche.

- Recipientes de plásticos de capacidad 1 litros y con tapa rosca para cerrado. Las mismas poseen la etiqueta respectiva con el código del suero.
- Hoja de muestreo.
- Esferográfico.
- Computador para tabular la información.
- Hoja para muestreo de leche (Ver Anexo I)
- Hoja para muestreo del suero (Ver Anexo II)
- Hoja para muestras adulteradas (Ver Anexo III)
- Equipo de electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS).
- Ácido acético.
- Solución ATC al 24% y 50%.
- Papel filtro.
- Mezcla de etanol-éter 1:1.
- Buffer TRIS-HCl 0.05 M
- EDTA – Na<sub>2</sub>.
- Centrífuga
- Sacarosa al 50%
- Azul de bromofenol
- SDS.
- Probeta de 500 ml.
- Cooler para transporte de muestras.
- Tubos de ensayo
- Pipeta de 10 ml
- Azul de metileno para prueba de la reductasa.
- Incubadora para prueba de la reductasa y lactofermentación.
- TESTFARM Laboratorio Agropecuario Ambiental Cía. Ltda.

#### **D. TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL**

Tratamientos en estudio:

- T0: Leche fresca sin adulteración
- T1: Leche adulterada con 1% de suero
- T2: Leche adulterada con 5% de suero
- T3: Leche adulterada con 10% de suero
- T4: Leche adulterada con 15% de suero

Se utilizaron cuatro concentraciones de adulteración de leche con suero frente a un control y 4 repeticiones por tratamiento, por tanto la presente investigación se analizó bajo un Diseño Completamente al Azar, el mismo que se ajusta al siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$ : parámetro a evaluar

$\mu$ : la media general

$T_i$ : efecto de las adulteraciones

$\epsilon_{ij}$ : efecto del error experimental

Cuadro 2. ESQUEMA DEL EXPERIMENTO.

Niveles de suero de leche	Código	Repeticiones	TUE*	TUE/Tratamiento
Control	T0	4	1	4
1 %	T1	4	1	4
5 %	T2	4	1	4
10 %	T3	4	1	4
15 %	T4	4	1	4
Total				20

\* Tamaño de la Unidad Experimental.

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

## E. MEDICIONES EXPERIMENTALES

Las variables que se evaluaron son:

Determinación de la adulteración de la leche mediante el método empleado.

Características físico químicas: proteína, grasa, pH y densidad.

Características microbiológicas: reductasa y lactofermentación.

Características organolépticas: color, olor y sabor.

## F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA

- Las características físico químicas y microbiológicas se evaluaron mediante el Análisis de varianza y separación de medias según Duncan al 5%.
- Las características organolépticas se analizaron mediante Rating Test.

Cuadro 3. ESQUEMA DEL ADEVA.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	
Total	$tr - 1$	19
Niveles de suero (%)	$t - 1$	4
Error	Diferencia	15

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

## G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En 4 recipientes de plástico completamente limpios y con capacidad de 1 litro cada uno, se realizaron las siguientes adulteraciones de la leche:

- 1er. recipiente: 990 ml de leche fresca + 10 ml de suero de leche (1%).
- 2do. recipiente: 950 ml de leche fresca + 50 ml de suero de leche (5%).
- 3er. recipiente: 900 ml de leche fresca + 100 ml de suero de leche (10%).
- 4to. recipiente: 850 ml de leche fresca + 150 ml de suero de leche (15%).

## H. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN

### 1. Detección de suero en la leche por PAGE-SDS

Se uso leche fresca libre de suero, obtenida de una marca comercial, como control negativo.

Se prepara muestras de suero-leche en las siguientes proporciones: 1; 5; 10; y 15% de adulteración. El suero utilizado para preparar las mezclas con leche fue previamente calentado a 80°C por 10 minutos para eliminar cualquier actividad residual de la quimosina en el suero.

Se utiliza 50 ml de cada muestra y del testigo. Luego, para la precipitación de proteínas se emplearon 25 ml de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 24% en agitación constante durante 2 minutos a temperatura ambiente, dejándose en reposo durante 60 minutos; posteriormente se removió el precipitado de caseínas y sueroproteínas por filtración, utilizando papel filtro. Se transfirieron 30 ml del filtrado TCA 8% y se añadieron 8 ml de una solución TCA al 50% para precipitar las proteínas que no se hubieran desnaturalizado durante el paso anterior. Posteriormente las muestras fueron mantenidas a 4°C durante 24 horas para luego someterse a centrifugación en condiciones de 7000 r.p.m durante 10 minutos, obteniéndose un precipitado que fue lavado con 10 ml de una mezcla de etanol-éter 1:1, sometiéndose a una segunda centrifugación en las mismas condiciones y dejando luego drenar el tubo para eliminar los excesos de la mezcla del lavado. Una vez obtenido el precipitado se utilizaron 380 µl de amortiguador 0.05 M TRIS-HCl + 1mM EDTA-Na<sub>2</sub> pH 7.2 y 500 µl de una solución de sacarosa al 50% y 0.002% de azul de bromofenol con el propósito de resuspenderlo; posteriormente las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de ser sometidas a la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS 0.375 M pH 8.8 a una concentración del 15% a un voltaje constante de 120v y 80 miliamperes durante 45 minutos, aproximadamente.

La visualización de las bandas de proteína se realizaron mediante tinción de los geles con azul de Coomasue R-250 0.2% en metanol: ácido acético: agua (25: 10: 85) a temperatura ambiente, por un tiempo mínimo de 6 horas seguida por decoloración en una solución de metanol: ácido acético: agua (25: 10: 85).

En las líneas se observaron el perfil de proteínas de leche auténtica y leche adulterada.

En la muestra de leche se observo una zona muy coloreada y extensa entre 30 y 40 kDa, que corresponde a la zona de las caseínas.

El tratamiento con ATC permite precipitar el GMP, por lo tanto, en el PAGE-SDS- de la leche cruda (que no contiene glicomacropéptido) tratados con este ácido no se observo ninguna banda que corresponda con el GMP.

La banda de 20.9 kDa es la que corresponde al GMP, pues previamente se ha comparado suero dulce vs suero ácido, y se ha notado que son prácticamente idénticos a excepción de esta banda.

## **2. Prueba de reductasa**

En un tubo de ensayo, grande y estéril, se vertieron asépticamente 20 ml de muestra y 1 ml de solución de azul de metileno (obtenida por mezcla de 5 ml de su solución alcohólica saturada con 195 ml de agua). Se tapó el tubo y se calentó por 5 minutos a 37°C, luego se invirtió varias veces para asegurar la distribución uniforme de la crema y se incubó a 37°-38°C en posición vertical, invirtiendo cada media hora y protegiendo de la luz solar. Se midió el tiempo desde que se inicia la incubación hasta que por lo menos los 4/5 de la leche se han descolorado. La leche cruda y la pasteurizada deben resistir más de 5½ horas sin descolorarse y la destinada a la pasteurización, por lo menos 3 horas.

### 3. Prueba de lacto fermentación

Es una prueba muy importante y sencilla ya que proporciona datos sobre la calidad al mismo tiempo que revela el grado de contaminación y las cualidades sanitarias de la leche. Pone de manifiesto la producción gaseosa, la escasa coagulación, la descomposición pútrida y demás alteraciones de la leche.

La prueba de lactofermentación consistió en incubar la muestra en tubos de ensayo a 34-37°C durante 24 a 36 horas. Al cabo de ese tiempo se interpretó los resultados de la siguiente manera:

- Leche de buena calidad bacteriológica: No coagula a las 12 horas de incubación ni habrá gran separación de suero. Tras 24 horas tendrá olor y sabor ácidos, el coágulo será homogéneo, sin fisuras ni grietas, blanco, firme, sin burbujas o en muy escasa cantidad.
  
- Leches sospechosas o de mala calidad:
  - Leche no coagulada: Pasadas 24 horas de incubación la leche sigue líquida: presencia de antibióticos o de inhibidores (sustancias químicas, detergentes, pesticidas en el establo, etc.)
  
  - Fermentación gaseosa: Coágulo con numerosas burbujas y surcos gaseosos causado por bacterias coliformes, aerogenes, etc. Leche ordeñada y conservada en malas condiciones higiénicas. Leches refrigeradas largo tiempo (> 48 horas).
  
  - Cuajada en forma de grumos: Suero blancuzco, amarillento o de otros colores anormales. Fermentación producida por gérmenes proteolíticos que suelen originar sabores amargos y olores nauseabundos. Leches mamíticas, de final de lactación y leches refrigeradas largo tiempo (> 48 horas).

#### 4. Pruebas fisicoquímicas

##### a. Proteína de la leche

###### **Fundamento:**

Transformación de las distintas formas de Nitrógeno presente en la muestra a forma amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ), mediante una digestión ácida y en caliente en presencia de un catalizador. El  $\text{NH}_4^+$  es posteriormente neutralizado a  $\text{NH}_3$ , mediante una base fuerte en exceso, y destilado por la acción del vapor. El amoniaco liberado es recogido en forma de  $\text{NH}_4^+$  mediante burbujeo del destilado en una disolución de ácido bórico que se valora posteriormente con una solución de ácido clorhídrico diluida de concentración conocida.

###### **Material y aparatos:**

- Pipeta para muestras de leche de 5 y 10 ml.
- Bloque digestor con termostato.
- Campana de extracción de gases y trompa de agua.
- Tubos de digestión de 250 ml.
- Destilador automático o semi-automático.
- Pipeta automática o dosificador para ácido de 15 ml
- Probeta de 100 ml

###### **Reactivos:**

- Acido Sulfúrico concentrado al 96% ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).
- Catalizador en pastillas de Cu-Se para Kjeldahl.
- Hidróxido sódico ( $\text{NaOH}$ ) al 35%.
- Acido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) al 1%.
- Acido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ) de factor y normalidad (0.05 ó 0.1 N) conocida.



- Indicador (verde de bromocresol y rojo de metilo).
- Agua destilada

Procedimiento completo de digestión, destilación y valoración:

### **Digestión:**

- Se Pipeteó 5 ml de muestra y se introdujo en los tubos de digestión.
- Se añadió 2 pastillas de catalizador.
- Se añadió 15 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.
- Para el ensayo en blanco, se operó de la misma manera sin añadir muestra.
- Se Colocó los tubos de digestión en el bloque digestor bajo campana de extracción de humos, y se conectó la trompa de vacío y el extractor. Se ajustó la temperatura del bloque digestor a 420 oC y se digirió durante 90 min. Pasado este tiempo, se sacó los tubos del digestor y se dejó enfriar en una gradilla bajo la campana de extracción de gases.
- Se añadió suavemente 70 ml de agua destilada a cada tubo antes de su destilación.

### **Destilación - Valoración:**

- Se Comprobó que el equipo estaba listo para realizar la destilación y se aseguró de que ha sido anotado el valor obtenido previamente.
- Se abrió la trampa frontal del destilador, introduciendo el tubo de inyección de vapor en el tubo de digestión y ajustándolo a la boca de destilación. Se cerró la trampa frontal y se comprobó que se realizó la descarga de la cantidad de NaOH en exceso previamente fijada (75 ml).
- Se esperó hasta que se completó el volumen del vaso de valoración, para asegurar que se ha destilado todo el amonio contenido en la muestra, comprobando que se produce el viraje de color verde a rojo-grisáceo. El equipo debe detener automáticamente la destilación cuando se haya completado el volumen fijado de destilación.

- Se anotó el volumen de HCl de la valoración y se procedió a continuación a retirar la muestra analizada (utilizando un guante de protección para calor), levantando la trampa frontal del destilador. El equipo realizó la descarga automática del vaso de valoración.
- Se vació suavemente el contenido del tubo de digestión en el contenedor de residuos, a fin de proceder a su tratamiento y evitar la contaminación de las aguas residuales con el catalizador Cu-Se.

$$\% N = \frac{14.01 \times (V - b) \times N \times f \times 100}{m \times 1000}$$

**Donde:**

14.01 = Peso atómico del Nitrógeno.

V = Volumen de HCl para la muestra en ml.

b = Volumen de HCl para el blanco en ml.

N = Normalidad del HCl.

f = factor de corrección de la normalidad del HCl.

6.38 = factor Kjeldahl (15.67% de N en la proteína láctea).

m = volumen de muestra (ml)

**b. Grasa de la leche**

Método de Gerber

Materia grasa en leche fluida

Se utilizó un butirómetro para leche y ácido sulfúrico Gerber. El H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Gerber = 1,82 g/ml, se preparó con 94,2 ml de ácido sulfúrico concentrado (d = 1,84) y 5,8 ml de agua destilada.

Se midió con pipeta 10 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Gerber y se introdujo en un butirómetro para leche, cuidando de no mojar las paredes internas del cuello. Se agregó con rapidez 11 ml de leche medidos con pipeta de doble aforo, de manera que formó una capa sobre el ácido sin mezclarse con éste. Se agregó inmediatamente 1 ml de alcohol amílico y se tapó con el tapón correspondiente. Se tomó el butirómetro con un paño seco sujetando el tapón y agitando por inversión suave. Se verificó que estaba bien tapado y se colocó en un baño de agua a 65-70 °C durante 5 a 10 minutos con el tapón hacia abajo. Se retiró del baño, se secó y se centrifugó en la centrifuga especial con los tapones hacia afuera. Se llevó nuevamente a baño de agua durante aproximadamente 5 minutos hasta que alcanzó la temperatura del agua (65-70 °C) y se leyó de inmediato el volumen de fase grasa separada en la parte superior graduada del butirómetro. El volumen leído correspondió directamente al porcentaje de grasa en la leche.

#### **c. pH de la Leche**

La determinación del pH se realizó por lectura directa introduciendo el electrodo de un pHmetro, previamente ajustado con tampones de pH conocido 4,00 y 7,00, en la leche, la cual fue calentada y homogeneizada a 40°C para dispersar la materia grasa y posteriormente enfriada a 20°C.

#### **d. Densidad de la leche**

La densidad de la leche se determinó utilizando un lactodensímetro contrastado a una temperatura determinada (15°C) en comparación con el agua.

### **Material**

- Probeta transparente de 100 mL.
- Lactodensímetro Quevenne.
- Termómetro.

## **Procedimiento**

Se colocó en la probeta la leche procediendo de manera cuidadosa para impedir la formación de espuma. Se introdujo el lactodensímetro de forma que la leche rebose de la probeta para evitar una posible formación de espuma que dificulte la lectura y se midió la temperatura de la leche teniendo en cuenta que ésta siempre debe permanecer entre 13 y 18°C. La lectura se realizó en grados Quevenne.

### **5. Pruebas organolépticas**

Finalidad: Señalar a la leche alterada sensorialmente y etiquetarla como leche no apta para el consumo o leche fraudulenta.

#### **Color:**

Color: Blanco a blanco-amarillento.

Leche blanca-amarillenta (leche entera).

Leche blanca-azulada (leche descremada).

Colores anormales:

Color rojo (calostros, presencia de sangre, crecimiento de *Serratia marcescens* y/o *Bacillus lactis erythrogenes*).

Color amarillo (crecimiento de *Pseudomona synxantha*).

Color azul (crecimiento de *Pseudomona cyanogenes*).

#### **Olor y sabor:**

Específico a leche.

Resultado de acción de sustancias sápidas: lactosa, sal, componentes minoritarios.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **A. GLUCOMACROPÉPTIDO EN LA LECHE (GMP)**

La presencia de Glucomacropéptido en la leche del tratamiento control fue negativo, mientras que en las leches en la cual se aplicó los diferentes niveles de suero está presente este elemento debido a que este compuesto nos permite identificar la presencia de suero en la leche el mismo que según Alcázar, C., et al. (1998) reporta que esta sustancia se libera al entrar la leche en contacto con la enzima renina que actúa sobre la caseína kappa de la leche, y se convierte las micelas de la caseína en susceptibles a la formación de agregados, lo cual constituye el proceso de elaboración del queso. Puesto que esta enzima elimina el enlace fenilalanina-metionina (105-106) de la caseína kappa, liberando la para-kappa caseína y el péptido mencionado anteriormente, este último no es posible encontrarlo en forma libre en la leche a menos que esta contenga suero adicionado.

Galindo, et al. 2006, indica que el aislamiento del GMP mediante precipitación con ácido tricloroacético (ATC) seguido de electroforesis en gel de poliacrilamida doceilsulfato de sodio (PAGE-SDS) es utilizado para detectar la presencia del GMP en leches adulteras con suero de quesería. Desde este punto de vista se puede mencionar que la leche del tratamiento control definitivamente no dispone de esta sustancia, lo que no ocurre cuando se utiliza suero de leche en la leche, además se puede mencionar que cuando se utiliza una proporción alta de suero de leche, este al encontrarse a temperaturas adecuadas para la coagulación, esta provoca este fenómeno puesto que en la estructura del suero se disponen de enzimas coagulantes que hacen posible la obtención del queso.

A través de este método se puede determinar que la adulteración de la leche con suero es evidente y que si se propicia las condiciones adecuadas y tiempos necesarios además de las dosis de suero se corre, el riesgo es que la leche se coagule, factor que influye negativamente cuando se comercializa leche adulterada con suero.

Cuadro 4. COMPORTAMIENTO FÍSICO QUÍMICO, MICROBIOLÓGICO Y ORGANOLÉPTICO DE LA LECHE INCLUIDA CUATRO NIVELES DE SUERO DE LECHE (1, 5, 10 Y 15 %).

Variables	Niveles de suero de leche										CV		
	Control	1%	5%	10%	15%	%	Media	Sign					
GMP	1.00	b	2.00	a	2.00	a	2.00	a	2.00	a	0.12	1.80	*
Proteínas (%)	3.28	a	3.20	a	3.20	a	3.30	a	3.20	a	2.36	3.24	Ns
Grasa (%)	3.90	a	3.88	a	3.88	a	3.80	a	3.83	a	1.38	3.86	Ns
Ph	6.68	ab	6.73	a	6.70	a	6.63	bc	6.60	c	0.58	6.67	**
Densidad	1.033	a	1.033	a	1.033	a	1.032	a	1.032	a	0.04	1.033	Ns
Prueba de la reductasa (h)	4.07	a	3.99	b	3.91	c	3.88	c	3.86	c	1.12	3.94	**
Prueba de lactofermentación (h)	12.00	a	12.00	a	12.00	a	12.00	a	12.00	a	0.00	12.00	Ns
Color (puntos)	5.00	a	4.91	a	4.84	a	4.50	b	4.13	c	2.03	4.68	**
Sabor (puntos)	4.99	a	4.90	a	4.83	a	4.49	b	4.12	c	2.04	4.67	**
Olor (puntos)	4.97	a	4.88	a	4.81	a	4.47	b	4.10	c	2.04	4.65	**
Total	14.96	a	14.69	ab	14.49	ab	13.46	b	12.34	b	2.04	13.99	**

Letras iguales no difieren significativamente según Duncan al 5 %.

CV %: Coeficiente de variación.

Ns: No existe diferencias significativas ( $P > 0.05$ ).

\*: Diferencias significativas ( $P > 0.05$ ).

\*\* : Diferencias altamente significativas ( $P > 0.05$ ).

Fuente: El Autor.

Elaboración: El Autor.

## B. ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DE LA LECHE

### 1. Contenido de Proteína, %

La proteína de la leche obtenida en la presente investigación en promedio se registró 3.24 % y un coeficiente de variación de 2.36 %, al realizar el análisis de varianza se pudo determinar que no se determinó diferencias estadísticas entre los tratamientos.

Cuadro 5. PARÁMETROS DE LOS PORCENTAJES DE PROTEÍNA VS LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

<b>% DE PROTEÍNA</b>	<b>AUTOR/AÑO</b>	<b>OBTENIDO EN PROMEDIO</b>	<b>OBSERVACIONES</b>
MIN. 2,9	INEN/16-84	3,24%	El resultado obtenido está dentro de los parámetros.
3,7	ALVIAR/2010		El resultado obtenido está dentro de los parámetros.
2,8 - 3,5	VILLEGAS/2003		El resultado obtenido está dentro de los parámetros.
3 - 3,5	AL. SANA/2007		El resultado obtenido está dentro de los parámetros.
3	CARRIÓN/2008		El resultado obtenido está dentro de los parámetros.
3,2	MEYER/1997		El resultado obtenido está dentro de los parámetros.
2,9 - 5,6	SILVA/1998		El resultado obtenido está dentro de los parámetros.

Elaboración: El Autor.

Para Meyer, (1997), la leche de vaca debe poseer 3.2 % de proteína y Alviar, J. (2010), reporta que esta leche debe poseer 3.7 % de compuesto bromatológico, por lo que se puede señalar que el contenido de proteína en el presente estudio se encuentra dentro de los estimados por los autores en mención.

De la misma manera señala Carrión, A. (2008), que la proteína de la leche está conformada por tres grupos: la caseína en un 3%, la lactoalbúmina en un 0,5% y la lactoglobulina en un 0,05%. En ellas se encuentran presentes más de veinte aminoácidos dentro de los cuales están todos los esenciales. La caseína a su vez está compuesta por tres tipos de caseína, la k-caseína, la b-caseína y la a caseína.

<http://www.alimentacion-sana.com.ar/informaciones/novedades/compresano.htm>. 2007, reporta que la leche contiene de 3 - 3,5 % de proteínas, distribuida en caseínas, proteínas solubles o seroproteínas y sustancias nitrogenadas no proteicas. Son capaces de cubrir las necesidades de aminoácidos del hombre y presentan alta digestibilidad y valor biológico. Además del papel nutricional, se ha descrito su papel potencial como factor y modulador del crecimiento.

## 2. Contenido de grasa, %

La leche incluida suero de leche en promedio registró 3.86 % de grasa y un coeficiente de variación de 1.38 %, al realizar el análisis de varianza no se determinó diferencias significativas entre los diferentes niveles de suero de leche en la leche adulterada.

Cuadro 6. PARÁMETROS DE LOS PORCENTAJES DE GRASA VS LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

<b>% DE GRASA</b>	<b>AUTOR/AÑO</b>	<b>OBTENIDO EN PROMEDIO</b>	<b>OBSERVACIONES</b>
MIN. 3,2	INEN/12-73	3,86%	El resultado obtenido está dentro de los parámetros.
3,5 - 6,1	ALVIAR/2002		El resultado obtenido está dentro de los parámetros.
2,2 - 2,98	CARRIÓN/2008		No coincide con lo obtenido.
3,7	MEYER/1997		El resultado obtenido está dentro de los parámetros.
2,5 - 6,0	SILVA/1998		El resultado obtenido está dentro de los parámetros.

Elaboración: El Autor.



Carrión, A. (2008) señala el contenido de grasa de la leche se encuentra entre 2.20 y 2.98, sin embargo Alviar, C. (2002), reporta que la grasa es uno de los constituyentes de la leche más importante en la industria lechera, como control de calidad, ya que con ella se puede obtenerse una estimación de posibles fraudes de aguado. Así mismo, de la separación de la grasa de la leche, por acción de gravedad, o con la ayuda de equipos apropiados. De la misma manera menciona que la grasa de la leche absorbe con facilidad olores que le rodean y por ello nunca debe ser almacenada con alimentos que despidan olores, asimismo señala que la grasa se encuentra entre 3.5 y 6.1 % de grasa y esta depende en gran medida del grupo genético de los animales además de la calidad de los alimentos.

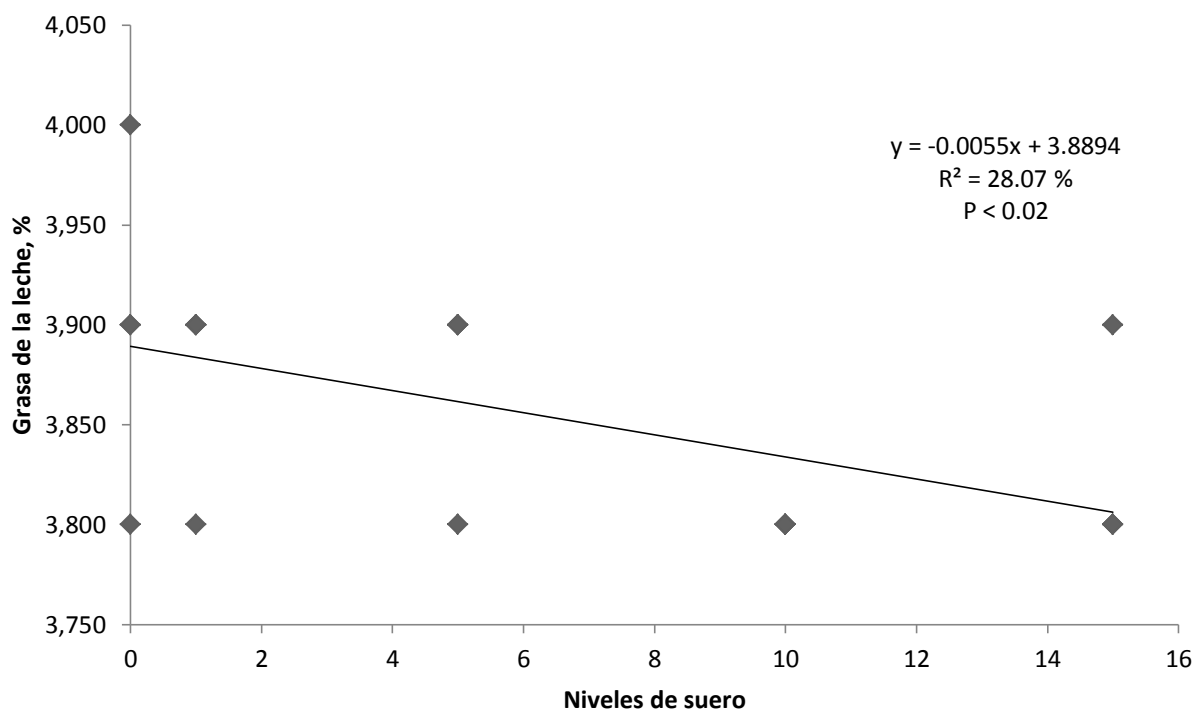


Gráfico 1. Contenido de grasa de la leche bajo el efecto de la aplicación de diferentes niveles de suero de leche.

Para Meyer, (1997), el contenido de grasa de la leche de vaca es de 3.7 %, valores que se encuentran dentro de los encontrados en la presente investigación.

Al analizar el Gráfico 1, el contenido de grasa está relacionado significativamente ( $P < 0.02$ ) de los niveles de suero de leche, de esta manera se puede mencionar que el 28.07 % de grasa de la leche depende de la inclusión de suero de leche y por cada porcentaje de inclusión de suero de leche, el porcentaje de grasa se reduce en 0.005 % de grasa.

### 3. pH de la leche

El pH de la leche incluida suero de leche en promedio fue de 6.67 que corresponde a una leche neutra y un coeficiente de variación de 0.58 %, al someter los resultados experimentales al análisis de varianza se pudo determinar que existe diferencias significativas entre los diferentes niveles de suero de leche.

Cuadro 7. PARÁMETROS DEL pH VS LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

pH	AUTOR/AÑO	OBTENIDO EN PROMEDIO	OBSERVACIONES
6,5 -6,6	ALVIAR/2010	6,67	El resultado es cercano a los parámetros.
6,6	MEYER/1997		El resultado es cercano a los parámetros.
6,6 - 6,7	SILVA/1998		El resultado es cercano a los parámetros.

Elaboración: El Autor.

La utilización de 1 y 5 % de suero de leche permitió registrar 6.73 y 6.70 de pH, los cuales difieren significativamente del resto de niveles de suero de leche, principalmente del 15 % de suero de leche con el cual se alcanzo 6.60 de pH que corresponde a una leche neutra.

Según Alviar, J. (2010), reporta que el pH varía de la leche normal varía en 6.5 – 6.6; según los resultados obtenidos en la presente investigación, se puede manifestar que este pH es más elevado, esto quizá se deba a otros factores que influyen a que la leche tienda a neutralizar.

En el gráfico 2, se determina que el pH de la leche está relacionado significativamente de los niveles de suero de leche incluida en la leche entera y el 49.98 % de pH depende de la aplicación de suero de leche y por cada porcentaje de inclusión de suero de leche en la leche entera, el pH de la leche se reduce en 0.007, ósea que a medida que se incluye el suero de leche, la leche tiende a la acidificación.

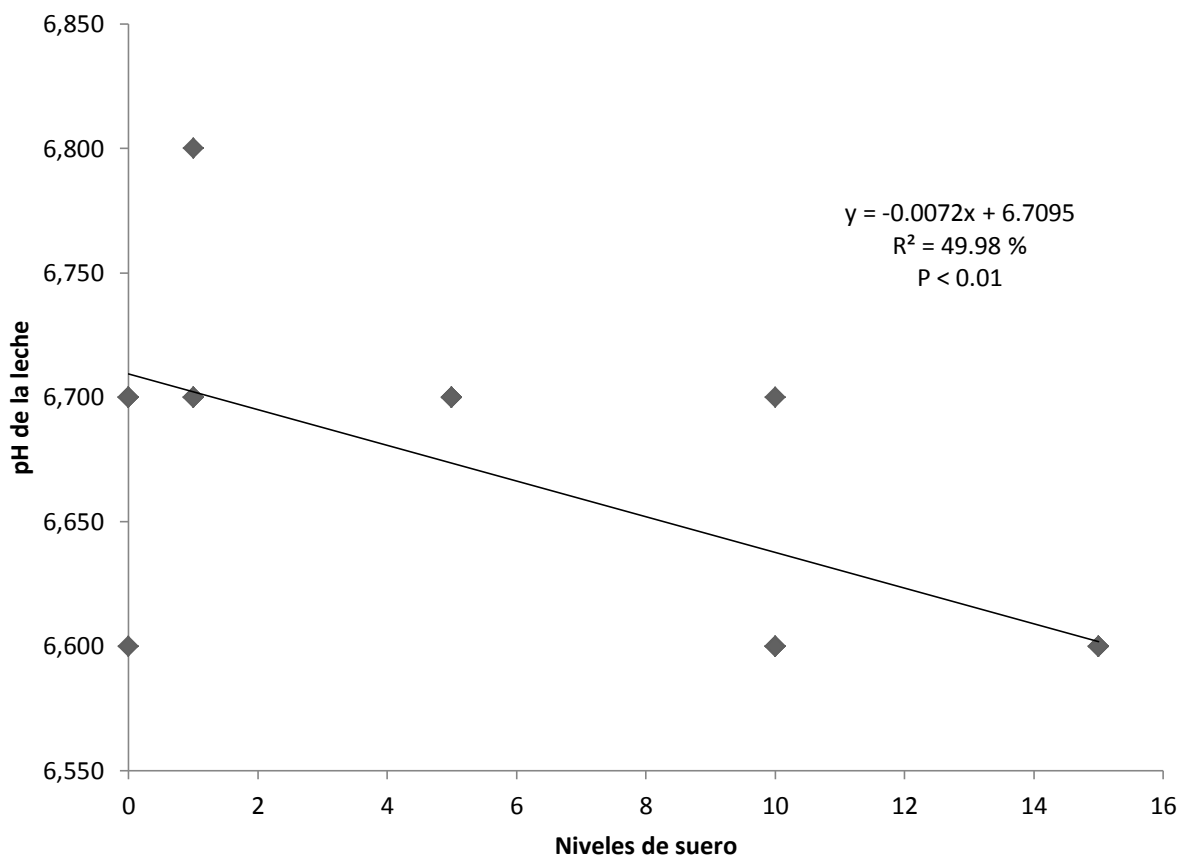


Gráfico 2. pH de la leche bajo el efecto de la aplicación de diferentes niveles de suero de leche.

#### 4. Densidad de la leche

En promedio, la densidad de la leche incluida suero de leche registró 1.033 con un coeficiente de variación de 0.04 %, al someter los resultados experimentales al análisis de varianza se pudo determinar que no se observó diferencias significativas entre los tratamientos.

Cuadro 8. PARÁMETROS DE DENSIDAD VS LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

DENSIDAD (g/ml)	AUTOR/AÑO	OBTENIDO EN PROMEDIO	OBSERVACIONES
1,026 -1,032	INEN/11-84	1,033%	El resultado es cercano a los parámetros.
1,030	MEYER/1997		El resultado es cercano a los parámetros.
1,028 - 1,034	SILVA/1998		El resultado obtenido está dentro de los parámetros.

Elaboración: El Autor.

Según Silva (2008), la leche en las diferentes haciendas reportó densidades entre 1.028 – 1.034 valor inferior a las registradas en la presente investigación, pudiendo deberse quizá a la temperatura a la cual se analizaron este producto, el cual influye determinadamente.

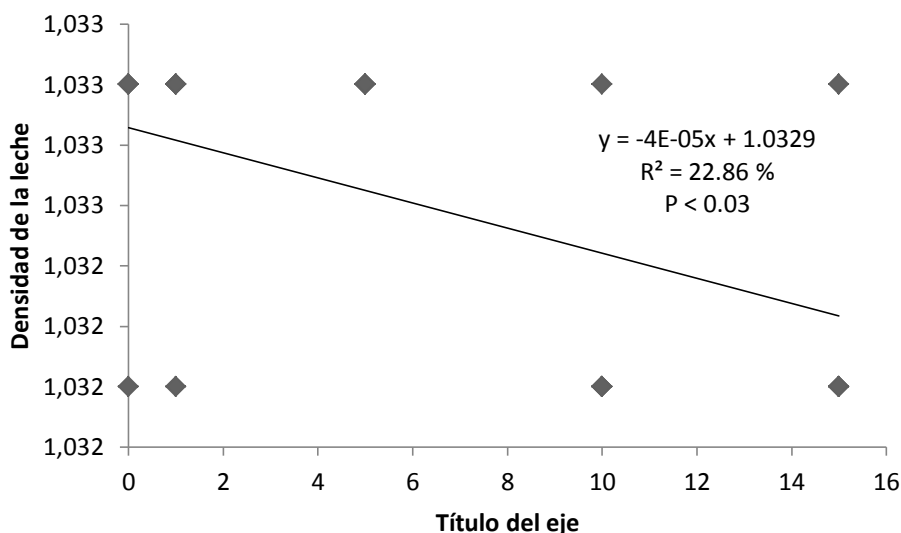


Gráfico 3. Densidad de la leche bajo el efecto de la aplicación de diferentes niveles de suero de leche.

Al analizar los resultados experimentales según el gráfico 3, se puede manifestar que la densidad de la leche está relacionada significativamente ( $P < 0.03$ ), de los niveles de

suero de leche incluida en la leche entera, así tenemos que el 22.86 % de densidad de la leche depende de los niveles de suero de leche aplicada, manifestándose que al incluir el suero de leche y por cada porcentaje de suero incluido la densidad de la leche reduce en  $4 \times 10^{-5}$ .

## **C. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**

### **1. Reductasa**

Según el análisis de reductasa, la leche en promedio recuperó el color normal a las 3.94 horas, y un coeficiente de variación de 1.12 %, al someter los resultados experimentales, se pudo notar que existe diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

Al analizar la leche sin la aplicación de suero de leche, esta tardo 4.07 horas en recobrar su color normal, valor que difiere significativamente del resto de tratamientos, principalmente del 15 % de suero de leche, con el cual se alcanzó 3.86 horas en tomar el color natural, esto se debe a que el suero de leche por cuidado que se ponga en el proceso de elaboración de quesos, el hecho de que se incluye el cuajo y se somete al ambiente, este se carga de microorganismos aerobios, los cuales influyen en la reductasa de la leche.

Carrion, A. (2008), señala que el tiempo tarda en pasar el azul de metileno de su forma oxidada (azul) a la reducida (incolora) bajo condiciones controladas es proporcional a la calidad sanitaria de la leche y aunque no es posible establecer con exactitud el número de microorganismos, es factible clasificar el producto dentro de ciertos grados aceptables o no aceptables, en base a los siguientes valores: buena a excelente más de 8 horas, regular a buena de 6 - 8 horas, aceptable 2 - 6 horas y mala menos de 2 horas.

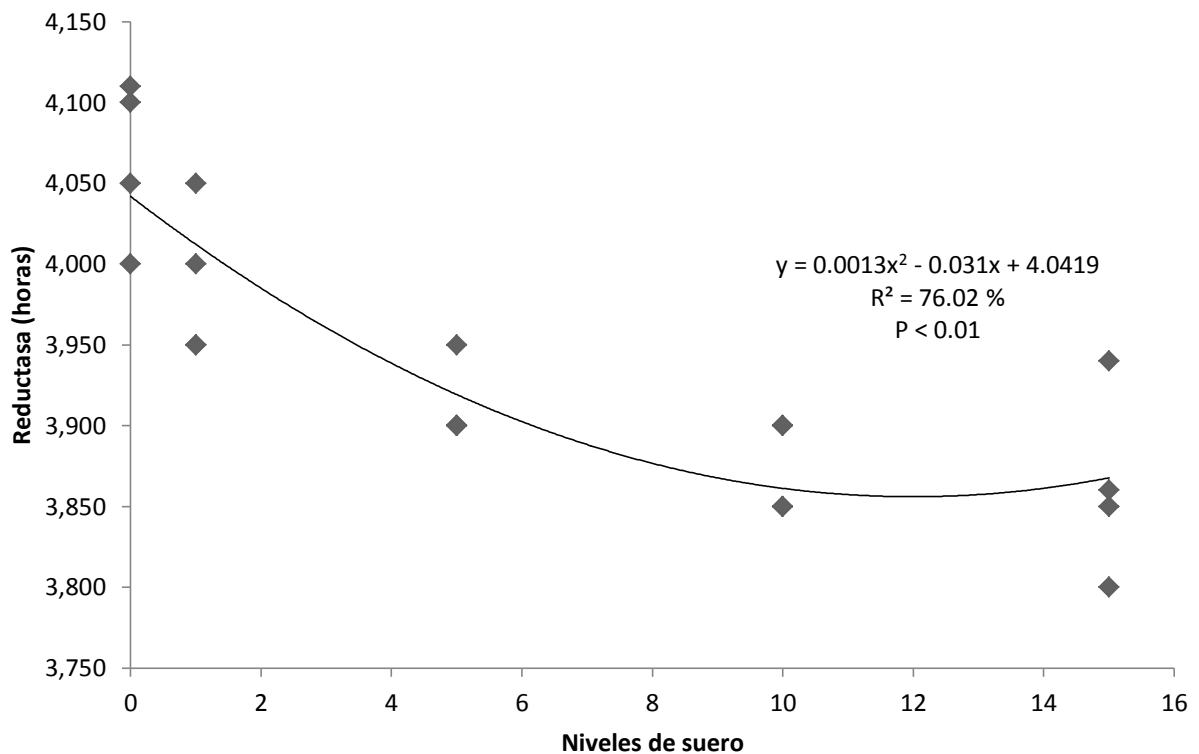


Gráfico 4. Reductasa de la leche bajo el efecto de la aplicación de diferentes niveles de suero de leche.

Según el gráfico 4, se determinó que el tiempo de oxidación de la leche está relacionado significativamente ( $P < 0.01$ ) a una regresión cuadrática, y, el 76.02 % de reductasa depende de los niveles de suero de leche y por cada porcentaje de utilización de suero de leche hasta el 10 %, esta tiende a reducir el tiempo de reductasa en, 0.031 horas y al incluir niveles superiores a 10 % de suero de leche, el tiempo de reductasa vuelve a incrementar en 0.0013 horas.

## 2. Lactoperoxidasa

Según la prueba lactoperoxidasa, la leche se comenzó acidificarse a las 12 horas, comportamiento que se observó en todos los tratamientos, esto puede deberse a que posiblemente la leche bien conservada no se acidifica fácilmente, pues su calidad depende de la temperatura de conservación.

## **D. ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO**

### **1. Color, puntos**

Según el grupo de evaluadores, el color de la leche con diferentes niveles de suero de leche, en promedio se registró 4.68/5 puntos con un coeficiente de variación de 2.03 %, al someter los resultados experimentales al análisis de varianza, se pudo determinar diferencias significativas entre los tratamientos.

La utilización del tratamiento control, permitió registrar 5.00/5.00 puntos que equivale a un color excelente o característico blanco opalescente, el cual difiere significativamente del resto de niveles de suero de leche, principalmente del 15 % de suero de leche con el cual se alcanzó 4.13/5.00 puntos que equivale a un muy buen color pero deja de ser característico de la leche natural o entera, debiendo a que parte de la caseína o color de la leche se extrae en el queso, y al utilizar el subproducto suero, este carece de la coloración el cual al aplicar nuevamente a la leche, este influye en la coloración de la leche haciendo menos aceptable.

Beltrán, D. (2011), señala que el color de la leche de la Asociación de productores Agropecuarios “Francisco de Orellana”, al aplicar las BPM, registro en promedio 4.00/5.00 puntos que corresponde a una leche con un color muy bueno, valor que concuerda con la registrada en la presente investigación.

Según las normas INEN NTE (9:2002), el color de leche cruda debe blanco opalescente o ligeramente amarillo, el mismo que al inicio de la investigación fue blanco opaco, el cual fue mejorando hasta llegar a este indicador ideal según recomienda las normas INEN, esto se debe posiblemente a que el color de la leche está influenciada con la aplicación de sustancias extrañas como el suero de leche, a pesar de ser residuo de la leche, esta influye directamente en el color de la leche.

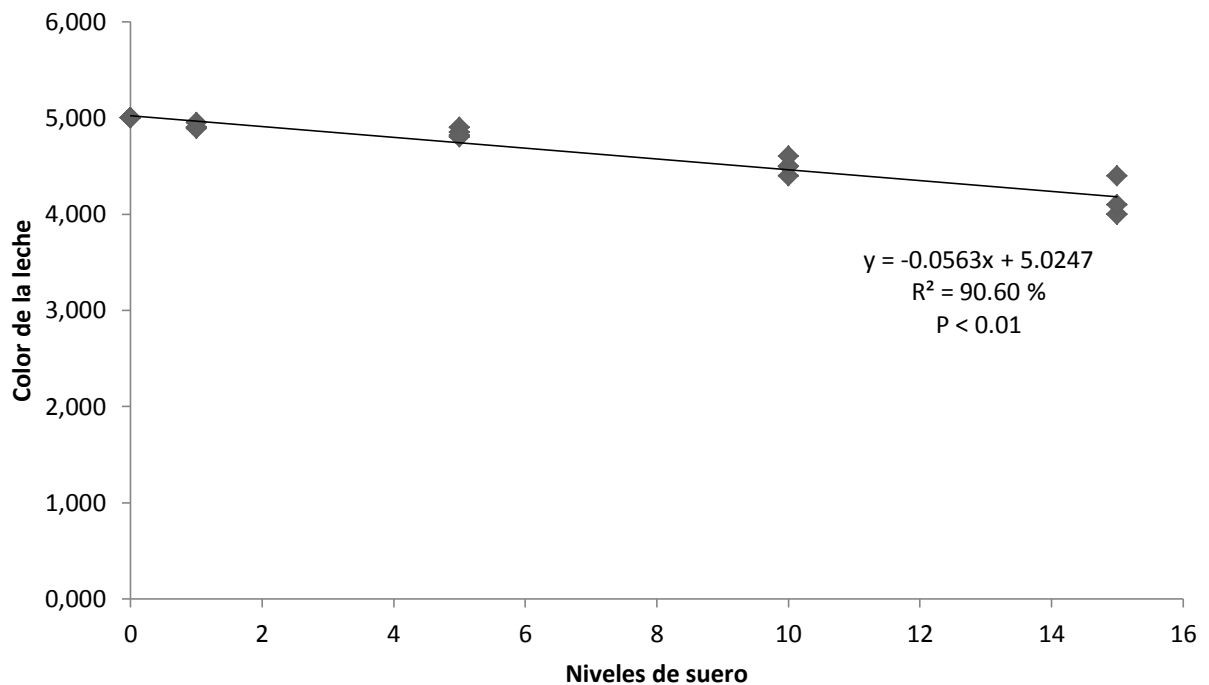


Gráfico 5. Color de la leche bajo el efecto de la aplicación de diferentes niveles de suero de leche.

En el gráfico 5, determinamos que el color de la leche está relacionada significativamente ( $P < 0.01$ ) de los niveles de suero de leche, así mencionamos que el 90.60 % de color depende de la utilización del suero de leche y por cada porcentaje de suero incluido en la leche, el color se reduce en 0.056 puntos.

## 2. Sabor, puntos

El sabor de la leche con la inclusión de suero presentó 4.67/5.00 puntos en promedio y un coeficiente de variación de 2.04 %, al aplicar el análisis de varianza a los resultados experimentales se determinó diferencias altamente significativas entre los tratamientos.



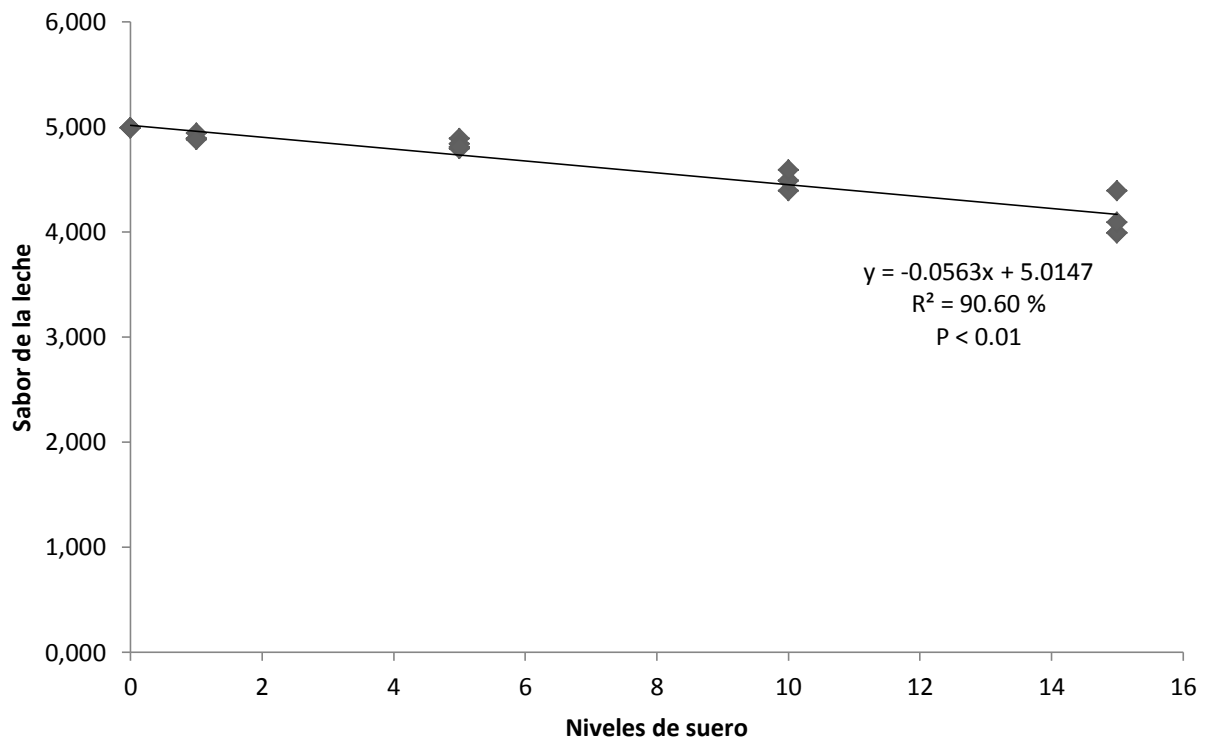


Gráfico 6. Sabor de la leche bajo el efecto de la aplicación de diferentes niveles de suero de leche.

La utilización del tratamiento control permitió registrar 4.99 puntos por lo que se puede manifestar que este producto tiene un sabor característico equivalente a excelente, valor que difiere significativamente del resto de tratamientos, principalmente del 15 % de suero con el cual se registro 4.12 puntos equivalente a muy bueno, esto se debe a que si es cierto casi no existe un cambio, pero el sabor del suero por mínimo que sea la aplicación, este tiene un sabor diferente a la leche, que influye en la leche adulterada con suero de leche.

Beltran, D. (2011), señala que el sabor de la leche en la asociación de productores agropecuarios “Francisco de Orellana” registró 3.86/5 puntos valor inferior al registrado en la presente investigación, esto quizá se deba a factores de sensibilidad de los catadores para evaluar el sabor de la leche.

Según el grafico 6, el sabor de la leche está relacionada significativamente ( $P < 0.01$ ), de los niveles de suero y el 90.60 % sabor depende de los niveles de suero de leche utilizado, además se puede mencionar que por cada % de suero incluido en la leche, esta reduce la aceptabilidad del sabor en 0.056 puntos.

### **3. Olor, puntos**

El olor de la leche con inclusión de suero registró 4.65/5.00 puntos en promedio y un coeficiente de variación de 2.04 %, al someter los resultados al análisis de varianza se determinó diferencias altamente significativas entre los diferentes niveles de suero utilizados en la leche.

El tratamiento control registró 4.97 puntos por lo que se puede manifestar que este producto tiene un olor característico equivalente a excelente, valor que difiere significativamente del resto de tratamientos, principalmente del nivel 15 % de suero puesto que con ello se obtuvo 4.10 puntos equivalente a muy bueno, esto se debe a que el suero tiene un olor característico diferente a la leche que hace que de alguna manera esta influya el olor del producto.

Beltran, D. (2011), reporta que el olor de la leche de la asociación de productores agropecuarios “Francisco de Orellana” registró 4.00/5.00 puntos el mismo que es inferior al registrado en la presente investigación debiéndose posiblemente a que el manejo de la leche y su inclusión de cualquier producto diferente hace que sus características sensoriales se vean afectadas.

En el grafico 7, el olor de la leche está relacionada significativamente ( $P < 0.01$ ), de los niveles de suero y el 90.60 % de aroma depende de los niveles de suero utilizado, además que por cada % de suero incluido en la leche, esta reduce la aceptabilidad de aroma (olor) en 0.056 puntos.

Según las normas INEN NTE (9:2002), el olor de leche cruda debe ser suave, lácteo característico y libre de olores extraños, el mismo que se determinó con el tratamiento

control, mientras que a medida que se utilizaba el suero, esta característica innata de la leche se iba perdiendo.

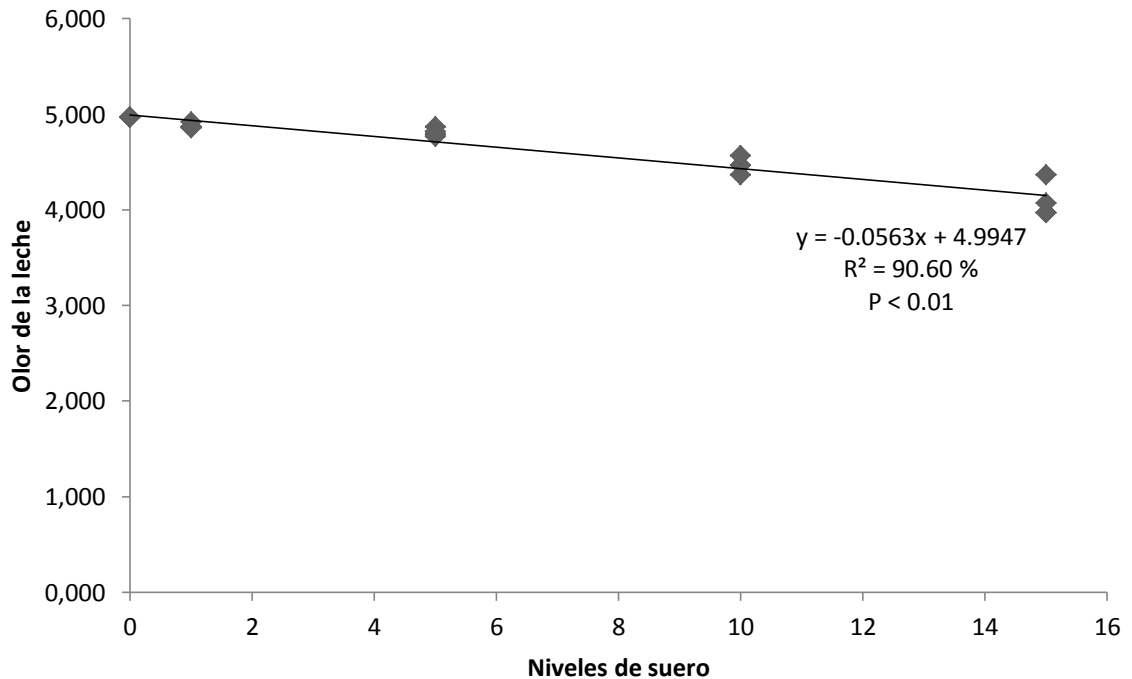


Gráfico 7. Olor de la leche bajo el efecto de la aplicación de diferentes niveles de suero de leche.

#### 4. Total, puntos

Al analizar las características organolépticas totales, la leche con inclusión de suero registró 13.99/15.00 puntos en promedio y un coeficiente de variación de 2.04 %, al aplicar a los resultados experimentales el análisis de varianza se determinó diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ) entre los diferentes niveles de suero utilizados como tratamientos.

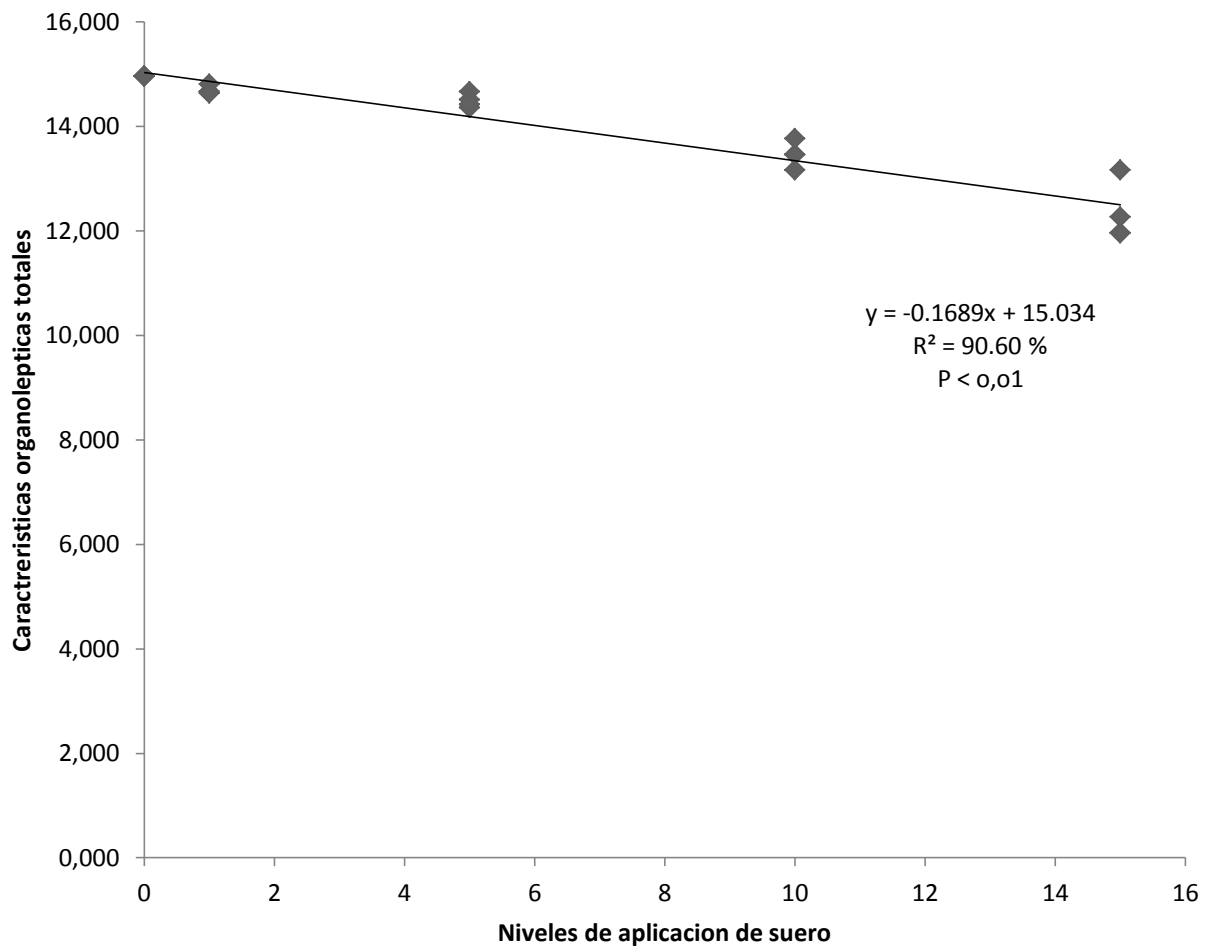


Gráfico 8. Características organolépticas totales de la leche bajo el efecto de la aplicación de diferentes niveles de suero de leche.

La utilización del tratamiento control permitió registrar 14.96/15.00 puntos el mismo que tiene las características organolépticas propias de la leche equivalentes a excelentes, el cual difiere significativamente del resto de niveles de suero, principalmente del nivel 15 % de suero con el que se obtuvo 12.34/15.00 puntos, esto se debe a que el suero influye en las diferentes características organolépticas parciales de la leche.

Según el gráfico 8, las características organolépticas totales de la leche está relacionada significativamente ( $P < 0.01$ ), de los niveles de suero, por tanto el 90.60 % de las características sensoriales depende de los niveles de suero, y que por cada porcentaje de suero aplicado en la leche, esta reduce en 0.168 puntos.

## V. CONCLUSIONES

1. De acuerdo con el objetivo general del estudio, se logró determinar la adulteración de leche fresca con suero de quesería, a través de electroforesis, mediante la detección de presencia de GMP como indicador de adulteración en las muestras de leche incluidas intencionalmente suero de quesería.
2. Los resultados obtenidos en el presente estudio señalan que el GMP se evidencia como una banda de 20.9 kDa en la lectura.
3. Los resultados obtenidos demuestran que la detección del GMP por PAGE-SDS en leche, representa un parámetro específico y sensible para detectar porcentajes de adulteración con suero, a niveles tan bajos como 1%, algo que no puede ser revelado con la evaluación de los parámetros físico- químicos de la leche.
4. De acuerdo con los objetivos específicos del estudio, se verificó presencia de varios porcentajes de suero de quesería en leche fresca.
5. De acuerdo con los objetivos específicos del estudio, se conoció la poca influencia de suero de quesería en las características físico-químicas, microbiológicas y sensoriales de la leche, en niveles de hasta el 15% de adulteración.
6. La adulteración con suero de quesería, no influye significativamente, en los porcentajes analizados, en los parámetros de proteína, grasa, densidad y en la prueba de lactofermentación, pero se deduce que al aumentarse el porcentaje de suero, las características tienden a alterarse.
7. La adulteración con suero de quesería, influye significativamente en el pH de la leche, ya que a medida que se aumenta el suero, el pH se reduce significativamente.

8. A medida que se incluyó el suero en la leche entera, la presencia de microorganismos hace reducir el tiempo de coagulación de la reductasa de 4.07 a 3.86 horas al aplicar hasta 15 % de suero.
9. El incremento de suero en la leche, reduce la aceptabilidad de la leche según el análisis de las características organoléptica, reduciendo de 14.96 a 12.34/15.00 puntos, esto en base a los resultados obtenidos en dicho análisis.
10. El sistema desarrollado es una buena alternativa para aplicarse en el análisis de leche en programas oficiales de inspección y/o en las industrias lácteas.
11. La adición de suero de quesería a la leche, en cualquier proporción, no constituye un peligro para la salud del consumidor, pero representa un fraude para el mismo.

## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Realizar un mayor número de estudios, en el Ecuador, que permitan conocer la dimensión real de la adulteración de leche con suero de quesería, así como los sectores y provincias donde más se tiene es te inconveniente, ya que existe problemas en la industrialización de los lácteos por la utilización de suero en la leche.
2. Realizar más investigaciones que permitan la validación de la metodología para su instrumentación como una técnica oficial, empezando por el sector rural y comunitario que podría estar afectado con esta problemática, y a través de la misma, controlar la adulteración de leche con suero de quesería.
3. Validar la técnica detallada, para que la misma pueda ser aplicada en la industria de productos lácteos como una prueba eficaz y precisa de detección de suero de quesería en leche de vaca.
4. Comparar este tipo de ensayos (detección de GMP por electroforesis) con otro tipo de métodos, por ejemplo con la detección de GMP por Inmunoensayo ELISA y por HPLC, en las mismas condiciones y verificar la eficacia de los mismos y los niveles de adulteración que llegan a comprobar cada una de las técnicas.
5. Realizar investigaciones en el Ecuador para que el suero de leche en vez de ser considerado como un desperdicio, pase a ser considerado como fuente rica en materias primas y cada uno de sus componentes pueda ser aprovechado de alguna forma, ya sea para la elaboración de nuevos productos alimenticios o para otras áreas, como por ejemplo, bebidas, fuentes de proteínas, etc.

## VII. **BIBLIOGRAFÍA**

1. **ALVIAR, J.**, Manual Agropecuario, Tecnologías orgánicas de la granja integral autosuficiente.,2da. Edición., Bogotá - Colombia.,Editorial LIMERIN., 2010.,Pp: 130 – 135.
2. **MEYER, M.**, Elaboración de productos lácteos., Tercera reimpresión., Trillas – México., Manuales para educación agropecuaria., 1997., Pp: 44 – 89.
3. **PALTRINIERI, G.**, Taller de leche., Sexta Edición., Buenos Aires – Argentina., Editorial Librería Especializada Olejnik., 2001.,Pp: 32 – 54.
4. **VILLEGAS DE GANTE, A.**, Los quesos mexicanos. Segunda Edición.,Chihuahua – México., Editorial CIESTAAM Center., 2003., Pp: 25 – 65.
5. **GALINDO, L. y otros.**, Estandarización de la detección Del glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche., Universidad de Zulia., Zulia – Venezuela., **REVISTA CIENTÍFICA.**, 2006., Pp. 1 – 10.
6. **REYES, J – BON, F.**, Adulteración de leche pasteurizada con suero de quesería en la ciudad de Aguascalientes., Avances en Investigación



Agropecuaria, Universidad de Colima., Colima–  
México.,**REVISTA CIENTÍFICA.**, vol. 11, número  
002., 2007., Pp. 23 – 34.

7. **SILVA, G.**, Duodécimo curso Nacional de Fabricación de Quesos Naturales., Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.,**REVISTA CIENTÍFICA.**, 1998., Pp. 1 – 50.
8. **INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.**, Norma Técnica Ecuatoriana INEN 710: 2003., El Yogur, concepto, clasificación y requisitos., 2003.
9. **INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.**, Norma Técnica Ecuatoriana INEN 4:1998., Conceptos DE Leche y productos lácteos., 1998.
10. **INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.**, Norma Técnica Ecuatoriana INEN 9:1999., Leche cruda-Requisitos., 1999.
11. **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.**, CODEX STAN 206-1999., Norma general del CODEX para el uso de términos lecheros.,1999.
12. **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.**, CODEX STAN 289-1995.,Norma del CODEX para sueros en polvo., 1995.

13. **ALCÁZAR, C.,y otros.,**  
Detección de glucomacropéptido (GMP) como indicador de adulteración con suero de quesería en leche deshidratada., Departamento de Medicina Preventiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia., Universidad Nacional Autónoma de México., México, D.F., **TESIS.**, 1998., Pp. 1 – 8.
14. **BELTRAN, D.,** Implementar Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y Principios Estándares de Sanitización (POES) en la Planta Procesadora de Lácteos “6 DE ENERO” de Santo Domingo de los Tsáchilas., Escuela de Ingeniería Zootécnica de la Facultad de Ciencias Pecuarias., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Riobamba - Ecuador., **TESIS.**, 2011.Pp: 20 – 25.
15. **CARRIÓN, A.,** Influencia de los diferentes grados de mastitis sobre el porcentaje de materia grasa, densidad, acidez, ph y reductasa de leche receptada en lácteos San Antonio. Escuela de Ingeniería Zootécnica de la Facultad de Ciencias Pecuarias., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Riobamba - Ecuador.**TESIS.**, 2008., Pp. 24 – 42.
16. **CHÁVEZ, N., y otros.,**  
Detección mediante un sistema ELISA de

glucomacropéptido (GMP) como índice de adulteración de leche con suero de quesería.,  
Depto. de Ingeniería Bioquímica, Centro de Ciencias Básicas., Universidad Autónoma de Aguascalientes., Aguascalientes - México., **TESIS.**, 2010., Pp. 1 – 10.

## BIBLIOGRAFÍA DE INTERNET

17. **ALIMENTACIÓN SANA.**,  
<http://www.alimentacion-sana.com.ar/informaciones/novedades/lacteos.htm>.,  
2012/01/20
18. **CODEX**  
[www.codexalimentarius.net/download/standards/.../CXS\\_206s.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/.../CXS_206s.pdf)  
2012/01/20
19. **CODEX**  
[www.codexalimentarius.net/download/standards/.../CXS\\_289s.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/.../CXS_289s.pdf)  
2012/01/20
20. **PAGE-SDS**  
<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=95911641013>

2012/01/20

21. **SUERO DE LECHE**

[http://es.scribd.com/oscar\\_franchi/d/47261459-Suero-de-leche-propiedades-y-usos](http://es.scribd.com/oscar_franchi/d/47261459-Suero-de-leche-propiedades-y-usos)

2012/01/20

# **ANEXOS**

Anexo 1. Proteínas totales (%) de la leche incluida diferentes niveles (0, 1, 5, 10 y 15 %) de suero de leche.

### RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tratamientos	Repeticiones				Suma	Desvest
	I	II	III	IV		
T0	3.30	3.30	3.20	3.30	13.10	0.05
T1	3.20	3.30	3.10	3.20	12.80	0.08
T5	3.30	3.10	3.20	3.20	12.80	0.08
T10	3.40	3.30	3.20	3.30	13.20	0.08
T15	3.20	3.30	3.10	3.20	12.80	0.08

### ADEVA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher		
				Cal	0.05	0.01
Total	19	0.13				
Tratamientos	4	0.04	0.01	1.63	3.06	4.89
Error	15	0.09	0.01			
CV %			2.36			
Media			3.24			

### SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN AL 5 %

Tratamientos	Media	Rango
T0	3.275	a
T1	3.200	a
T5	3.200	a
T10	3.300	a
T15	3.200	a

Anexo 2. Grasa (%) de la leche incluida diferentes niveles (0, 1, 5, 10 y 15 %) de suero de leche.

### RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tratamientos	Repeticiones				Suma	Desvest
	I	II	III	IV		
T0	4.00	3.90	3.80	3.90	15.60	0.08
T1	3.90	3.80	3.90	3.90	15.50	0.05
T5	3.90	3.80	3.90	3.90	15.50	0.05
T10	3.80	3.80	3.80	3.80	15.20	0.00
T15	3.90	3.80	3.80	3.80	15.30	0.05

### ADEVA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher		
				Cal	0.05	0.01
Total	19	0.07				
Tratamientos	4	0.03	0.01	2.38	3.06	4.89
Error	15	0.04	0.00			
CV %			1.38			
Media			3.86			

### SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN AL 5 %

Tratamientos	Media	Rango
T0	3.900	a
T1	3.875	a
T5	3.875	a
T10	3.800	a
T15	3.825	a

Anexo 3. pH de la leche incluida diferentes niveles (0, 1, 5, 10 y 15 %) de suero de leche.

### RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tratamientos	Repeticiones				Suma	Desvest
	I	II	III	IV		
T0	6.70	6.60	6.70	6.70	26.70	0.05
T1	6.70	6.80	6.70	6.70	26.90	0.05
T5	6.70	6.70	6.70	6.70	26.80	0.00
T10	6.60	6.70	6.60	6.60	26.50	0.05
T15	6.60	6.60	6.60	6.60	26.40	0.00

### ADEVA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher		
				Cal	0.05	0.01
Total	19	0.07				
Tratamientos	4	0.04	0.01	7.17	3.06	4.89
Error	15	0.02	0.00			
CV %			0.58			
Media			6.67			

### SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN AL 5 %

Tratamientos	Media	Rango
T0	6.675	ab
T1	6.725	a
T5	6.700	a
T10	6.625	bc
T15	6.600	c



Anexo 4. Densidad de la leche incluida diferentes niveles (0, 1, 5, 10 y 15 %) de suero de leche.

### RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tratamientos	Repeticiones				Suma	Desvest
	I	II	III	IV		
T0	1.033	1.033	1.032	1.033	4.13	0.00
T1	1.032	1.033	1.033	1.033	4.13	0.00
T5	1.033	1.033	1.033	1.033	4.13	0.00
T10	1.032	1.033	1.032	1.032	4.13	0.00
T15	1.032	1.032	1.033	1.032	4.13	0.00

### ADEVA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher		
				Cal	0.05	0.01
Total	19	0.00				
Tratamientos	4	0.00	0.00	2.25	3.06	4.89
Error	15	0.00	0.00			
CV %			0.04			
Media			1.03			

### SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN AL 5 %

Tratamientos	Media	Rango
T0	1.033	a
T1	1.033	a
T5	1.033	a
T10	1.032	a
T15	1.032	a

Anexo 5. Prueba de la reductasa (horas) de la leche incluida diferentes niveles (0, 1, 5, 10 y 15 %) de suero de leche.

### RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tratamientos	Repeticiones				Suma	Desvest
	I	II	III	IV		
T0	4.100	4.110	4.000	4.050	16.26	0.05
T1	4.000	4.050	3.950	3.950	15.95	0.05
T5	3.900	3.950	3.900	3.900	15.65	0.03
T10	3.850	3.900	3.900	3.850	15.50	0.03
T15	3.800	3.850	3.860	3.940	15.45	0.06

### ADEVA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher		
				Cal	0.05	0.01
Total	19	0.14				
Tratamientos	4	0.12	0.03	14.92	3.06	4.89
Error	15	0.03	0.00			
CV %			1.12			
Media			3.94			

### SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN AL 5 %

Tratamientos	Media	Rango
T0	4.065	a
T1	3.988	b
T5	3.913	c
T10	3.875	c
T15	3.863	c

Anexo 6. Prueba de lactofermentación (horas) de la leche incluida diferentes niveles (0, 1, 5, 10 y 15 %) de suero de leche.

### RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tratamientos	Repeticiones				Suma	Desvest
	I	II	III	IV		
T0	12.000	12.000	12.000	12.000	48.00	0.00
T1	12.000	12.000	12.000	12.000	48.00	0.00
T5	12.000	12.000	12.000	12.000	48.00	0.00
T10	12.000	12.000	12.000	12.000	48.00	0.00
T15	12.000	12.000	12.000	12.000	48.00	0.00

### ADEVA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher		
				Cal	0.05	0.01
Total	19	0.00				
Tratamientos	4	0.00	0.00	#jDIV/0!	3.06	4.89
Error	15	0.00	0.00			
CV %			0.00			
Media			12.00			

### SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN AL 5 %

Tratamientos	Media	Rango
T0	12.000	a
T1	12.000	a
T5	12.000	a
T10	12.000	a
T15	12.000	a

Anexo 7. Color (puntos) de la leche incluida diferentes niveles (0, 1, 5, 10 y 15 %) de suero de leche.

### RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tratamientos	Repeticiones				Suma	Desvest
	I	II	III	IV		
T0	5.000	5.000	5.000	5.000	20.00	0.00
T1	4.900	4.950	4.900	4.890	19.64	0.03
T5	4.800	4.900	4.850	4.820	19.37	0.04
T10	4.500	4.400	4.500	4.600	18.00	0.08
T15	4.000	4.000	4.100	4.400	16.50	0.19

### ADEVA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher		
				Cal	0.05	0.01
Total	19	2.22				
Tratamientos	4	2.09	0.52	57.84	3.06	4.89
Error	15	0.14	0.01			
CV %			2.03			
Media			4.68			

### SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN AL 5 %

Tratamientos	Media	Rango
T0	5.000	a
T1	4.910	a
T5	4.843	a
T10	4.500	b
T15	4.125	c

Anexo 8. Sabor (puntos) de la leche incluida diferentes niveles (0, 1, 5, 10 y 15 %) de suero de leche.

### RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tratamientos	Repeticiones				Suma	Desvest
	I	II	III	IV		
T0	4.990	4.990	4.990	4.990	19.96	0.00
T1	4.890	4.940	4.890	4.880	19.60	0.03
T5	4.790	4.890	4.840	4.810	19.33	0.04
T10	4.490	4.390	4.490	4.590	17.96	0.08
T15	3.990	3.990	4.090	4.390	16.46	0.19

### ADEVA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher		
				Cal	0.05	0.01
Total	19	2.22				
Tratamientos	4	2.09	0.52	57.84	3.06	4.89
Error	15	0.14	0.01			
CV %			2.04			
Media			4.67			

### SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN AL 5 %

Tratamientos	Media	Rango
T0	4.990	a
T1	4.900	a
T5	4.833	a
T10	4.490	b
T15	4.115	c

Anexo 9. Olor (puntos) de la leche incluida diferentes niveles (0, 1, 5, 10 y 15 %) de suero de leche.

### RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tratamientos	Repeticiones				Suma	Desvest
	I	II	III	IV		
T0	4.970	4.970	4.970	4.970	19.88	0.00
T1	4.870	4.920	4.870	4.860	19.52	0.03
T5	4.770	4.870	4.820	4.790	19.25	0.04
T10	4.470	4.370	4.470	4.570	17.88	0.08
T15	3.970	3.970	4.070	4.370	16.38	0.19

### ADEVA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher		
				Cal	0.05	0.01
Total	19	2.22				
Tratamientos	4	2.09	0.52	57.84	3.06	4.89
Error	15	0.14	0.01			
CV %			2.04			
Media			4.65			

### SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN AL 5 %

Tratamientos	Media	Rango
T0	4.970	a
T1	4.880	a
T5	4.813	a
T10	4.470	b
T15	4.095	c

Anexo 10. Total (puntos) de la leche incluida diferentes niveles (0, 1, 5, 10 y 15 %) de suero de leche.

### RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tratamientos	Repeticiones				Suma	Desvest
	I	II	III	IV		
T0	14.96	14.96	14.96	14.96	59.84	0.00
T1	14.66	14.81	14.66	14.63	58.76	0.08
T5	14.36	14.66	14.51	14.42	57.95	0.13
T10	13.46	13.16	13.46	13.76	53.84	0.24
T15	11.96	11.96	12.26	13.16	49.34	0.57

### ADEVA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher		
				Cal	0.05	0.01
Total	19	20.01				
Tratamientos	4	18.79	4.70	57.84	3.06	4.89
Error	15	1.22	0.08			
CV %			2.04			
Media			13.99			

### SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN AL 5 %

Tratamientos	Media	Rango
T0	14.960	a
T1	14.690	ab
T5	14.488	ab
T10	13.460	b
T15	12.335	b

Anexo 11. GMP de la leche incluida diferentes niveles (0, 1, 5, 10 y 15 %) de suero de leche.

### RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tratamientos	Repeticiones				Suma	Desvest
	I	II	III	IV		
T0	1.010	1.000	1.000	1.000	4.01	0.01
T1	2.000	2.000	2.000	2.000	8.00	0.00
T5	2.000	2.000	2.000	2.000	8.00	0.00
T10	2.000	2.000	2.000	2.000	8.00	0.00
T15	2.000	2.000	2.000	2.000	8.00	0.00

### ADEVA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher		
				Cal	0.05	0.01
Total	19	3.18				
Tratamientos	4	3.18	0.80	159201.00	3.06	4.89
Error	15	0.00	0.00			
CV %			0.12			
Media			1.80			

### SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN AL 5 %

Tratamientos	Media	Rango
T0	1.003	b
T1	2.000	a
T5	2.000	a
T10	2.000	a
T15	2.000	a