



APLICACIÓN DE LA TURBIDIMETRÍA PARA LA MEJORA DE LA PRUEBA DE ALCOHOL CONVENCIONAL EN LECHE BOVINA

¹Amador-Espejo, G.G., ²Cedillo-Velázquez, K.y ²Ruiz-Espinosa, H.

1.CONACYT– Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. 2. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Ingeniería Química. Colegio de Ingeniería en Alimentos.

Resumen

Con la intención de incrementar sensibilidad de la prueba rutinaria de alcohol en leche bovina, se empleó un análisis óptico de mayor eficacia, como es la turbidimetría, evaluando un par de leches descremadas tratadas térmicamente (72°C, por 15 s y 2 min). Los resultados turbidimétricos muestran una adecuada sensibilidad a la prueba de alcohol, al observarse un cambio importante en la turbidez de las muestras durante la medición. Asimismo, el cambio en la pendiente de turbidez en las muestras tratadas, muestra similitud con el tiempo de la prueba de alcohol tradicional. A pesar de necesitarse más réplicas e intervalos de temperatura, los primeros resultados muestran que es posible la mejora de la prueba convencional utilizando métodos ópticos.

Palabras clave. Leche, prueba de alcohol, Turbidimetría

Abstract

With the intention to increase the sensibility of routine alcohol test in bovine milk, turbidity optical analysis was employed, evaluating a couple of skim milk heat-treated samples (72°C

for 15 s and 2 min). The results of the turbidimetric test showed good sensitivity to alcohol test by observing a significant change in the turbidity during the measurement. Furthermore, the change in slope of turbidity in the treated samples shows similarity to the testing time in traditional alcohol test. Despite the needed for More replicates and temperature ranges, the first results show that it is possible to improve conventional optical test methods which which tend to be more accurate.

Key words, Milk, alcohol test, turbidimetry.

Introducción

La prueba de alcohol es una de las pruebas tradicionales de leche fluida; aunque no se aplica con regularidad en la mayor parte de países desarrollados, continúa siendo de uso común en diversos países de Latinoamérica y en Oriente Medio como un método rápido para definir la aceptabilidad de la leche a su llegada a planta, particularmente para evaluar su termoestabilidad (Guo et al., 1998).

Esta prueba consiste en detectar la formación de un precipitado en leche cuando se agrega un volumen igual de solución de etanol absoluto, por lo general aproximadamente 70% v/v; si la prueba es positiva (lo cual puede ocurrir por lactofermentación, por desequilibrio mineral, daño proteico, etc.), el lote de leche es rechazado pues se considera inadecuado para su procesamiento posterior. Esto se debe a que la leche para ser considerada apta para industrializarse debe exhibir una buena estabilidad al calor, ya que por lo regular se expone a altas temperaturas durante una o más etapas de proceso. La prueba de alcohol reviste una gran importancia debido a que la termorresistencia de la leche es necesaria para asegurar la eficacia del proceso térmico de conservación a la que se somete. En caso contrario, puede sufrir modificaciones indeseables durante el almacenamiento, incluyendo coagulación, enranciamiento, generación de sabores amargos y problemas de gelificación, entre otros.

De acuerdo a lo reportado en la bibliografía, no existe un procedimiento único para realizar la prueba del alcohol. Algunos de los factores que pueden variar son la concentración de la solución alcohólica y la razón de etanol:leche empleada. En la actualidad, estos factores son establecidos por cada industria láctea dependiendo de sus necesidades, sin embargo, la concentración de etanol se ha ido incrementando a fin de asegurarse de recibir leches más estables frente a los tratamientos térmicos (Molina et al., 2001). A pesar de que la prueba de alcohol tiene ventajas, tales como su facilidad y bajo costo de aplicación, presenta limitaciones importantes derivadas de su naturaleza subjetiva y cualitativa. Es por ello que existe la necesidad de plantear una metodología analítica rápida que permita obtener resultados cuantitativos de esta prueba haciéndola más precisa, abriendo una ventana para la aplicación de métodos ópticos.

Los métodos analíticos ópticos (incluyendo espectroscopía ultravioleta, infrarroja, turbidimetría, análisis de imagen y colorimetría) presentan ventajas importantes sobre los métodos químicos, por lo que en tiempos recientes se han empezado a utilizar con mayor frecuencia, por su rapidez y facilidad. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue el uso de una técnica óptica para evaluar de forma más objetiva la prueba de alcohol en leche bovina.

Materiales y Métodos

Para este estudio, se obtuvo leche entera de un proveedor ubicado en la ciudad de Puebla. Esta

leche se descremó completamente empleando una descremadora eléctrica LKL (LKL, Bulgaria) a 10,500 rpm. La composición (2.65 ± 0.13 proteína, 7.11 ± 0.36 sólidos no grasos) fue evaluada mediante una prueba rápida con un analizador ultrasónico (Lactoscan LA, Milkotronic Ltd, Bulgaria).

Posteriormente, cada lote de leche fue dividido en dos secciones y fueron sometidos a un tratamiento térmico diferente, empleando un baño maría en un baño serológico, colocando en el gabinete los recipientes con la leche hasta que alcanzó la temperatura deseada: 72°C por 15 segundos (pasteurización HTST) y 72°C por 2 minutos (leche sometida a abuso térmico), respectivamente. Tras el tratamiento térmico correspondiente, la leche se enfrió inmediatamente y se mantuvo a temperatura de refrigeración 4-6°C por 30 minutos hasta su uso.

Prueba de Alcohol

Las soluciones de etanol (Sigma Aldrich, 100% de pureza) se realizaron a dos diferentes concentraciones (68 y 78% v/v). Se seleccionó un diseño aleatorizado con una variable independiente: la concentración de las soluciones de etanol con dos niveles (68 y 78%). Lo anterior se determinó basado en lo reportado por Molina et al. (2001). Estos autores establecen que la concentración usual de etanol para la prueba de alcohol en leche es de 68% (v/v), aunque algunas industrias lácteas han aumentado la concentración a 78% para asegurarse de recibir leches más estables frente a tratamientos térmicos.

Evaluación de la evolución de la prueba de alcohol mediante turbidimetría

La turbidez de las muestras de leche se midió usando un turbidímetro (HACH 2100N, Loveland, CO., EEUU) con luz transmitida a 860 nm de acuerdo al método propuesto por Martin et al. (2007). Las unidades de medición empleadas fueron nefelométricas de turbidez (NTU). Posteriormente, se realizó el calibrado del instrumento utilizando los estándares secundarios de Gelex en el intervalo de <0.1 a 4000 NTU; la calibración se llevó a cabo empezando con el estándar de valor NTU más bajo continuando en orden ascendente. Para la medición de la muestra, se colocan dentro de la cubeta de vidrio perfectamente limpia 10 mL de leche y 20 mL de solución de etanol con el uso de pipetas de 10 mL, llenando hasta la línea marcada en la cubeta. La mezcla se agitó durante 5 s y se procedió a realizar la medición inmediatamente.

Análisis estadístico

Los resultados analizados por ANOVA y posteriormente por una prueba de Tukey para evaluar diferencias entre las muestras, a una $P < 0.05$. El análisis se llevó a cabo utilizando el software Minitab 16 (Minitab Inc., EE.UU.). Las pruebas fueron llevadas a cabo por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Prueba de alcohol en leche fluida cruda y tratada térmicamente

Se realizó la prueba de alcohol convencional empleando leche cruda descremada, los resultados se muestran en la Tabla 1. Asimismo, los resultados de la Tabla 1 son comunes para una prueba de alcohol en leche tratada térmicamente, mostrando diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos aplicados. En este sentido, Amador-Espejo et al. (2013) presentan un comportamiento similar, obteniendo una menor estabilidad a la prueba de alcohol (vista como un menor tiempo de precipitación) al aplicarse tratamientos térmicos más severos.

Tabla 1. Prueba de alcohol convencional en leche fluida cruda y tratada térmicamente.

Leche fluida tratada térmicamente	Solución de etanol	Tiempo en que se forma el precipitado ¹
HTST ²	68%	>1 h (sin presencia) ^a
Abuso térmico		>1 h (sin presencia) ^a
HTST	78%	82.33 s $\pm$ 4.04 ^b
Abuso térmico		57 s $\pm$ 3 ^c

1. Diferentes subíndices indican diferencia significativa. $n = 3$ réplicas.

2. HTST = 72°C 15 s

Turbidez

Debido a que las pruebas convencionales de alcohol con porcentajes bajos llevaron un tiempo muy prolongado sin exhibir cambio, se optó por trabajar sólo con la solución de 78% (v/v). En la Figura 1 podemos observar que en ambos tratamientos térmicos la tendencia general de los datos de las unidades nefelométricas NTU fue de disminuir con el tiempo, llegando a mostrar una estabilización de la lectura después de los 150 s aproximadamente. A pesar de que el punto de inicio de cada tratamiento es diferente, la tendencia es similar, presentándose un descenso de 4066 a 3820 en la muestra tratada a 72°C por 15 s (T1), mientras que en la muestra tratada a 72°C por 2 minutos (T2), se observa un punto de caída a los pocos segundos

de evaluación con una pendiente muy inclinada hasta llegar a un comportamiento lineal aproximadamente a los 3500 NTU.

Asimismo, en el T1 en el intervalo de 20-60 s hay un pequeño cambio en la refracción de la luz, que puede

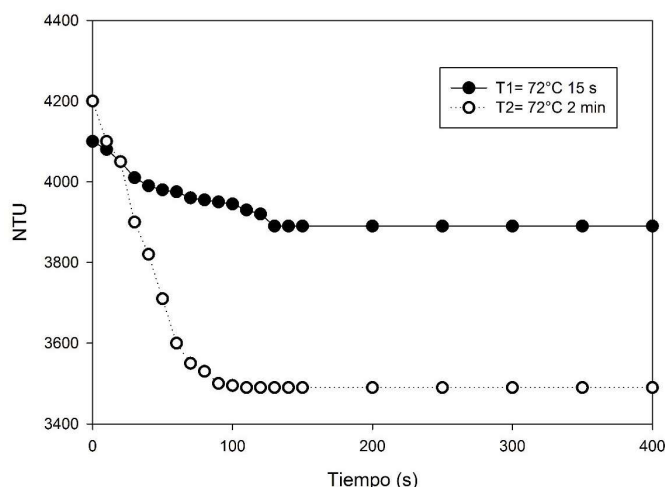


Figura 1. Seguimiento de la prueba de alcohol por turbidez en leche cruda descremada tratada térmicamente; razón 1:2 (leche: solución de etanol al 78% v/v). NTU (Unidades nefelométricas de turbidez), a 72°C por 15 s. y 72°C por 2 min.

observarse como un cambio en la pendiente observada. Por su parte, en el T2 se observa este cambio en la pendiente aproximadamente a los 100 s. Al comparar los resultados obtenidos en la prueba convencional de alcohol a las mismas condiciones (Tabla 1), el tiempo en que se observa la formación del precipitado tiene cierta similitud con el tiempo de cambio en la pendiente observada en las determinaciones por turbidimetría. Según Simmons et al. (2007) al inicio del proceso de desnaturalización proteica se producen partículas muy pequeñas con un tamaño de entre 5 y 10 μm , las cuales con el transcurso del tiempo se agregan formando partículas más grandes y eventualmente incluso pueden precipitar. De acuerdo a esto, se puede deducir que el tiempo en que el turbidímetro detecta un cambio en la refracción de la luz es el momento en que inicia el proceso de desnaturalización, ya que el turbidímetro detecta proteínas con un rango aproximado de 1-100 μm (Mahler et al., 2009). Por otra parte, en la prueba de alcohol convencional, el tiempo reportado es el momento en que se observa la formación del precipitado por agregación de proteínas ya que el ojo humano tiene la capacidad de detectar objetos ligeramente más pequeños de 80 μm a una distancia de 25 cm (Mahler et al., 2009).

Conclusiones

Los resultados derivados del seguimiento de la prueba de alcohol por turbidez nos indican que el método puede detectar un cambio en la leche en presencia de etanol, al mostrar una disminución de la turbidez, debido a un cambio en la estructura de la micela. A pesar de que hace falta evaluar una mayor cantidad de réplicas y de tratamientos térmicos, estos resultados muestran que es posible la correlación de la medición turbidimétrica como el tiempo de precipitado de la proteína en la prueba convencional de alcohol, haciendo posible la mejora de la técnica convencional.

Referencias

Amador-Espejo, G.G. Suárez-Berencia, A., Juan, B., Bárcenas, M.E. and Trujillo, A.J. 2013. Effect of moderate inlet temperatures in ultra-high-pressure homogenization treatments on physicochemical and sensory characteristics of milk. J. Dairy Sci. 97: 659-71.

Guo, M.Z; Wang, Z. Li, J. Qu, L. Jin, P. and Kindstedt. 1998. Ethanol stability of goat's milk. Int Dairy J 8: 57-6.

Horne, S.D and Muir, D.D. 1990. Alcohol and Heat Stability of Milk Protein. J Dairy Sci. 73: 3613-3626.

Mahler, C-H; Friess, W; Grauschopf, U; Kiese, S. 2009. Protein Aggregation: Pathways, Induction Factors and Analysis. J. of Pharmaceutical Sci. 98: 2909-2934.

Molina, L, H; González, R; Brito, C; Carrillo, B and Pinto, M. 2001. Correlación entre la termoestabilidad y prueba de alcohol de la leche a nivel de un centro de acopio lechero. Archivos de Medicina Veterinaria. 33 (2).

Simmons, H.J.M; Jayaraman, P. and Fryer, J.P. 2007. The effect of temperature and shear rate upon the aggregation of whey protein and its implications for milk fouling. J Food Engineering. 79: 517-528.



Científica Senna S.A. de C.V. ofrece soluciones para la investigación científica, nuestra compañía ofrece productos de marcas con renombre internacional, como son:



Anticuerpos, Lisados, Peptidos, RNAi, marcadores, Proteínas y Kits



Líneas celulares, bacterias, cepas de Referencia, sueros y medios de cultivo



Microarreglos de Anticuerpos y Proteínas Peptidos, EIA y Kits de Elisa



Anticuerpos para detectar actina y proteínas, proteínas motoras



Material de Plástico, cajas de cultivo celular, multiplacas y cristalería Pyrex



Medios de Cultivo, suplementos, buffers, antibióticos, Suero fetal



Reactivos, antibióticos, enzimas, factores de crecimiento, cromatografía



Extracción de ácidos nucleicos, medios de cultivo, enzimas, reactivos



Reactivos para biología molecular; electroforesis, medios de cultivo

Para mayor información de productos o marcas que ofrecemos favor de comunicarse a: Tel: (55) 5740-2603
info@cientificasenna.com www.cientificasenna.com