

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE GRADUADOS



**UTILIZACIÓN DE LECHE CONCENTRADA DESCREMADA
RECONSTITUIDA PARA LA ELABORACIÓN DE LECHE UHT:
EFECTOS FÍSICO QUÍMICOS Y DE ESTABILIDAD**

Tesis presentada como parte de
los Requisitos para optar al grado
de Magíster en Ciencias y
Tecnología de la Leche.

MAURICIO JAVIER VARGAS NÚÑEZ

VALDIVIA – CHILE
2006

Profesor Patrocinante:

Haroldo Magariños H.
Técnico en Lecherías,
Magíster en Ciencias y Tecnología de la Leche
Instituto de Ciencia y Tecnología de los
Alimentos.

Profesores Informantes:

Alejandro Romero M.
Bioquímico, Ph.D.
Instituto de Ciencia y Tecnología de los
Alimentos.

Erwin Carrasco R.
Ingeniero Civil Químico
Instituto de Ciencia y Tecnología de los
Alimentos.

Valdivia, 29 de Agosto de 2006.

DECLARACIÓN

Yo, MAURICIO JAVIER VARGAS NÚÑEZ, declaro que soy autor del presente trabajo, que lo he realizado en su integridad y no lo he publicado para obtener otros Grados o Títulos o en Revistas especializadas.

AGRADECIMIENTOS

A mi profesor patrocinante, Sr. Haroldo Magariños, por su preocupación y constante apoyo, amistad y confianza.

A mis profesores informantes, Sr. Alejandro Romero y Sr. Erwin Carrasco por los valiosos aportes hechos a la revisión de la Tesis, consejos y buena disposición.

A la empresa Watt's S.A., quien gentilmente efectuó los ensayos para la obtención de muestras de leche UHT elaboradas a partir de concentrado.

A mi gran amigo, Sr. Fernando Figuerola, por sus consejos y apoyo durante todo el magíster.

Al personal del ICYTAL, especialmente a Gastón Salazar por su espíritu de trabajo y sacrificio.

A mi familia, mi madre María Angélica y mis hermanas Leyla y Valeria, por su apoyo constante, amor y fe en mi.

A Andrea, por su inmenso amor, apoyo y compañía tanto en los momentos difíciles como en aquellos de felicidad.

A todos los amigos que encontré en Valdivia especialmente a: Víctor, Tiki, Juan Pablo, Sandra, Pablo, Carla, Jessie, Olivia y Francisca.

A mis amigos de Santiago, especialmente a: Marco, Jurij, Hernán, Rodrigo, Feña, Cristián y Jorge.

Para Pedro Vargas, mi tío y mi padre, con mucho cariño.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	Concentración de leche	4
2.1.1	Cambios a causa de la concentración	6
2.1.2	Reconstitución	7
2.2	Definición del proceso UHT	7
2.2.1	Intercambio calórico directo	8
2.2.2	Intercambio calórico indirecto	8
2.2.3	Efectos de la temperatura de procesamiento	9
2.2.3.1	Efectos sobre las proteínas	10
2.2.3.2	Reacción de Maillard y formación de hidroximetilfurfural	11
2.2.3.3	Alteraciones en el color de la leche	15
2.2.3.4	pH de la leche	15
2.3	Gelificación y sedimentación	16
2.4	Determinación del grado de proteólisis	19
3	MATERIAL Y MÉTODO	21
3.1	Lugar de desarrollo y duración de la investigación	21
3.2	Materiales	21
3.2.1	Materia Prima	21
3.2.2	Materiales y equipos de planta piloto	22
3.2.3	Materiales y equipos de laboratorio	22

Capítulo		Página
3.3	Métodos	22
3.3.1	Diseño experimental	22
3.3.2	Cantidad de materia prima utilizada de acuerdo a diseño experimental	24
3.3.3	Análisis fisicoquímicos y microbiológicos	24
3.3.3.1	Leche descremada termizada y leche descremada concentrada reconstituida	24
3.3.3.2	Leche descremada UHT	25
3.3.4	Análisis estadístico	25
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	27
4.1	Análisis de variables en los diferentes tipos de leches y tratamientos térmicos	27
4.2	Comportamiento de las variables analizadas en el transcurso del almacenamiento	31
4.2.1	Evolución del grado de proteólisis	31
4.2.2	Evolución del contenido de HMF	39
4.2.3	Variación de pH	47
4.2.4	Índice de sedimentación	52
5	CONCLUSIONES	55
6	RESUMEN	57
7	SUMMARY	58

Capítulo		Página
8	BIBLIOGRAFIA	59
	ANEXOS	69

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico		Página
1	Contenido de hidroximetilfurfural en los diferentes tipos de leche y tratamientos térmicos.	28
2	Contenido de proteínas del suero en los diferentes tipos de leche y tratamientos térmicos.	30
3	Evolución del grado de proteólisis durante el tiempo de almacenamiento.	32
4	Comparación del grado de proteólisis a distintos tratamientos térmicos aplicados.	33
5	Comparación del grado de proteólisis a dos temperaturas de almacenamiento.	34
6	Interacción entre temperatura y tiempo de almacenamiento para grado de proteólisis en leches UHT.	35
7	Interacción entre tiempo de almacenamiento y tratamiento térmico para grado de proteólisis en leches UHT.	37
8	Variación del grado de proteólisis a través del tiempo en leches UHT almacenadas a 20°C.	38
9	Variación del grado de proteólisis a través del tiempo en leches UHT almacenadas a 35°C.	39
10	Evolución del contenido de hidroximetilfurfural en leches UHT almacenadas a 20°C.	40
11	Evolución del contenido de hidroximetilfurfural en leches UHT almacenadas a 35°C.	40

Gráfico		Página
12	Evolución de contenido de HMF durante el tiempo de almacenamiento.	41
13	Interacción entre tiempo de almacenamiento y temperatura de almacenamiento para HMF en leches UHT.	42
14	Interacción entre tiempo de almacenamiento y tratamiento térmico para HMF en leches UHT.	44
15	Variación del contenido de HMF a través del tiempo, en leches UHT almacenadas a 20°C.	45
16	Variación del contenido de HMF a través del tiempo, en leches UHT almacenadas a 35°C.	46
17	Evolución del pH durante el tiempo de almacenamiento.	47
18	Interacción entre tiempo de almacenamiento y temperatura de almacenamiento para el pH en leches UHT.	48
19	Interacción entre tiempo de almacenamiento y tratamiento térmico para el pH en leches UHT.	50
20	Variaciones de pH a través del tiempo, en leches UHT almacenadas a 20°C	51
21	Variaciones de pH a través del tiempo, en leches UHT almacenadas a 35°C	52
22	Evolución del índice de sedimentación durante el almacenamiento de diferentes tratamientos de leche UHT.	53

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Reacción de Maillard	14
2	Diagrama explicativo de los tratamientos	23

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Promedios de parámetros fisicoquímicos y enzimáticos evaluados en leche termizada, reconstituida y tratamientos T1, T2 y T3.	27

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Línea de proceso del concentrado	70
2	Diagrama de los tratamientos	71
3	Determinación de las proteínas del suero por el método Folin-Ciocalteau	72
4	Determinación del grado de proteólisis según Hull	74
5	Determinación de hidroximetilfurfural (HMF)	76
6	Determinación del índice de sedimentación	78
7	Recuentos microbiológicos de leche termizada y reconstituida	79
8	Análisis de varianza para HMF en los diferentes tipos de leche y tratamientos térmicos	80
9	Análisis de varianza para proteínas del suero en los diferentes tipos de leche y tratamientos térmicos	81
10	Análisis de varianza para proteólisis y pH en los diferentes tipos de leche y tratamientos térmicos	82
11	Análisis estadístico para proteólisis en leches UHT	83
12	Análisis estadístico para HMF en leches UHT	85
13	Análisis estadístico para pH en leches UHT	87
14	Análisis estadístico para índice de sedimentación en leches UHT	89

1. INTRODUCCIÓN

Desde los años 1920, la leche concentrada convencional o evaporada ha sido un producto lácteo importante en el mundo, debido a que es un derivado lácteo nutritivo y saludable con una buena vida útil sin refrigeración. Esta cualidad de conservación hace que su transporte sea más fácil y por su concentración se reducen los costos de envasado, transporte y almacenamiento. El principal problema que se enfrenta en la producción de leche evaporada es la coagulación por calor durante el procesamiento, y la gelificación durante el almacenamiento. La concentración por evaporación térmica reduce marcadamente la estabilidad de la leche, hecho que se demuestra con una leche concentrada al 18% de sólidos totales que coagula en aproximadamente 10 minutos a 130°C.

Las leches concentradas son generalmente fabricadas de acuerdo a ciertos requisitos. En las industrias se especifican la concentración de sólidos totales, nivel de materia grasa, tratamiento térmico y condiciones de procesamiento. Los concentrados lácteos ofrecen economía en los costos de transporte y espacio de almacenamiento, pero deben ser transportados a una temperatura de 4°C a 5°C y utilizados dentro de 5 días para asegurar su calidad. El transporte en grandes cantidades de leche concentrada desde zonas productoras de leche a plantas procesadora de alimentos ubicadas a grandes distancias y cercanos a los mercados consumidores es una práctica cada vez mas común, sobre todo en Chile, donde las zonas productoras de leche se ubican en el sur del país y los mercados consumidores mas grandes se ubican en la zona central.

Por otra parte el tratamiento UHT de la leche implica un calentamiento continuo a temperaturas mayores de 130°C (usualmente 140-150°C) por un período de retención de unos pocos segundos (usualmente 2 a 10 segundos) seguido de un envasado aséptico para entregar un producto comercialmente estéril (Datta *et al.*, 2002).

Hasta el momento no se han realizado estudios en profundidad acerca del efecto que pueda tener para la calidad y estabilidad de leche UHT la utilización de leche concentrada descremada. A partir de lo anterior nace la hipótesis y objetivos de la presente investigación: La estabilidad y características fisicoquímicas de leche UHT fabricada a partir de leche descremada concentrada reconstituida no se alteran significativamente en comparación con leche UHT fabricada a partir de leche natural.

Objetivo general: Determinar el efecto generado sobre las características fisicoquímicas y de estabilidad de la leche UHT, cuando se utiliza como materia prima leche concentrada descremada reconstituida.

Objetivos específicos:

- Evaluar la utilización de leche concentrada descremada reconstituida a nivel industrial y en planta piloto y leche termizada a nivel de planta piloto para la elaboración de leche UHT. Se estudiarán los cambios producidos en los parámetros grado de proteólisis, pH, formación de hidroximetilfurfural y contenido de proteínas del suero en el producto recién elaborado.
- Medir el efecto de los tratamientos térmicos sobre los cambios producidos en los parámetros grado de proteólisis, pH, formación de hidroximetilfurfural e índice de sedimentación durante un periodo total de 90 días de almacenamiento

- Determinar el efecto de la temperatura de almacenamiento (20 y 35°C) sobre los parámetros grado de proteólisis, formación de hidroximetilfurfural, pH e índice de sedimentación.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Concentración de leche

La leche y los productos lácteos pueden concentrarse reduciendo el agua. Esto se hace para incrementar su vida útil y para disminuir su volumen (Walstra y Jenness, 1984).

El proceso de concentración consiste en evaporar el agua de productos lácteos líquidos. Para esto, el líquido debe alcanzar la temperatura de ebullición bajo una presión reducida, con el objeto de permitir la ebullición a una baja temperatura y asimismo prevenir los daños debido al calentamiento. De esta manera, el vapor de agua es removido continuamente hasta que se alcanza la concentración deseada. La evacuación de los vapores desprendidos se realiza mediante corrientes provocadas por las diferencias de presión absoluta (Walstra y Jenness, 1984; Spreer, 1991; Walstra *et al.*, 1999).

El proceso de concentración de la leche debe alterar lo menos posible el valor nutritivo, el sabor y el olor de la leche. Por otra parte el consumo de agua y de vapor han de mantenerse bajos con el fin de alcanzar un alto rendimiento de los equipos empleados manteniendo una vigilancia y control adecuados (Spreer, 1991).

La eficiencia y capacidad de los evaporadores ha aumentado en forma importante en los últimos 25 años. Los evaporadores de película descendente modernos están diseñados para tomar ventaja del vapor térmico o la compresión mecánica del vapor para reducir los requerimientos de vapor al evaporar el agua de la leche (Henning *et al.*, 2006).

Los límites del grado de concentración por evaporación (55% de materia seca en leche descremada) provienen principalmente de la idoneidad del concentrado lácteo para su procesado; el aumento de la viscosidad dificulta el flujo (también la transferencia de calor) y daña las superficies de los intercambiadores. Además la estabilidad de la leche disminuye con la concentración (Walstra y Jenness, 1984).

El nivel de concentración a menudo es controlado por medio de la densidad o el índice de refracción. Estos parámetros pueden ser determinados en el flujo de concentrado. Lo anterior permite el control automático del proceso evaporativo ajustando el vapor o el suministro de leche (Walstra *et al.*, 1999).

El grado de concentración puede ser definido como el factor de concentración Q , esto es la proporción de materia seca contenida en el producto concentrado dividido por la materia seca en el producto original. Por consecuencia, la masa de producto concentrado es $1/Q$ veces la masa antes de su concentración. La concentración de solutos aumenta proporcionalmente con Q (Walstra *et al.*, 1999).

Durante la concentración, algunas sustancias se vuelven supersaturadas y pueden precipitar luego de la cristalización. La leche ya está saturada con respecto a fosfato de calcio, como resultado de la concentración, la cantidad de fosfato asociado con las micelas de caseína aumenta. La lactosa se vuelve saturada en la leche a temperatura ambiente cuando $Q \approx 2.8$, pero fácilmente puede volverse supersaturada. Presumiblemente, la lactosa no cristalizará del todo si la leche es concentrada rápidamente (como en un secador spray) a un bajo contenido de agua (Walstra *et al.*, 1999).

2.1.1 Cambios a causa de la concentración. Además del aumento en la mayoría de las concentraciones de solutos, la extracción de agua desde la leche causa numerosos cambios en las propiedades, los cuales a menudo son proporcionales a Q^* . Los cambios además dependen de otras condiciones, tales como el tratamiento térmico y la homogeneización antes de la concentración. A continuación se indican algunos cambios de propiedades importantes:

- a. La actividad de agua disminuye.
- b. La higroscopicidad aumenta. Usualmente, un producto es denominado higroscópico si un ligero aumento de A_w causa un aumento considerable del contenido de agua.
- c. El equilibrio salino cambia. La actividad del Ca^{2+} aumenta ligeramente debido que el fosfato de calcio cambia a su estado insoluble. A raíz de este cambio, el pH disminuye de 0,3 a 0,5 unidades por $Q=2$ y $Q=3$ respectivamente. Para un $Q=2.5$ la fracción de Ca que se encuentra en solución disminuye de 0,4 a 0,3.
- d. La conformación de las proteínas cambia, debido a que la fuerza iónica (por lo tanto el grosor de la doble capa eléctrica), el pH y el equilibrio de otras sales cambia. Si la leche está altamente concentrada, también disminuye la calidad del solvente también. La coalescencia de la micela de caseína causa que aumente su tamaño. El aumento es menor si la leche ha sido intensamente precalentada, presumiblemente porque la β -lactoglobulina y otras proteínas del suero se han asociado con la caseína.
- e. Varias propiedades fisicoquímicas cambian. La presión osmótica, el punto crioscópico, el punto de ebullición, la conductividad eléctrica, la densidad y el índice de refracción aumentan, y la conductividad térmica disminuye.
- f. Las propiedades reológicas se ven afectadas. La viscosidad aumenta, el líquido se vuelve no-Newtoniano y finalmente como un sólido (a $Q>9$ para leche en polvo descremada). Esto es altamente dependiente de la temperatura.

- g. El coeficiente de difusión disminuye. A un bajo contenido de agua el efecto es muy fuerte. El coeficiente de difusión del agua disminuye de aproximadamente $10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ en leche en polvo entera a $10^{-16} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ en leche en polvo descremada con un bajo porcentaje de agua (Walstra *et al.*, 1999).

2.1.2 Reconstitución. Si un producto lácteo concentrado es diluido en agua a su composición original, se dice que se ha reconstituido. Puede tomar un tiempo considerable, unas 24 horas, para que los cambios reversibles ocurridos durante la evaporación se reviertan, esto principalmente debido a la distribución de las sales entre las micelas de caseína y el suero, y el tamaño y estructura de las micelas. Los cambios irreversibles (sabores extraños, pérdidas de nutrientes) que pudieran ocurrir durante la fabricación o almacenamiento de la leche concentrada o en polvo se mantienen en el producto reconstituido (Walstra y Jenness, 1984).

2.2 Definición del proceso UHT

El tratamiento UHT de la leche implica un proceso de calentamiento continuo a temperaturas mayores de 130°C (usualmente $140\text{-}150^{\circ}\text{C}$) por un período de retención de unos pocos segundos (usualmente 2 a 10 segundos) seguido de un envasado aséptico para entregar un producto “comercialmente estéril” que no necesita refrigeración. Bajo estas condiciones todos los microorganismos capaces de crecer bajo condiciones normales de almacenamiento del producto son destruidos siendo mínimos los cambios químicos, físicos y organolépticos (Datta *et al.*, 2002).

El proceso UHT debe reducir el contenido de enzimas y bacterias de un producto para obtener un nivel comercialmente estable que asegure la protección al consumidor y extienda su vida útil. Así como el proceso UHT ideal debe lograr un máximo efecto bactericida, también debe provocar un mínimo

deterioro químico, destruyendo todas las enzimas resistentes al calor (Perking, 1985).

Existen dos tipos principales de calentamiento UHT: directo e indirecto. El calentamiento directo involucra la mezcla de vapor muy caliente con la leche, mientras que el calentamiento indirecto involucra un intercambiador, el cual transfiere el calor a través de un separador entre la leche y el medio caliente, el cual puede ser vapor o agua caliente presurizada (Datta *et al.*, 2002).

2.2.1 Intercambio calórico directo. En este sistema de procesamiento se pueden utilizar dos métodos alternativos: el vapor puede ser inyectado dentro de la corriente de producto para obtener la temperatura de procesamiento requerida, o el producto puede ser dispersado dentro de una cámara que contiene vapor a la temperatura requerida. En ambos casos, el producto es precalentado por métodos indirectos a una temperatura apropiada (no menos de 80°C) antes de ser mezclado con el vapor. Este precalentamiento puede realizarse por regeneración con agua caliente o vapor al vacío, o una combinación de éstos (Datta *et al.*, 2002).

El enfriamiento de la leche se realiza por pulverización en una cámara de vacío donde además se extrae el agua incorporada mediante la inyección de vapor. Este proceso es seguido por un enfriamiento indirecto por regeneración con agua fría para obtener la temperatura requerida de envasado (Burton, 1981; Datta *et al.*, 2002).

2.2.2 Intercambio calórico indirecto. En este sistema de procesamiento existe una barrera física de conducción de calor entre el producto y el medio de calentamiento. Las plantas industriales que utilizan este sistema de calentamiento, emplean conjuntos de placas corrugadas, tubos o intercambiadores de calor de superficie raspada. Existen, además, sistemas

combinados que tienen intercambiadores de calor de placas en la secciones tubulares para las temperaturas mas altas, donde las presiones internas son también las más altas (Burton, 1981; Datta *et al.*, 2002).

En ambos sistemas de calentamiento se utiliza la regeneración térmica entre el producto caliente que sale y el producto frío que entra. Existen considerables diferencias en los ciclos tiempo-temperatura a los que los productos están sujetos en los sistemas de calentamiento anteriormente mencionados. Esto se debe a las diferentes tasas de transferencia térmica que se alcanzan (Czollak, citado por Gaimari, 1987).

2.2.3 Efectos de la temperatura de procesamiento. El procesamiento UHT destruye virtualmente todos los microorganismos presentes, tanto formas vegetativas como esporas, con cualquier organismo restante incapaz de crecer en el producto bajo condiciones normales de almacenamiento; esto asegura que la leche UHT tenga una larga vida útil sin refrigeración. Sin embargo, tales tratamientos térmicos además provocan cambios en las propiedades nutricionales y organolépticas de la leche. Además, pueden ocurrir cambios adicionales como pérdida de vitaminas, cambios de sabor y color, reacciones del tipo Maillard y gelificación durante el almacenaje (Elliot *et al.*, 2005).

Muchas reacciones tales como glicosilación no enzimática (reacción de Maillard), isomerización de azúcares y denaturación de proteínas del suero ocurren durante el tratamiento térmico de la leche. Formación de componentes (hidroximetilfurfural, furosina y lactulosa) o degradación de constituyentes originales (β -lactoglobulina) son indicadores potenciales de la severidad del proceso térmico (López-Fandiño y Olano, 1999; Morales y Jiménez-Pérez, 1999). Entre los factores que influyen en los cambios químicos que ocurren en la leche durante el calentamiento son: concentración de proteínas y azúcar, pH, temperatura, tiempo de calentamiento y contenido de sales.

Se pueden utilizar varios indicadores químicos y biológicos para evaluar los cambios inducidos durante el procesamiento y almacenamiento de la leche UHT. La carga térmica que recibe la leche puede estimarse midiendo indicadores como la lactulosa (Andrews, 1986; Morales *et al.*, 2000), furosina (Erbersdobler *et al.*, 1987), 5-hidroximetilfurfural (HMF), proteína denaturada del suero (Morales *et al.*, 2000) y triptofano soluble (Elliot *et al.*, 2005). Algunos de estos indicadores también cambian durante el almacenamiento, limitando su valor como indicadores de carga térmica en leches almacenadas.

2.2.3.1 Efectos sobre las proteínas. El calentamiento de las proteínas en solución promueve ciertas reacciones en la que están implicados grupos serín-fosfato, tiol, disulfuro, lisina y amidas de las cadenas laterales, pudiéndose escindir también algunos enlaces peptídicos. Las cadenas laterales de la caseína son fácilmente accesibles a las reacciones inducidas por el calor y las proteínas globulares del suero se hacen accesibles a consecuencia del desenrollado y desplegado resultante de la desnaturalización. Los enlaces peptídicos de la cadena polipeptídica se encuentran fundamentalmente en configuración trans, pero si se despliega la cadena peptídica, es posible una cierta isomerización a la estructura cis, que es menos estable. Los restos de prolina constituyen una excepción pues sus configuraciones cis y trans tienen una cierta estabilidad comparable y por lo tanto es de esperar que la isomerización sea más persistente. La isomerización posiblemente influencia las velocidades de las reacciones que ocurren en la proteína y previene la vuelta al estado nativo (no desnaturalizado) después del nuevo enrollamiento (Walstra y Jenness, 1984).

La caseína es menos sensible al calentamiento que las proteínas del suero, debido a las pequeñas estructuras secundarias y terciarias que las conforman. Sin embargo, las caseínas y sus estructuras moleculares sufren

cambios a temperaturas elevadas tales como desfosforilación, proteólisis, agregación, glicación, interacción con proteínas del suero (es decir κ -caseína y β -lactoglobulina) y modificaciones covalentes (Alais *et al.*, Fox, Guo *et al.*, citados por Morales Y Jiménez-Pérez, 1998). Se ha establecido que la disgregación de las micelas de caseína ocurre ordinariamente en los siguientes dos casos: remoción de calcio o fosfato de calcio coloidal y ruptura de uniones hidrofóbicas o puentes de hidrógeno. Durante el calentamiento, todas las fracciones de caseína (α_s , β y κ) son degradadas en diferentes formas, formando péptidos no dializables y péptidos de bajo peso molecular. Fox, citado por Morales y Jiménez-Pérez (1998), observó que la α_{s2} -caseína era la caseína más susceptible a la degradación térmica.

2.2.3.2 Reacción de Maillard y formación de hidroximetilfurfural. Los tratamientos térmicos en alimentos ricos en azúcares como la leche y los productos lácteos pueden conducir a la reacción de Maillard, en la cual azúcares reductores reaccionan con aminoácidos o proteínas originando productos que alteran el sabor, color, propiedades funcionales, valor nutritivo y vida útil de los productos, los cuales también pueden tener propiedades antioxidantes, mutagénicas o antimutagénicas (Pischetsrieder *et al.*, 1998).

La reacción de Maillard o reacción de pardeamiento no enzimático consiste en una serie de reacciones que se inicia mediante la condensación entre los grupos ε -amino libres de la lisina (aminoácido esencial abundante en la leche) y el grupo carbonilo de la lactosa (disacárido reductor abundante en la leche) (Evangelisti *et al.*, 1999).

Los productos iniciales de la reacción de Maillard entre las lactosa y los aminoácidos sufren de un reordenamiento denominado rearreglo de Amadori. Estos productos después de prolongados calentamientos o almacenajes son degradados a diferentes compuestos carbonilos. La producción, composición y

proporción de este paso de la reacción de Maillard depende principalmente del pH. Bajo control de pH los principales productos son 1-deoxiglucosona (pH neutro), 3-deoxiglucosona (pH levemente ácido), 4-deoxiglucosona, compuesto típico de disacáridos glicosídicos unidos mediante enlaces β -1-4 (pH levemente básico). Degradaciones posteriores de deoxiglucosonas conducen a la formación de compuestos que contienen nitrógeno tales como, pirralina, furanoneamina y piridona o a la formación de compuestos libres de nitrógeno tales como hidroximetilfurfural (HMF), galactosilisomaltol y β -piranona. Hidroximetilfurfural (HMF), galactosilisomaltol y pirralina son los principales compuestos intermediarios producidos en la reacción de Maillard (Monti *et al.*, 1999).

Los productos finales de la reacción de Maillard son compuestos de altos pesos moleculares, tales como polímeros y complejos pigmentados (premelanoidinas y melanoidinas), los cuales producen cambios indeseables en el color de las leches (Albala-Hurtado *et al.*, 1998).

La intensidad de los cambios producidos por la reacción de Maillard depende de la severidad del tratamiento térmico, aunque también parece estar correlacionado con la concentración de lactosa (Albala-Hurtado *et al.*, 1998; Evangelisti *et al.*, 1999), caseína, vitamina A y hierro (Caric *et al.*, Park y Hong, citados por Albala-Hurtado *et al.*, 1998). El tiempo que el producto es mantenido en almacenamiento y la temperatura a la cual es sometido, son factores críticos para el desarrollo de la reacción de Maillard (Hurrell y Finot, Van Mil y Jans, citados por Albala-Hurtado *et al.*, 1998).

Un producto intermediario en la formación de pigmentos durante la reacción de Maillard es el 5-(hidroximetil)-2-furaldehído (HMF), el cual se forma durante la deshidratación de hexosas (Anam y Dart, citados por Wunderlin *et al.*, 1998) y corresponde al HMF libre y el HMF total se obtiene mediante la

degradación ácida catalizada de la lactosa vía 3-deoxiosulosa. Sin embargo la formación de HMF libre es muy pequeña comparada con el HMF total (Morales y Jiménez-Pérez, 1999), este compuesto tiende a descomponerse en ácidos levulínico y fórmico (Alais, 1985). El HMF ha sido propuesto como un indicador de la intensidad del tratamiento térmico, del tiempo y condiciones de almacenaje y podría ser usado para diferenciar distintos tipos de leches procesadas (Akalin y Gönç, 1997; Albala-Hurtado *et al.*, 1998; Morales y Jiménez-Pérez, 1999). Los métodos espectrofotométricos han sido usados por muchos años y son a menudo el método oficial para la determinación de HMF en alimentos (Theobald *et al.*, 1998).

El HMF se forma a través de dos mecanismos distintos: por isomerización de la lactosa y también a través de reacciones de degradación de la lactosa. La última involucra una degradación de los productos de Amadori ϵ -N-(deoxil-1-D-fructosil)-L-lisina y ϵ -N-(deoxil-1-D-lactulosil)-L-lisina durante las etapas tempranas de la reacción de Maillard (Morales *et al.* citados por Datta *et al.*, 2002).

Zadow, citado por Peña (1995), señala que los valores de HMF en leches UHT aumentan con la temperatura de procesamiento y son aún mayores con el método de calentamiento indirecto. También hay un incremento con la temperatura y tiempo de almacenamiento. Según Fink y Kessler (1988), los valores de HMF para leche UHT fluctúan entre el rango de 1 a 10 $\mu\text{mol/l}$ y estos valores son significativamente diferentes de los obtenidos para leches esterilizadas (autoclavadas) en las cuales el rango de valores de HMF fluctúa entre 30 a 140 $\mu\text{mol/l}$.

La presencia de cantidades variables de HMF en leche cruda dificulta la interpretación de los datos obtenidos para leches procesadas (Burton, 1984; Van Boekel y Zia-Ur-Rehman, 1987). Sin embargo, tanto Akalin y Gönç (1997)

como Fink y Kessler (1988), indican que la determinación de HMF es un método barato, fácil y rápido para estimar la severidad del tratamiento térmico en las leches UHT y esterilizadas.

Se utilizan dos técnicas relativamente simples para medir HMF en leche: el método colorimétrico del ácido tiobarbitúrico (TBA) y un método por HPLC. El método TBA sobreestima el nivel de HMF debido a que el TBA no es específico al HMF y puede reaccionar con otros compuestos de Maillard que contengan un grupo aldehído. A pesar de este hecho, de todas maneras es un método barato y rápido para estimar el grado de calentamiento que una leche UHT ha recibido. El método HPLC es mas sensible y preciso que el TBA (Datta *et al.*, 2002).

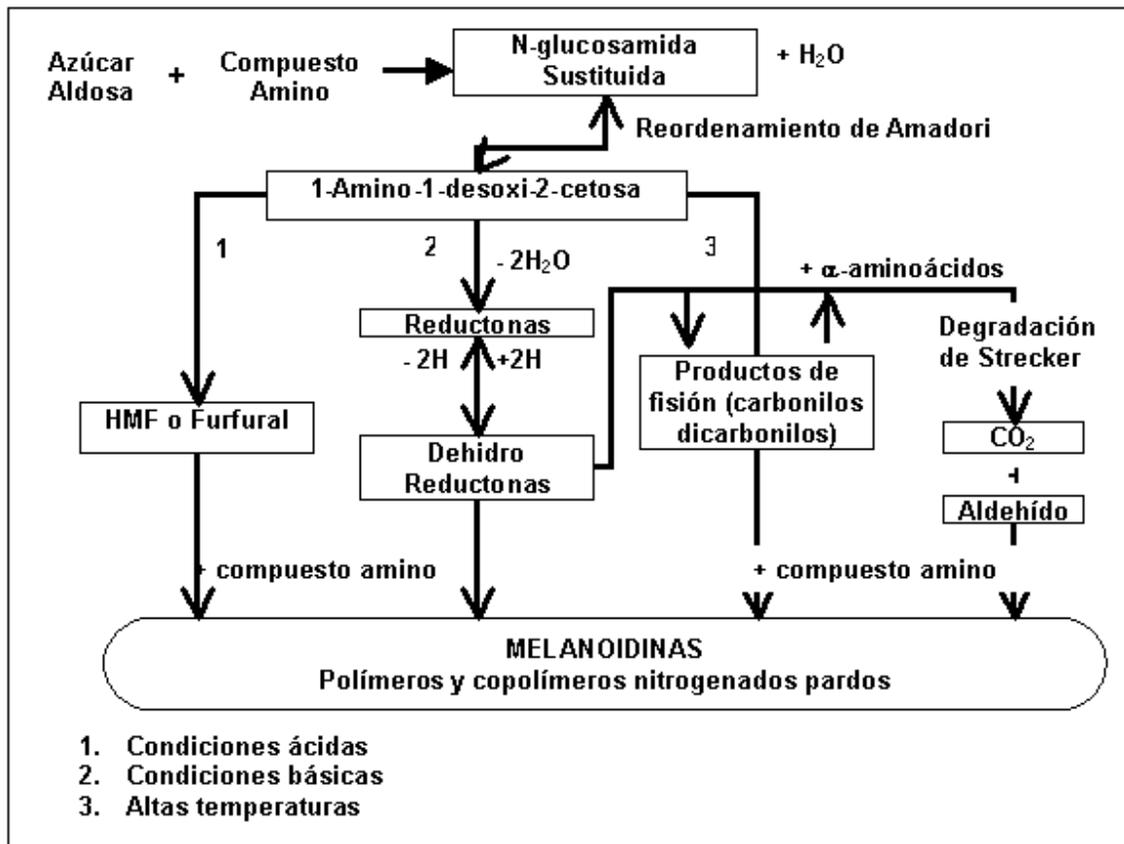


FIGURA 1. Reacción de Maillard.

FUENTE: Hodge citado por O'Brien y Morrissey (1989).

2.2.3.3 Alteraciones en el color de la leche. El estudio de los factores que influyen sobre las alteraciones en el color de la leche como consecuencia de los tratamientos térmicos, ha demostrado que por lo menos 2 reacciones separadas y aparentemente no relacionadas entre sí están involucradas. Burton, citado por Zadow (1971) y Blanc y Odett, citados por Peña (1995), señalan que el primer efecto de un tratamiento térmico es un incremento del grado de reflectancia (blanqueo o decoloración) de la leche, y es debido a la denaturación y precipitación de algunas proteínas del suero especialmente la β -lactoglobulina, originando un incremento en la difusión de la luz. El segundo efecto es el resultado de interacciones de lactosa-caseína, las que ocurren a temperaturas más elevadas y originan un descenso en el grado de reflectancia.

Alais (1985), afirma que la leche UHT obtenida por tratamiento térmico directo tiene una coloración muy blanca debido al aumento en la refringencia, producto de la desnaturalización de una fracción de las proteínas del suero.

2.2.3.4 pH de la leche. Las diferentes leches tienen una reacción iónica cercana a la neutralidad. La leche de vaca tiene una relación débilmente ácida, como consecuencia de la presencia de caseína y de los aniones fosfórico y cítrico, principalmente. Al respecto Alais (1985), menciona que un valor de pH normal de leche oscila entre 6,6 y 6,8 como consecuencia de la presencia de caseína y de los aniones fosfórico y cítrico, principalmente. Se han observado solamente cambios muy pequeños o ninguno en los valores de pH en leches UHT comparada con los valores iniciales de leche cruda (Renner y Schmidt citados por Flores, 1990).

2.3 Sedimentación y gelificación

La sedimentación en leches UHT es la primera fase del proceso mas complejo de la gelificación, y ha sido objeto de muchos estudios (Paggi *et al.*, 1985).

El tratamiento térmico de la leche a menudo crea agregados de proteína denaturada, lípidos, lactosa y sales inorgánicas que varían en composición. Estos agregados o sedimentan o se aglomeran en la superficie dependiendo de su tamaño, peso específico y carga eléctrica. La cantidad de sedimento depende de varios factores incluyendo la calidad de la leche cruda, tipo y severidad del tratamiento térmico, posición del homogeneizador, presión de homogeneización y temperatura de almacenaje. La sedimentación puede ocurrir inmediatamente después del procesamiento o durante el almacenamiento (Datta *et al.*, 2002).

La mayoría de las leches UHT desarrollan un ligero sedimento durante el almacenamiento pero esto normalmente no es un problema. Generalmente el procesamiento UHT directo produce mas sedimentación que el procesamiento indirecto, esto se atribuye al hecho de que no existe suficiente área de superficie caliente disponible durante el procesamiento directo que permita el depósito del sedimento y de esta manera sedimenta durante el almacenamiento. Burton citado por Datta *et al.* (2002) indica que el sedimento puede estar presente en el fondo de las cajas de leche UHT cuando no se ha quemado ni depositado en las paredes del intercambiador de calor.

La vida útil de la leche UHT esta limitada por la gelificación durante el almacenamiento, un fenómeno que aumenta la viscosidad de la leche durante el almacenamiento y eventualmente pierde fluidez hasta la formación de un gel (Datta y Deeth citados por Datta *et al.*, 2002). El gel es una red tridimensional de proteínas compuesta por cadenas entrelazadas de proteínas del suero y

caseína. El proceso de gelificación se caracteriza por un inicial adelgazamiento, seguido de un largo periodo de pequeños cambios, para luego dar paso a un abrupto aumento en la viscosidad y culminar con la formación de un gel dentro de 1 a 3 semanas. La gelificación que resulta en la leche le proporciona una consistencia aflanada, lo cual es una condición irreversible (Venkatachalam *et al.*, 1993).

La proteólisis en la leche UHT puede causar el desarrollo de sabores amargos que llevan a un aumento de viscosidad con una eventual gelificación durante el almacenaje, lo cual es un factor determinante de la vida útil de la leche UHT (Datta y Deeth, 2003). Las enzimas responsables de la proteólisis son, la proteasa alcalina nativa de la leche, la plasmina y las enzimas bacterianas termorresistentes, extracelulares, producidas por las bacterias psicrotróficas, las cuales contaminan la leche cruda (Datta y Deeth, 2003; Kelly y Foley, 1997). La plasmina está asociada con las micelas de caseína y degrada la β -caseína a γ -caseína y proteosa-peptona (Datta y Deeth, 2003). La actividad de la plasmina es mayor en leches mastíticas en comparación con la leche normal (Topçu *et al.*, 2006).

Las enzimas proteolíticas de origen bacteriano están presentes en la leche debido al crecimiento de bacterias psicrotróficas. Se ha observado que al almacenar leche cruda por más de 72 horas a temperaturas de refrigeración se producen proteinasas bacterianas termorresistentes que limitan de manera significativa la vida útil de la leche luego del tratamiento UHT (Mottar citado por Topçu *et al.*, 2006).

Las leches procesadas por sistemas de calentamiento UHT directo e indirecto difieren en su susceptibilidad a la gelificación en el almacenamiento. Para efectos bactericidas equivalentes, la leche esterilizada bajo métodos directos de calentamiento tienen más tendencia a gelificar que las leches

tratadas bajo métodos indirectos. Por ejemplo McKellar citado por Datta *et al.* (2002) observó gelificación entre 6 y 10 semanas a 20°C al utilizar calentamiento UHT directo pero no observó ni gelificación ni cambios de viscosidad durante el almacenamiento por 30 semanas a 20°C, habiendo utilizado calentamiento indirecto. La mayor estabilidad de las leches tratadas bajo el sistemas indirecto a la gelificación es atribuible a la mayor carga térmica del tratamiento térmico. Esto lleva a la producción de micelas de caseína mas estables en calentamiento indirecto que en el directo (Datta *et al.*, 2002).

Una explicación para que las leches tratadas de manera mas severa térmicamente, muestren una mayor resistencia a la gelificación radica en un nivel mayor de desnaturalización proteica. Manji y Kakuda (1988) observaron que leches con el 28% de proteínas del suero denaturada gelificaron luego de 115 días mientras que leches tratadas térmicamente de manera mas severa con un 66% de proteínas del suero denaturadas gelificaron luego de 150 días. La formación de complejos entre las proteínas del suero y las caseínas, particularmente de la β -lactoglobulina y κ -caseína, lo cual ocurre con la denaturación, juega un rol importante determinando la aparición de la gelificación. McMahon (1996) concluyó que un tratamiento térmico mas severo retrasa la gelificación debido a un aumento del alcance de entrecruzamiento entre micelas. Como consecuencia, la disociación del complejo entre la β -lactoglobulina denaturada y la κ -caseína de la micela se vuelve mas lento a medida de que está mas fuertemente unido a la micela. De esta manera la leche tratada bajo el sistema UHT indirecto es mas estable que la leche tratada bajo el proceso UHT directo (Datta *et al.* 2002).

Otra explicación para la menor tendencia a la gelificación de las leches UHT procesadas bajo sistemas indirecto es su menor nivel de proteólisis durante el almacenaje. La acción de las proteinasas, tanto nativas como las termo resistentes se cree un factor importante de inicio de la liberación del

complejo β -lactoglobulina- κ -caseína desde la micela de caseína, conduciendo a la gelificación (Datta *et al.*, 2002).

El problema de calidad mas serio que enfrentan los fabricantes de leche UHT es el fenómeno de la gelificación que ha sido descrito como coagulación; formación de una cuajada dulce; o formación de un gel tixotrópico. Este proceso ocurre en ausencia de bacterias viables e involucra la agregación de las micelas de caseína durante el almacenamiento para formar un gel (Venkatachalam *et al.* 1993).

2.4 Determinación del grado de proteólisis.

La medición de la proteólisis durante el almacenamiento es una herramienta importante para determinar la calidad y la vida útil potencial de la leche UHT (McKellar, 1981). Durante el almacenamiento de leche UHT pueden ocurrir cambios importantes, tales como aparición de productos de la reacción de Maillard y polimerización de la caseína, los cuales aumentan con el tiempo y la temperatura de almacenaje. Los cambios que involucran la proteína de la leche pueden afectar las mediciones de proteólisis durante el almacenamiento de leche UHT (Alkanhal, 2000).

La mayoría de los métodos utilizados para medir la proteólisis en la leche UHT durante el almacenaje pertenecen a dos grupos. El primer grupo incluye los métodos que miden aminoácidos aromáticos en péptidos solubles en ácido tricloroacético (TCA). Estos aminoácidos aromáticos son detectados por la reacción con el reactivo fenol de Folin-Ciocalteau como en los métodos de Hull (Hull, 1947) y Lowry (Lowry *et al.*, 1951). El otro grupo de métodos de detección de proteólisis miden los grupos amino libres en péptidos solubles en TCA. Estos incluyen a los métodos del ácido triclorobenzenosulfónico (TNBS) (Fields, 1971) y la fluorescamina (Schwabe citado por Alkanhal, 2000). Adicionalmente a los

métodos anteriores, Richardson y Newsted citados por Alkanhal (2000) usaron una determinación de nitrógeno no proteico (NPN) por Kjeldahl para seguir la proteólisis en leche UHT con adición de filtrado de cultivo.

En el método de Hull, los péptidos solubles en TCA mezclados con carbonato de sodio reaccionan con el reactivo fenol. Los grupos aromáticos hidroxilo en la tirosina y triptofano reducen al reactivo fenol y le dan una coloración azul y su intensidad es medida a 650 nm (Hull, 1947). Aún cuando el método de Hull es indicado como poco sensible para medir proteólisis debido a que las proteasas microbianas liberan bajas concentraciones de aminoácidos aromáticos desde la caseína, de acuerdo a Alkanhal (2000) el método de Hull y el del NPN son mas adecuados que el método del TNBS para comparar proteólisis de muestras de diferentes tipos de leches y para seguir la evolución de la proteólisis durante el almacenamiento en leche UHT. Recientemente Ayhan *et al.* (2005) utilizaron el método de Hull exitosamente para medir la proteólisis provocada por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en leche descremada.

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Lugar de desarrollo y duración de la investigación

Las leches UHT se elaboraron en la planta piloto del Instituto de Ciencias y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL) de la Universidad Austral de Chile (UACH) y también en la empresa Watt's S.A. Los análisis fisicoquímicos y microbiológicos de la materia prima, producto terminado y en almacenamiento, se realizaron en el mismo Instituto.

La etapa experimental se realizó durante los meses de Octubre y Diciembre de 2005 y Enero y Marzo de 2006.

3.2 Materiales

3.2.1 Materia prima

La materia prima y las muestras UHT fabricadas industrialmente fueron proporcionadas por la empresa Watt's S.A.

- Leche termizada descremada, proveniente de la planta Watt's Osorno
- Leche concentrada descremada reconstituida, procedente de la planta Watt's Loncoche.
- Leche UHT descremada fabricada a partir de concentrado reconstituido, procesada bajo sistema UHT indirecto, proveniente de la planta Watt's Loncoche.

3.2.2 Materiales y equipos de la planta piloto

- Preesterilizador Paasch-Silkeborg de intercambio calórico indirecto, modelo S-304. Velocidad de flujo 200 l/h
- Bomba de desplazamiento positivo de tres pistones Rannie, tipo 1650. Velocidad de flujo 200 l/h.
- Botellas de vidrio con capacidad de 300 ml, previamente esterilizadas para envasado del producto.
- Tarros de acero de 50 y 10 litros de capacidad.
- Para la recepción aséptica de las muestras se empleó un soplete dentro de una cámara especialmente habilitada.
- Campana de flujo laminar para el llenado de las botellas.

3.2.3 Materiales y equipo de laboratorio

- pHmetro Radiometer Copenhagen.
- Espectrofotómetro Spectronic Genesys 5
- Baños termorregulados
- Termómetros.
- Cronómetro.
- Material de vidrio (pipetas, matraces, embudos, etc.).
- Cámaras termorreguladas a 20°C y 35°C para el almacenamiento de las leches.

3.3 Métodos

3.3.1 Diseño experimental. Se realizó para este ensayo un diseño multifactorial, con tres factores principales y el efecto de sus interacciones. El primer factor en estudio fue el tratamiento térmico aplicado, el cual posee 3 niveles, el segundo factor fue el tiempo de almacenamiento, el cual posee 7 niveles, y el último factor en estudio fue la temperatura de almacenamiento, teniendo este factor 2 niveles. Se realizaron 3 repeticiones.

Los niveles para cada factor fueron los siguientes:

- Tratamientos térmicos:
 - Tratamiento 1 (T1): Leche termizada + 135°C/5" (planta Piloto)
 - Tratamiento 2 (T2): Leche concentrada reconstituida + 135°C/5" (planta Piloto)
 - Tratamiento 3 (T3): Leche concentrada reconstituida + 145°C/2" (planta Industrial)

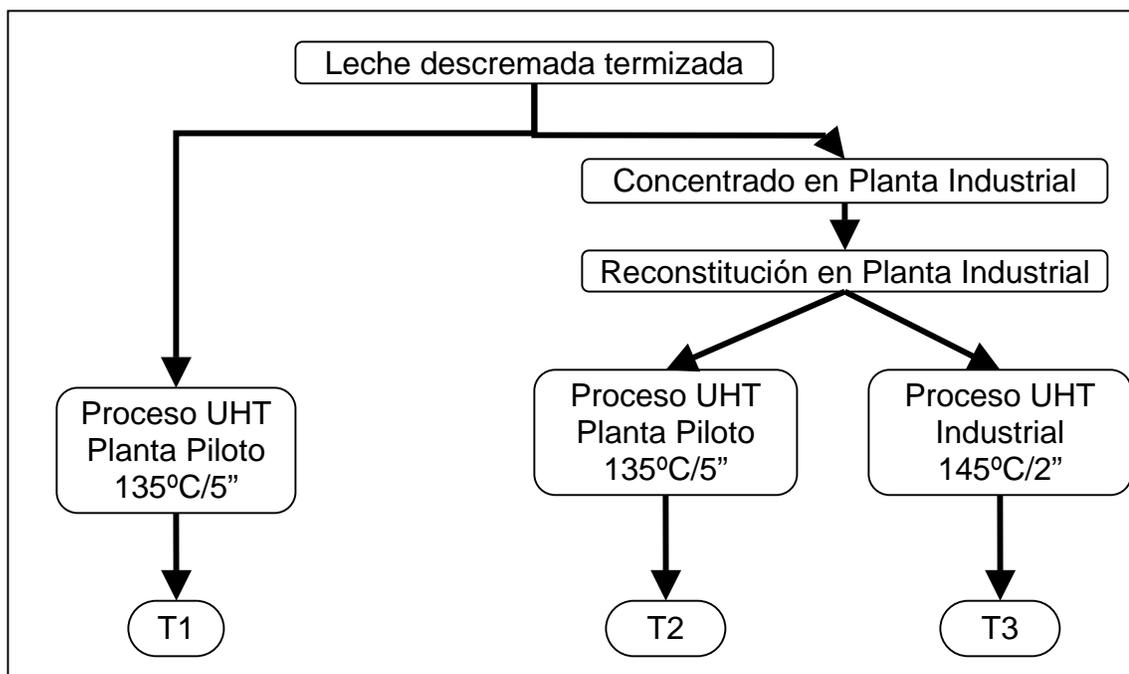


FIGURA 2. Diagrama explicativo de los tratamientos.

- Tiempo de almacenamiento: 0, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 días.
- Temperatura de almacenamiento: 20°C ± 1°C y 35°C ± 1°C.

En el ANEXO 1 puede observarse en detalle el protocolo de procesamiento del concentrado y en el ANEXO 2 el diagrama detallado de los tratamientos involucrados. Se trabajó bajo la condición de que la leche termizada utilizada sería de la misma partida que la leche concentrada reconstituida tanto en planta piloto como en planta industrial.

3.3.2 Cantidad de materia prima utilizada de acuerdo a diseño experimental. Se estimó una cantidad mínima de 40 litros de leche termizada y reconstituida para trabajar en el pre-esterilizador por tratamiento. Se almacenaron 14 botellas de 300 ml por tratamiento (T1 y T2), por cada temperatura de almacenamiento, para ser analizadas en los diferentes niveles del factor tiempo (0, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 días).

En el caso de las leches procesadas industrialmente (T3), se utilizaron 14 cajas Tetrapak de un litro por cada temperatura de almacenamiento, para ser analizadas en los diferentes niveles del factor tiempo.

3.3.3 Análisis fisicoquímicos y microbiológicos

3.3.3.1 Leche descremada termizada y leche concentrada descremada reconstituida.

- Determinación de pH: Potenciométrico (Chile, INN, 1979).
- Determinación de la proteína no desnaturalizada del suero: Método espectrofotométrico descrito por Folin-Ciocalteau (1927) y modificado por Lowry *et al.* (1951). Detallado en ANEXO 3.
- Grado de proteólisis: Método espectrofotométrico descrito por Hull (1947) con observaciones de Citti *et al.* (1963). Detallado en ANEXO 4.
- Determinación de hidroximetilfurfural (HMF): Método espectrofotométrico descrito por Keeney y Bassette (1959), modificado por Kahlhofer (1982). Detallado en ANEXO 5.

- Recuento total de bacterias mesófilas: Se realizó siguiendo la metodología descrita por Houghtby *et al.* (1992).
- Recuento de bacterias psicrótróficas: Se realizó siguiendo la metodología descrita por Houghtby *et al.* (1992).

3.3.3.2 Leche descremada UHT

- Determinación de pH: Potenciométrico (Chile, INN, 1979).
- Determinación de la proteína no desnaturalizada del suero: Método espectrofotométrico descrito por Folin-Ciocalteau (1927) y modificado por Lowry *et al.* (1951). Detallado en ANEXO 3.
- Grado de proteólisis: Método espectrofotométrico descrito por Hull (1947) con observaciones de Citti *et al.* (1963). Detallado en ANEXO 4.
- Determinación de hidroximetilfurfural (HMF): Método espectrofotométrico descrito por Keeney y Bassette (1959), modificado por Kahlhofer (1982). Detallado en ANEXO 5
- Determinación del índice de sedimentación: Método descrito por Rustom *et al.* (1995), modificado por Cano-Ruiz y Richter (1998). Detallado en ANEXO 6.

Análisis estadístico. Para el análisis de datos obtenidos en las determinaciones fisicoquímicas se efectuó un análisis de varianza multifactorial de orden 3x2x7 y el efecto de sus interacciones, con una previa comprobación de supuestos. Posteriormente se realizó un análisis de comparaciones múltiples (test de Tukey), para los factores principales. Aquellos datos agrupados por parámetro determinado (Grado de proteólisis, HMF, pH) que no se definieron como paramétricos fueron transformados con funciones tales como $\log_{10}(x+1)$, $\log_{10}(x)$ y raíz cuadrada de cada dato (X) para poder realizar análisis de varianza y comparaciones de múltiples de Tukey. Para evaluar específicamente el comportamiento de las variables a través del tiempo, se realizaron regresiones lineales para cada parámetro en función del tiempo del tiempo de

almacenamiento y de los factores analizados en el presente estudio. En el caso de los datos de índice de sedimentación, al tratarse de datos no paramétricos se realizó un análisis de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Tukey por rangos.

Adicionalmente en el tiempo 0 se midió el contenido de proteínas no desnaturalizadas del suero, grado de proteólisis, contenido de HMF y pH en leches termizada, T1, leche reconstituida, T2 y T3. Los datos fueron analizados mediante un ANDEVA de una vía.

El análisis estadístico se realizó mediante los softwares Statistica 6.0 y Sigmastat 3.1

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Análisis de variables en los diferentes tipos de leche y tratamientos térmicos.

Los resultados de los análisis químicos y su correspondiente análisis estadístico (ANEXOS 8,9 y 10) para la leche termizada, reconstituida y los tratamientos T1, T2 y T3 al tiempo 0 se presentan en el CUADRO 1. Los resultados de los análisis microbiológicos de recuento total de bacterias mesófilas y psicrótróficas se presentan en el anexo 6.

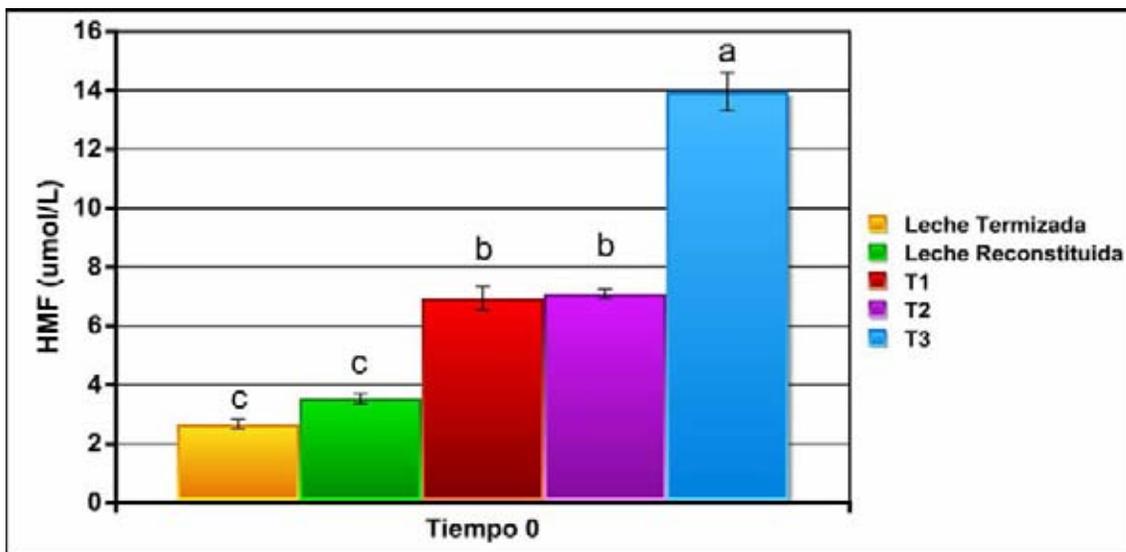
CUADRO 1. Promedios de parámetros fisicoquímicos y enzimáticos evaluados en leche termizada, reconstituida y tratamientos T1, T2 y T3.

Tipo de leche	HMF ($\mu\text{mol/L}$)	Proteólisis (mg Tirosina/5ml filtrado)	Proteína no desnaturalizada del suero (mg Proteína/ml de suero)	pH
Termizada	2,598 c	0,0453 a	7,004 a	6,683 a
Reconstituida	3,463 c	0,0473 a	2,455 b	6,723 a
T1	6,869 b	0,0447 a	2,639 b	6,673 a
T2	7,022 b	0,0487 a	1,437 c	6,720 a
T3	13,886 a	0,0490 a	0,365 d	6,717 a

* Letras distintas en columnas indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$).

A partir del CUADRO 1 y el GRÁFICO 1 se puede apreciar que los valores de Hidroximetilfurfural (HMF) para los tratamientos T1 y T2 fueron significativamente mayores en comparación con las leches termizada y reconstituida, y a su vez el tratamiento T3 fue significativamente diferente a todos los anteriores, siendo éste el tratamiento térmico más intenso. A partir de

los resultados puede establecerse que el proceso de concentración genera productos intermediarios de la reacción de Maillard suficientes para obtener un valor mas alto de HMF en la leche reconstituida respecto de la termizada, así como en el tratamiento T1 con respecto al T2, sin embargo las diferencias no fueron significativas entre ellos (CUADRO 1). Sin embargo los valores de HMF son muy variables, Morales *et al.*(2000) encontraron valores promedio de 1,5 $\mu\text{mol/L}$ para leche termizada y 2,5 $\mu\text{mol/L}$ para leche pasteurizada, también Fink y Kessler (1986) registraron valores de HMF de 3,6 a 7,3 $\mu\text{mol/L}$. Van Boekel y Zia-Ur-Rehman (1987) encontraron que los niveles de HMF en leche cruda variaban de 3 a 7 $\mu\text{mol/L}$.



* Letras distintas en columnas indican diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$).

GRÁFICO 1. Contenido de hidroximetilfurfural en los diferentes tipos de leche y tratamientos térmicos.

Los valores obtenidos en el caso de T1 y T2 fueron de 6,87 y 7,02 $\mu\text{mol/L}$ de HMF y para T3 se obtuvo un valor de 13,89 $\mu\text{mol/L}$, estos resultados concuerdan con los reportados por Elliot *et al.* (2003), quienes encontraron valores de 15,2 $\mu\text{mol/L}$, 10,4 $\mu\text{mol/L}$ y 8,6 $\mu\text{mol/L}$ para leches UHT tratadas bajo

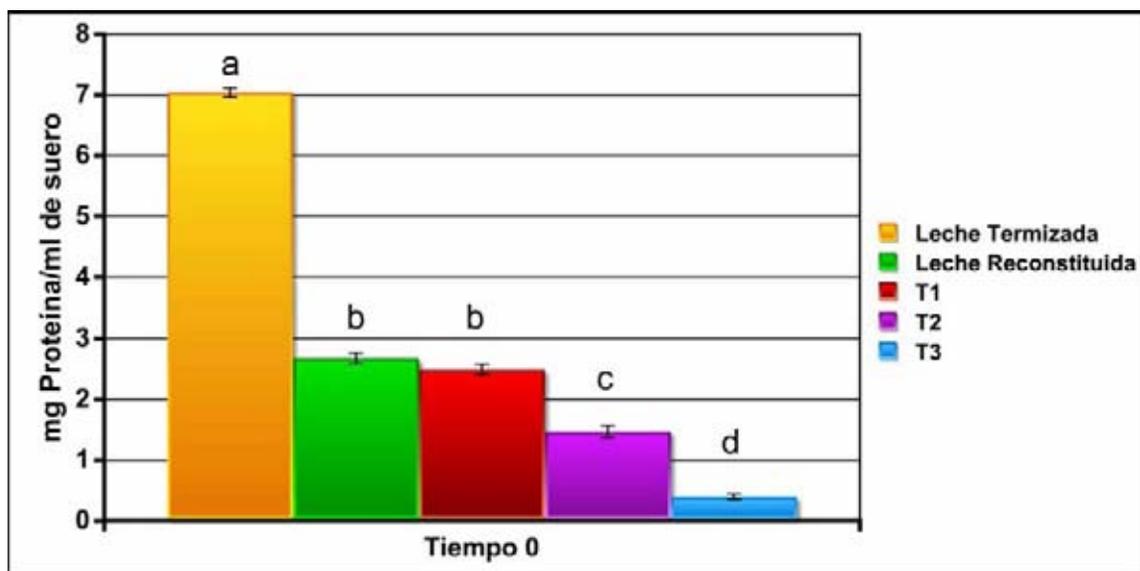
sistema UHT indirecto, previamente almacenadas por 0, 2 y 4 días antes de procesarla respectivamente. Los datos obtenidos también concuerdan con lo señalado por Mottar y Naudts citados por Datta *et al.* (2002), los cuales indican valores de 5,2 a 16,8 $\mu\text{mol/L}$.

Los niveles de HMF en la leche cruda pueden ser variables, por ello es necesario tomar en cuenta la cantidad de HMF presente en la leche cruda para determinar que cantidad se generó a causa de los tratamientos térmicos Datta *et al.* (2002).

Tanto el contenido de HMF como el de proteínas no desnaturalizadas del suero pueden ser utilizados como una forma de determinar la carga térmica de la leche en su procesamiento (Elliot *et al.*, 2005). Así, al analizar los valores de proteína del suero es posible apreciar una tendencia al incremento de la desnaturalización, en relación a la intensidad de los procesos térmicos aplicados. Según el análisis de varianza se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la leche termizada, leche reconstituida y los tratamientos T1, T2 y T3, diferencias que pueden observarse en el CUADRO 1 y GRÁFICO 2 (ver ANEXO 9).

De acuerdo a los datos obtenidos hubo una desnaturalización del 64,9% de las proteínas del suero debido al proceso de concentración, esto podría atribuirse al uso de temperaturas mayores durante el transcurso de la concentración. Las temperaturas utilizadas en la concentración de la leche utilizada en esta investigación fueron 67 ± 5 , 62 ± 5 , 56 ± 5 y $49 \pm 5^\circ\text{C}$ para cada uno de los 4 efectos del evaporador empleado. De acuerdo a Walstra *et al.* (1999) las temperaturas dentro de un evaporador de varios efectos puede variar entre 70°C y 45°C . De acuerdo a Pagliarinni *et al.* (1990), la desnaturalización de las proteínas del suero es total en pocos segundos a temperaturas que exceden los

95°C. Al respecto Law *et al.* (1994) señala que las proteínas del suero son sensibles a temperaturas sobre los 60°C, las cuales desarrollan desnaturalización que involucra la pérdida de la conformación globular de las proteínas. Si el tratamiento térmico es suficientemente severo los cambios se vuelven irreversibles y las proteínas del suero se asocian a las micelas de caseína a través de interacciones disulfuro y precipitan junto a las caseínas al llegar a un pH 4,6.



* Letras distintas en columnas indican diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$).

GRÁFICO 2. Contenido de proteína no desnaturalizada del suero en los diferentes tipos de leche y tratamientos térmicos.

Asimismo al analizar el contenido de proteínas no desnaturalizada del suero en los tratamientos T1, T2 y T3 podemos encontrar que existió un 62,3%; 79,5% y 94,8% de desnaturalización para cada tratamiento respectivamente. De acuerdo a lo anterior, aparece el tratamiento T3 como el mas afectado por la temperatura. Al respecto podemos afirmar que la desnaturalización de las leches analizadas fue mayor a medida que los tratamientos térmicos fueron aditivos y mayores en intensidad y duración. De acuerdo a Peña (1995) la

desnaturalización en leches UHT tratadas a previamente a 72°C/15s y luego a 135°C/5s es de 68,8%.

Law *et al.* (1994), midiendo el efecto de la desnaturalización de las proteínas solubles, con temperaturas en un rango de 72°C a 140°C y con periodos de retención entre 15 segundos a 5 minutos, detectaron que, con tiempos de 1 minuto las fracciones de inmunoglobulina y albúmina del suero fueron mas afectadas entre 72°C y 90°C, mientras que β -lactoglobulina fue mas afectada en un rango de 72°C a 120°C, y la α -lactoglobulina a temperaturas entre 72°C y 140°C.

Tanto para los valores de pH como para los valores de proteólisis no existieron variaciones significativas entre la leche termizada y la leche reconstituida. Esto indicaría que no hubo alteraciones de tipo microbiano, dadas las condiciones adecuadas de conservación del producto durante el transporte del concentrado y su posterior reconstituido.

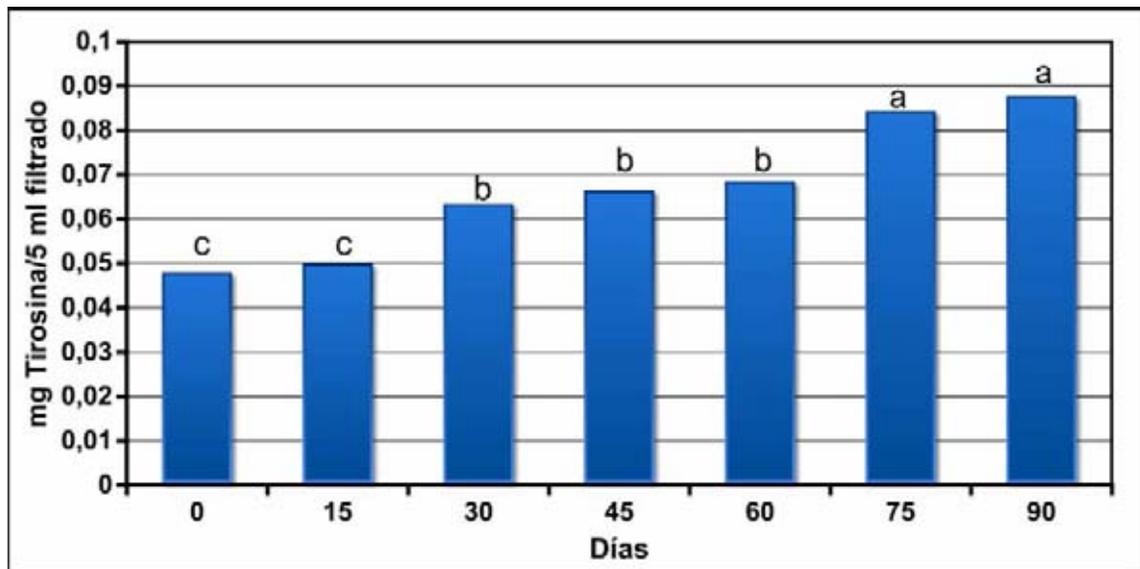
4.2 Comportamiento de las variables analizadas en el transcurso del almacenamiento.

Durante 90 días, las leches UHT elaboradas, fueron almacenadas a 20°C y 35°C, evaluando el efecto sobre las variables seleccionadas.

4.2.1 Evolución del grado de proteólisis. El promedio de los valores obtenidos para el análisis de este parámetro y el resultado de los análisis estadísticos pueden observarse en el ANEXO 11.

De acuerdo a Núñez y Núñez citados por Guerrero *et al.* (2003), lo que se cuantifica mediante el método de Hull, es una proteólisis general que incluye

la acción acumulada de las proteasas bacterianas y otras enzimas sobre las proteínas de la leche.



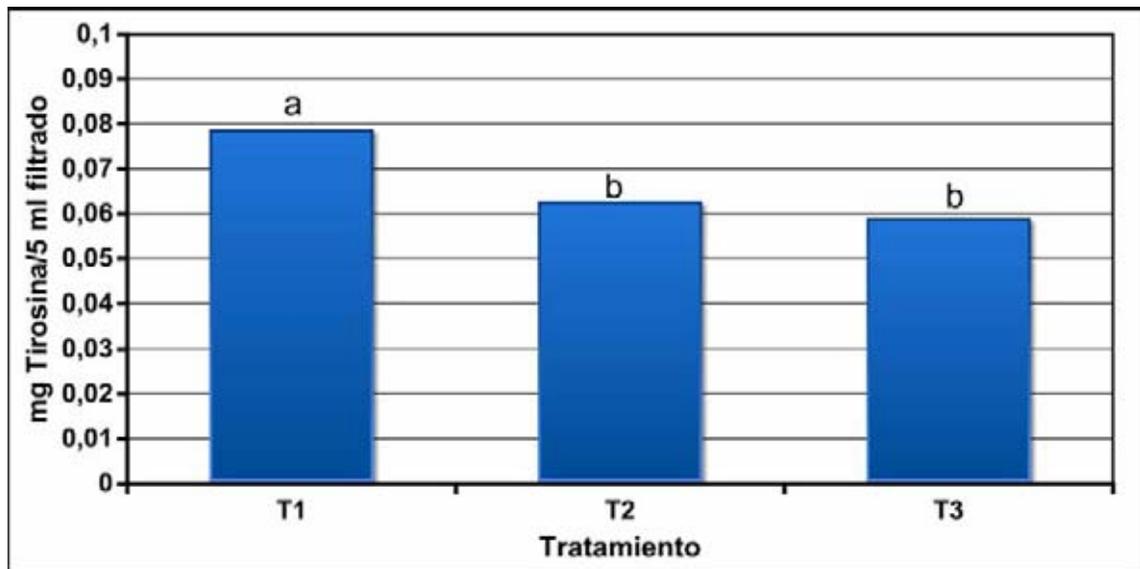
* Letras distintas en columnas indican diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$).

GRÁFICO 3. Evolución del grado de proteólisis durante el tiempo de almacenamiento.

En el GRÁFICO 3 puede observarse la evolución del grado de proteólisis considerando el factor tiempo de almacenamiento, observándose que para este parámetro se presentó un aumento significativo durante el tiempo, alcanzando los máximos valores para el grado de proteólisis a los 90 días. Las mediciones periódicas de esta variable fueron estadísticamente diferentes a partir de los 30 días y luego a partir de los 75 días (GRÁFICO 3).

Los resultados de este estudio concuerdan con los obtenidos por Flores (1990), Poblete (2000) y Topçu *et al.* (2006), quienes observaron la variabilidad de la proteólisis en leches UHT durante el almacenaje en condiciones similares a esta investigación, encontrando que estos valores aumentaban con el tiempo

de almacenamiento, siendo mas intenso el desarrollo de la proteólisis durante los últimos días.



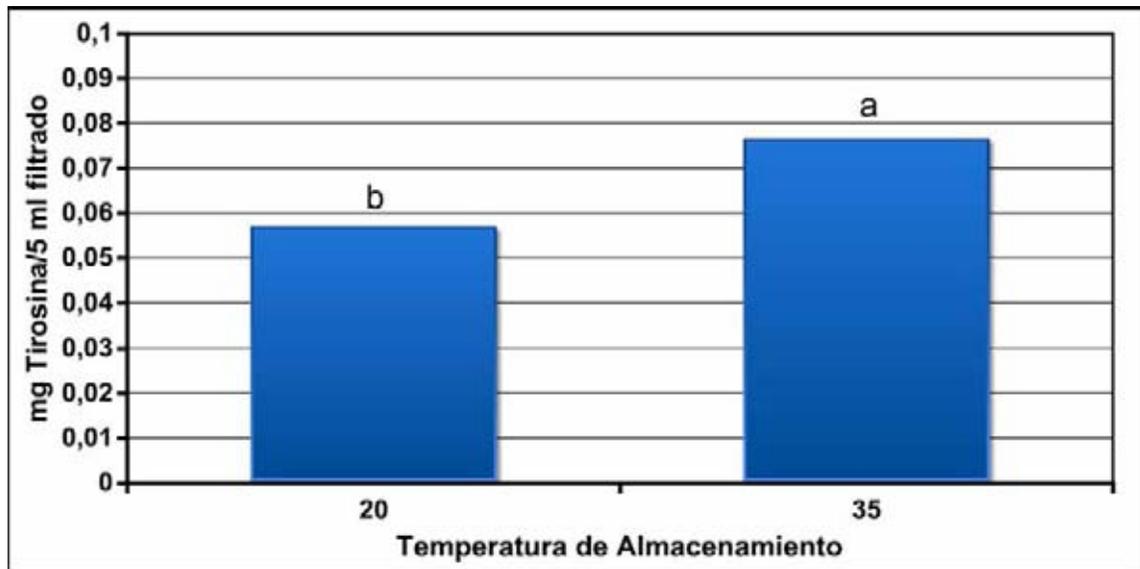
* Letras distintas en columnas indican diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$).

GRÁFICO 4. Comparación del grado de proteólisis a distintos tratamientos térmicos aplicados.

En el GRÁFICO 4 puede observarse una comparación de la proteólisis considerando el factor tratamiento, donde el grado de proteólisis en T1 fue estadísticamente diferente a T2 y T3. Estos resultados concuerdan con lo indicado por Poblete (2000) y Topçu (2006) quienes encontraron que a medida que los tratamientos térmicos son mas severos, el grado de proteólisis se ve reducido, al haber una mayor inactivación de las enzimas responsables de la degradación de las proteínas.

En el GRÁFICO 5 se aprecia una comparación del grado de proteólisis considerando el factor temperatura de almacenamiento, observándose diferencias significativas, de esta manera se pudo detectar una mayor proteólisis para la temperatura de almacenamiento de 35°C. Los resultados

concuerdan con lo indicado por Flores (1990) y Poblete (2000), los cuales llegaron a la conclusión que a mayor temperatura de almacenamiento el grado de proteólisis también es mayor, debido a que la temperatura óptima para la actividad de las proteasas bacterianas se encuentra entre los 30°C y 45°C.

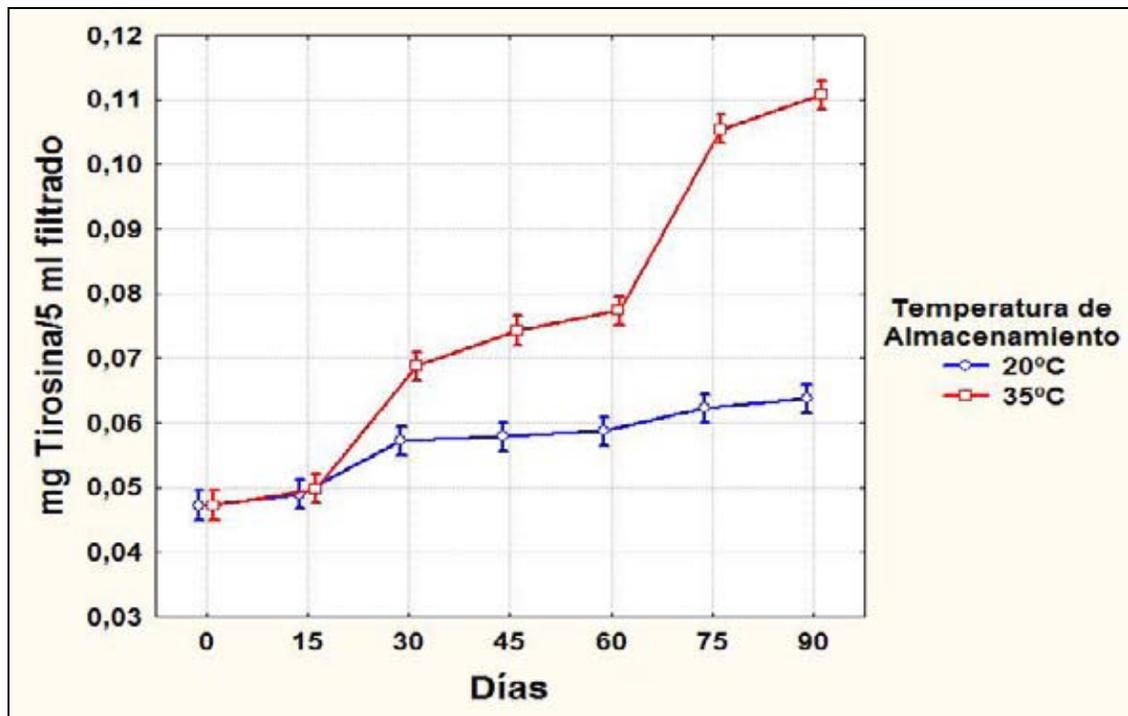


* Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$).

GRÁFICO 5. Comparación del grado de proteólisis a dos temperaturas de almacenamiento.

Numerosos investigadores han observado la hidrólisis de proteínas durante el almacenamiento de leches procesadas mediante el tratamiento UHT, y respecto a la modificación de la distribución de las porciones nitrogenadas de la leche, señalan que al degradar las proteínas, las proteasas provocan la aparición de proteasas-peptonas, de péptidos y aminoácidos. La proteólisis se traduce en un aumento del Nitrógeno no proteico y del Nitrógeno no caseínico, indicando actividad proteolítica, y por lo tanto, en una disminución del Nitrógeno caseínico, implicando la estabilidad micelar. Este efecto se acentúa con el aumento del tiempo y la temperatura de almacenamiento (Picard *et al.*, 1994). Mediante el análisis de varianza efectuado para la variable grado de proteólisis

(ANEXO 11) se estableció la influencia significativa de interacciones tales como temperatura de almacenamiento y tratamientos térmicos, sobre la evolución de la proteólisis en las leches UHT durante el tiempo de almacenaje. El efecto de dichas interacciones se puede observar en los GRÁFICOS 6 y 7.



* Las barras verticales indican intervalo de confianza.

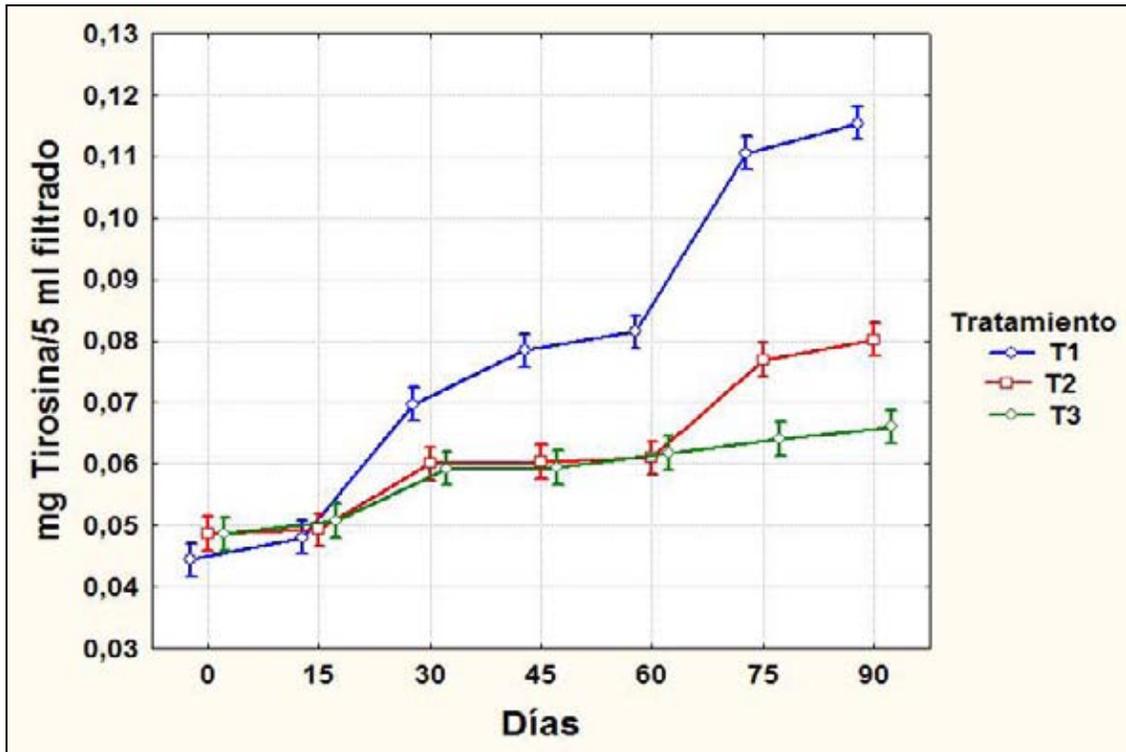
GRÁFICO 6. Interacción entre temperatura y tiempo de almacenamiento para el grado de proteólisis en leches UHT.

La variación del grado de proteólisis a través del tiempo en función de la temperatura de almacenamiento, determina que en el estudio realizado se obtuvieron los valores máximos para la leche almacenada a 35°C a partir de los 30 días, siendo independiente el grado de proteólisis de la temperatura de almacenamiento para los primeros 15 días.

Al observar el GRÁFICO 6, se puede decir que el desarrollo de la proteólisis durante el almacenamiento de leches UHT, se ve favorecida con tiempos prolongados de almacenaje a elevadas temperaturas. La influencia significativa en el desarrollo de la proteólisis, de la interacción tiempo y temperatura de almacenamiento, también fue observada por Postigo (1986), Flores (1990) y Poblete (2000).

Samel *et al.*, citados por Flores (1990), mencionan que la magnitud de descomposición de las proteínas depende del tiempo y de la temperatura de almacenamiento y observaron que esta descomposición fue muy significativa cuando las muestras de leche se almacenaron a 37°C. Por su parte López citado por Acosta (1995), encontró que la proteólisis (estimada por la formación de grupos aminos libres solubles en ácido tricloroacético al 12%) en leches UHT comerciales, aumentó gradualmente con el tiempo de almacenamiento (3 meses) a temperaturas de 20°C y 30°C, reportando valores de proteólisis superiores para las leches almacenadas a 30°C.

Referente a la interacción entre los factores tratamiento térmico y tiempo de almacenamiento, el grado de proteólisis durante el almacenaje de la leche UHT varía en función del tratamiento. Durante los 15 primeros días la variación en el grado de proteólisis para las distintas temperaturas de proceso no fue importante, luego a partir de los 30 días se presentan valores máximos de proteólisis para el tratamiento T1, y a partir de los 75 días se produce una diferencia entre T2 y T3, donde T3 mantiene el menor grado de proteólisis (GRAFICO 7). Lo anterior concuerda con la información entregada por Poblete (2000) y Topçu (2006) los cuales indican que a medida que los tratamientos térmicos se hacen mas fuertes el grado de proteólisis se ve reducido, a causa de una mayor inactivación de las enzimas responsables de la degradación de las proteínas.



* Las barras verticales indican intervalo de confianza.

GRÁFICO 7. Interacción entre tiempo de almacenamiento y tratamiento térmico para grado de proteólisis en leches UHT.

Debido a que la evolución de la proteólisis a través del tiempo varía en función de las tratamientos térmicos y almacenamiento, se han realizado regresiones lineales que caracterizan de mejor manera esta variación, presentándose en las GRÁFICOS 8 y 9.

A partir del GRÁFICO 8 se puede observar que la evolución de la proteólisis a través del tiempo para los tratamientos T1, T2 y T3 se ajusta a regresiones lineales que explican las variaciones de proteólisis durante el almacenamiento a 20°C. Las rectas de regresión indican que la variación de

proteólisis en T1, T2 y T3 es de aproximadamente 7,7; 5,2 y 4,4 % respectivamente cada 15 días.

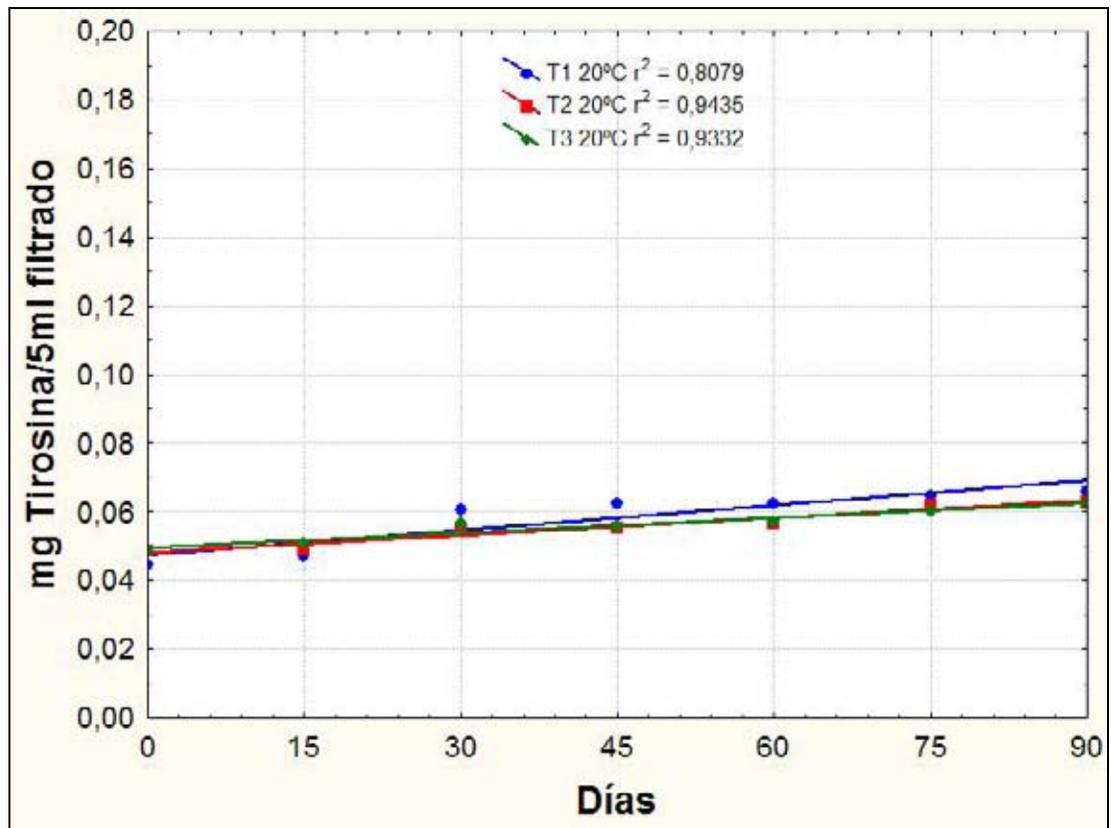


GRÁFICO 8. Variación del grado de proteólisis a través del tiempo en leches UHT almacenadas a 20°C.

Para las leches almacenadas a 35°C, como puede observarse en el GRÁFICO 9, la evolución del grado de proteólisis se ajusta a regresiones lineales con un buen coeficiente de determinación (r^2), donde los tratamientos T1, T2 y T3 presentan variaciones de grado de proteólisis de 62,3; 16,7 y 7,2 % respectivamente cada 15 días

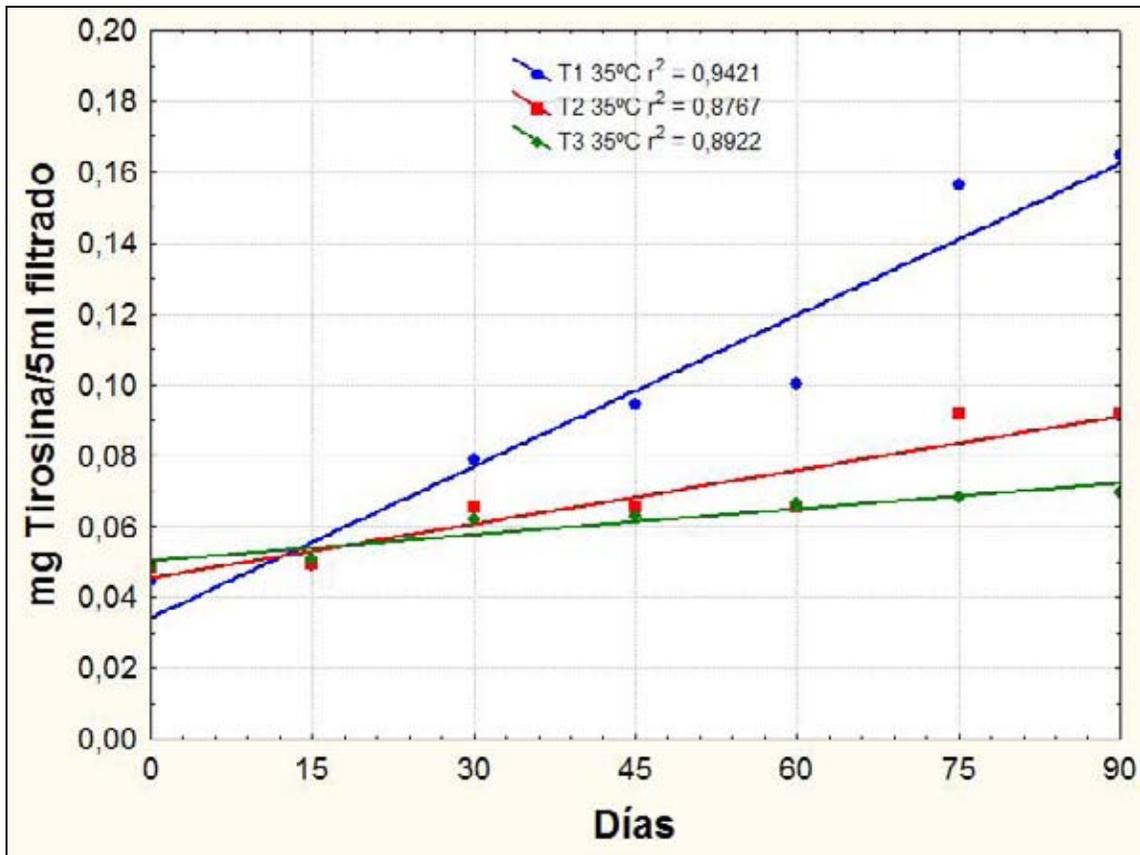


GRÁFICO 9. Variación del grado de proteólisis a través del tiempo en leches UHT almacenadas a 35°C.

4.2.2 Evolución del contenido de HMF El promedio de los valores obtenidos para el análisis de este factor y el resultado de los análisis estadísticos efectuados se presentan en el ANEXO 12.

Como puede observarse en el GRÁFICO 10 y 11, el contenido de hidroximetilfurfural estuvo entre 5 y 24 μM , esto concuerda con lo señalado por International Dairy Federation (IDF/FIL, 1981) que establecen un promedio de 17 $\mu\text{mol/L}$, y también con lo indicado por Mottar y Naudts citados por Datta *et al.* (2002), los cuales encontraron valores de 5,2 a 16,8 $\mu\text{mol/L}$ para 15 leches

procesadas mediante el tratamiento UHT indirecto, asimismo también concuerda con lo reportado por Renner y Dorguth citados por Datta *et al.* (2002) que indican valores de 6,0 a 21,4 $\mu\text{mol/L}$ para 37 leches procesadas mediante el tratamiento UHT indirecto.

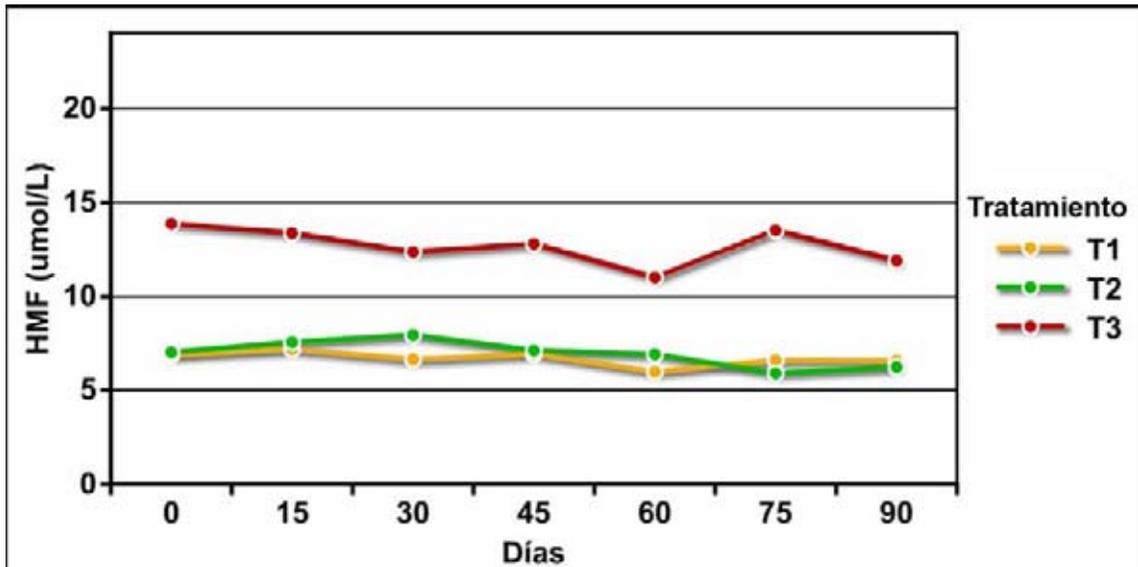


GRÁFICO 10. Evolución del contenido de hidroximetilfurfural en leches UHT almacenadas a 20°C.

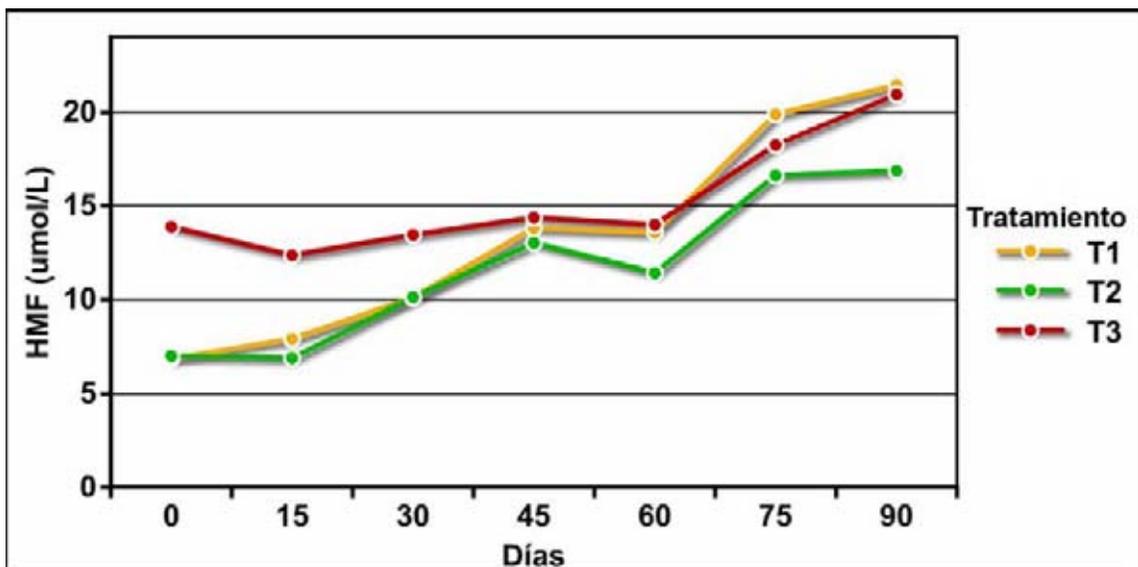
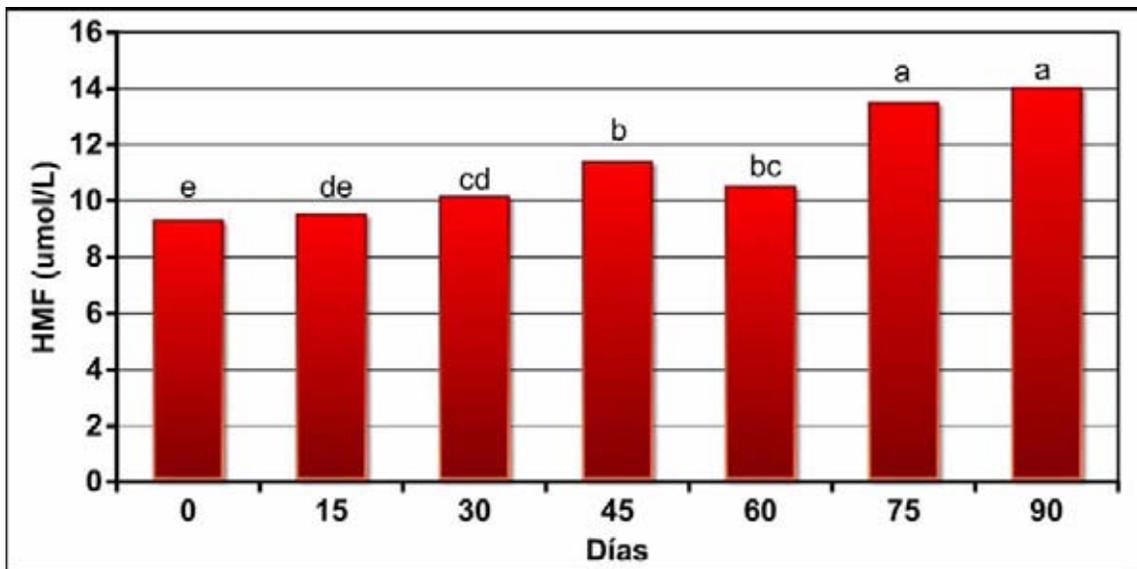


GRÁFICO 11. Evolución del contenido de hidroximetilfurfural en leches UHT almacenadas a 35°C.

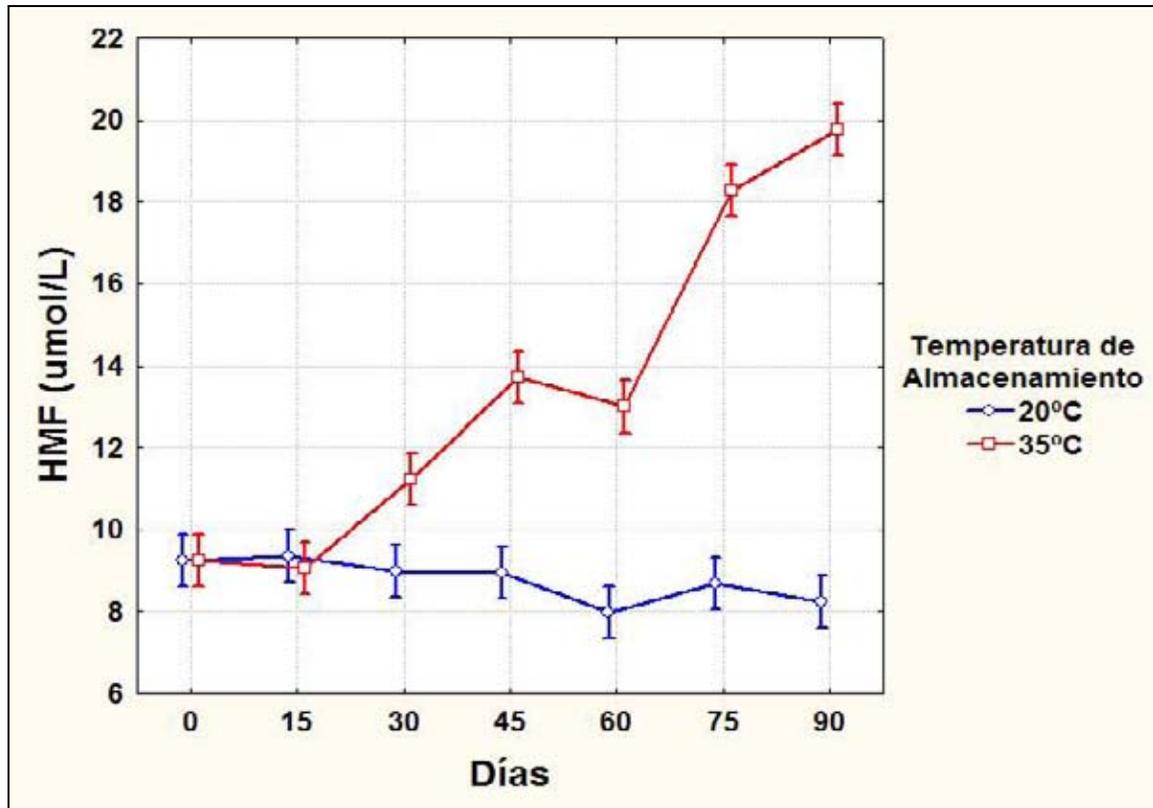
A partir del GRÁFICO 12 se puede observar el comportamiento que experimenta el contenido de HMF considerando el factor tiempo de almacenamiento, observándose que los valores de HMF a través del tiempo van en aumento. Los resultados obtenidos al tiempo 0 pueden ser explicados por una acumulación en la concentración de HMF inmediatamente después del tratamiento térmico. El HMF es un producto intermediario de la reacción de Maillard, por ello se presume que, a medida que la reacción continúa durante el almacenamiento de la leche, el contenido de HMF debiera aumentar proporcionalmente (Jiménez-Pérez *et al.*, 1992; Akalin y Gönç, 1997), sin embargo al no observar aumentos sustanciales y constantes variaciones en los valores de HMF durante el almacenamiento, estos autores así como Datta *et al.* (2002) y Elliot *et al.* (2003) atribuyen este comportamiento a la posibilidad de que parte del HMF generado durante el almacenaje se pierde por oxidación u otras transformaciones.



* Letras distintas en columnas indican diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$).

GRÁFICO 12. Evolución de contenido de HMF durante el tiempo de almacenamiento.

A partir del análisis de varianza realizado para la variable HMF (ANEXO 12) se determinó que ciertas relaciones influyen significativamente en el contenido de HMF de las leches durante el almacenaje, observándose este efecto en los GRÁFICOS 13 y 14.



* Las barras verticales indican intervalo de confianza.

GRÁFICO 13. Interacción entre tiempo de almacenamiento y temperatura de almacenamiento para HMF en leches UHT.

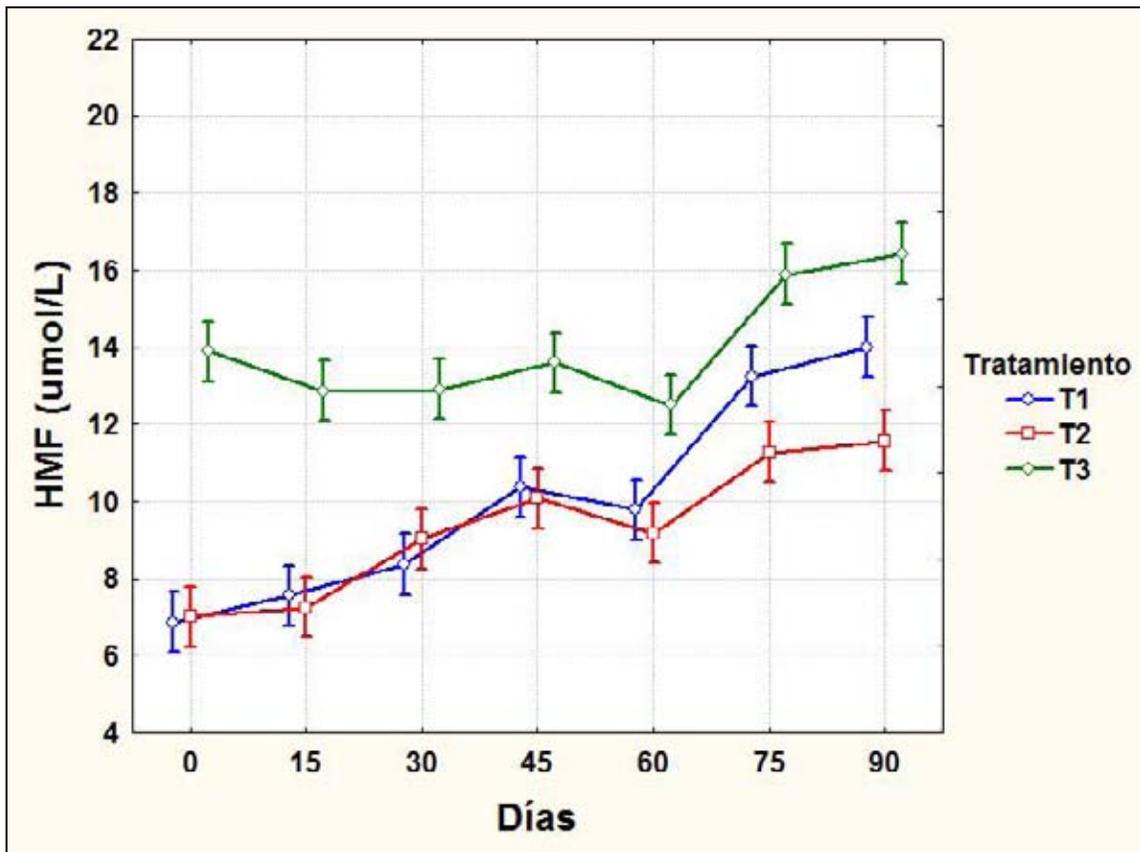
A partir del GRÁFICO 13 se observan fluctuaciones en el contenido de HMF de las leches UHT durante el tiempo de almacenamiento de este compuesto intermediario, si embargo, la temperatura de 20°C es la que presenta valores mas estables en el contenido de HMF durante el almacenamiento, siendo diferente significativamente del almacenamiento a

35°C, efecto que se incrementa a los 30 días de almacenaje. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Fink y Kessler (1986), quienes reportaron aumentos en los valores de HMF, de leches UHT procesadas directa e indirectamente, almacenadas a 35°C con respecto a las mismas leches almacenadas a 20°C y con los reportados por Jimenez-Pérez *et al.* (1992), quienes estudiaron el efecto de la temperaturas de almacenamiento sobre leches UHT en un rango de 6°C a 50°C por un total de 90 días observando que a medida que la temperatura de almacenaje aumentaba los valores en el contenido de HMF también, siendo estos aumentos significativamente mayores a temperaturas sobre los 30°C.

Resultados similares son los obtenidos por Akalin y Gönç (1997), quienes reportaron aumentos en los valores del contenido de HMF en leches UHT indirectas almacenadas a 30°C con respecto al almacenamiento a temperatura ambiente.

Wunderlin *et al.* (1998) señalan que el HMF tiende a descomponerse en soluciones acuosas, y que las fluctuaciones en los valores de HMF dependen de la temperatura de almacenamiento obteniendo un comportamiento mas constante cuando el almacenamiento se efectúa a temperaturas entre 4° y 8°C.

Respecto a la interacción entre los factores tratamiento térmico y tiempo de almacenamiento, se encontró que fue significativa, además mediante el GRAFICO 14 es posible apreciar que inicialmente T3 es mayor de T1 y T2, lo cual cambia al transcurrir el tiempo de almacenamiento donde T1 alcanza un valor intermedio entre T2 y T3. Es interesante señalar que el contenido de HMF en T1 pudo haber aumentado dado su grado de proteólisis, situación que, debido a la cantidad de aminoácidos libres, podría haber provocado un aumento en la reacción de Maillard (GRÁFICO 14).



* Las barras verticales indican intervalo de confianza.

GRÁFICO 14. Interacción entre tiempo de almacenamiento y tratamiento térmico para HMF en leches UHT.

Según Zadow citado por Burton (1984), los valores de HMF de leches UHT procesadas entre 100°C y 150°C aumentaban con la temperatura de procesamiento. Similar es lo señalado por Fink y Kessler (1986), quienes procesaron leches a temperaturas entre 105°C y 160°C variando los tiempos de retención entre 10 a 2.400 segundos, obteniendo aumentos proporcionales en los valores de HMF con respecto a la severidad del tratamiento térmico y longitud del calentamiento. El aumento proporcional de los valores de HMF en leches UHT a medida que aumenta la temperatura de procesamiento también fue observado por Peña (1995) y Poblete (2000).

A partir de las relaciones analizadas anteriormente se han definido las regresiones lineales que caracterizan la variación del contenido de HMF en el tiempo en función de tratamiento térmico y el tiempo de almacenamiento. Dichas variaciones se aprecian en los GRÁFICOS 15 y 16.

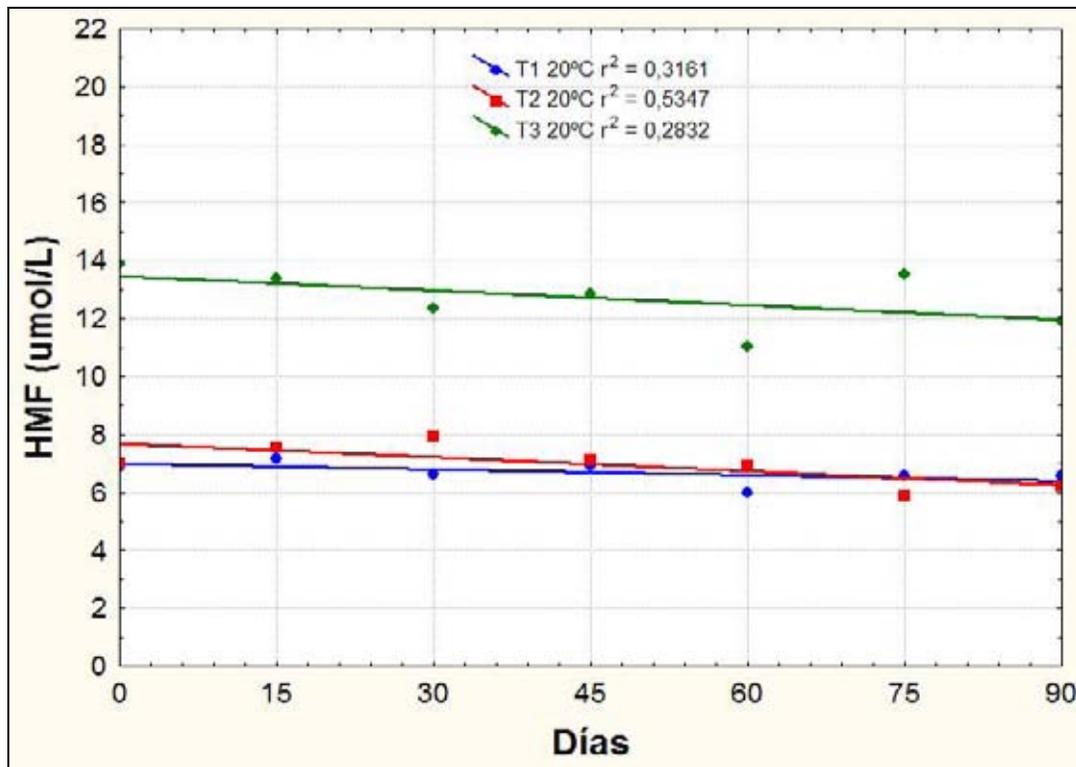


GRÁFICO 15. Variación del contenido de HMF a través del tiempo, en leches UHT almacenadas a 20°C.

Como puede observarse en el GRÁFICO 15 la evolución del contenido de HMF a través del tiempo en los tratamientos T1, T2 y T3 se ajusta a regresiones lineales con un bajo coeficiente de determinación, lo que indicaría que a 20°C pueden existir otros factores además del tiempo que podrían estar influyendo en la variación. Las rectas de regresión indican que la variación del

contenido de HMF en T1, T2 y T3 es de aproximadamente -1,45; -3,11 y -1,85 % respectivamente cada 15 días.

En las muestras de leche almacenadas a 35°C, como se muestra en el GRÁFICO 16, la evolución del contenido de HMF se ajusta a regresiones lineales, donde los tratamientos T1, T2 y T3 presentan variaciones del contenido de HMF de 44,1; 28,4 y 10,2 % respectivamente cada 15 días.

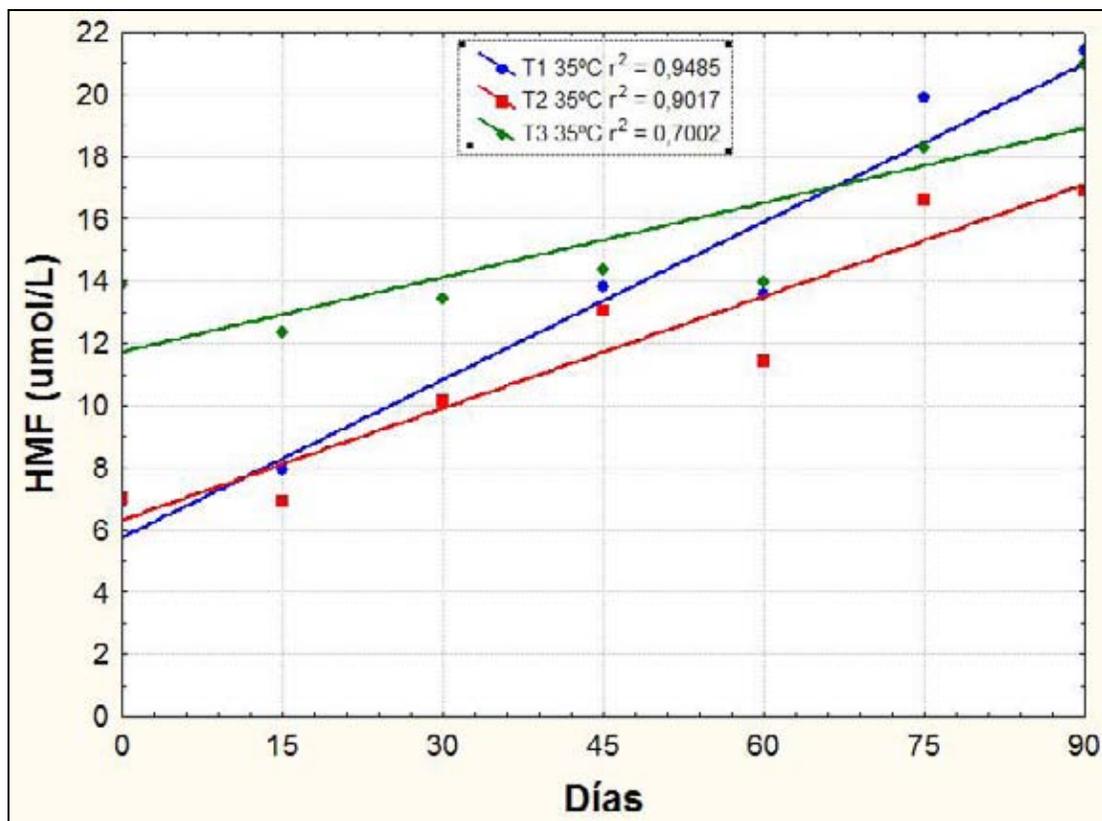
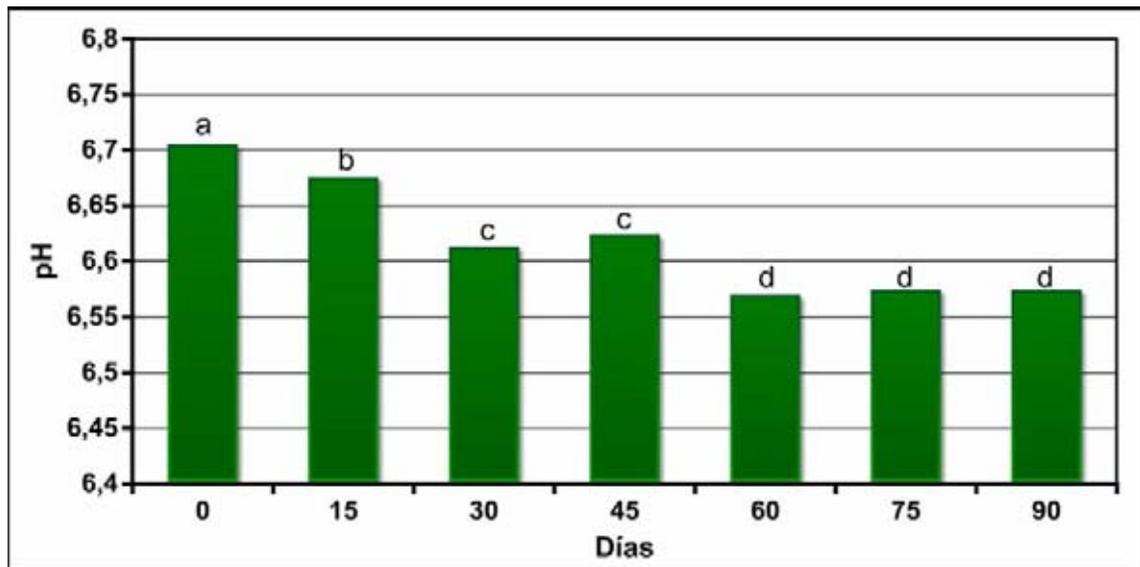


GRÁFICO 16. Variación del contenido de HMF a través del tiempo, en leches UHT almacenadas a 35°C.

4.2.3 Variación de pH. El promedio de los valores obtenidos para el análisis de este factor y los resultados obtenidos a partir del análisis de varianza se pueden observar en el ANEXO 13.

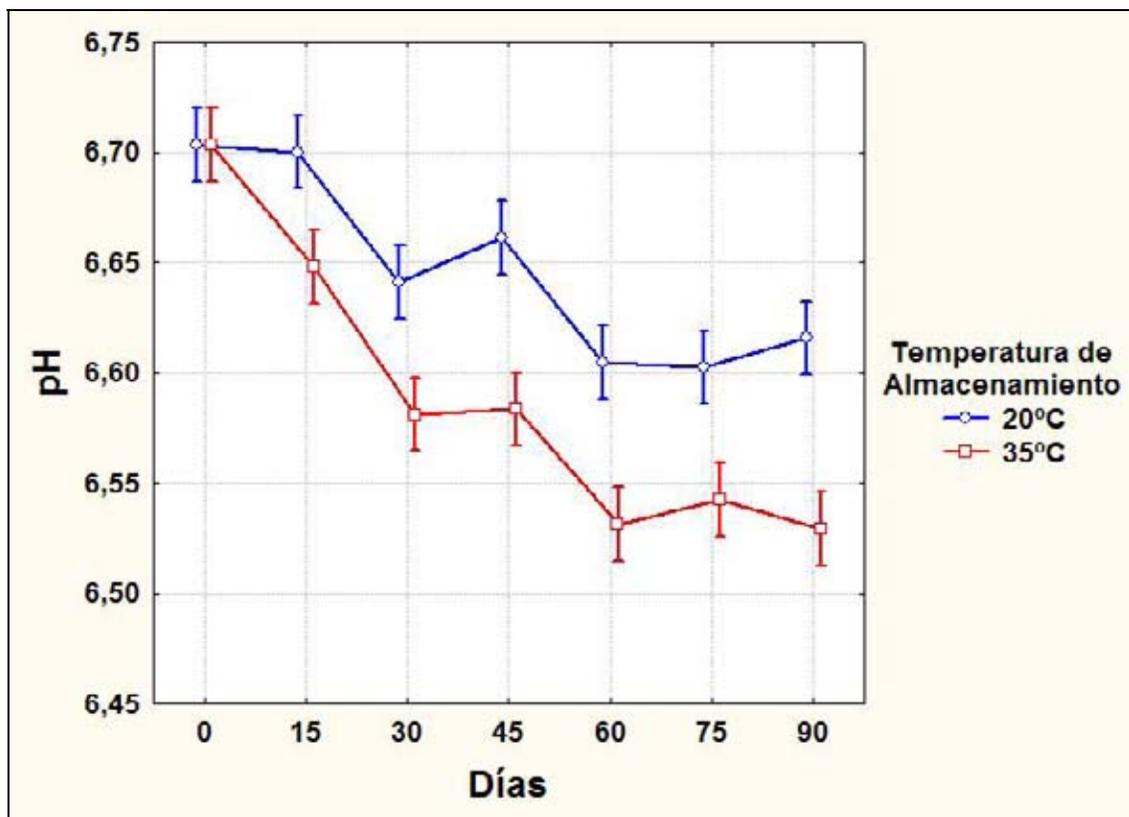


* Letras distintas en columnas indican diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$).

GRÁFICO 17. Evolución del pH durante el tiempo de almacenamiento.

En el GRÁFICO 17 se puede observar la variación experimentada por el pH, considerando el factor tiempo de almacenamiento, presentándose una disminución progresiva del pH para estabilizarse hacia el final. Venkatachalam *et al.* (1993), también observó un decrecimiento gradual durante el almacenamiento de leche UHT atribuyéndolo a un decrecimiento del pH por efecto de la liberación de protones debido a la precipitación del fosfato de calcio durante el almacenamiento. Otra explicación podría darse por las reacciones de desfosforilación que ocurren durante el almacenamiento, las que producen liberación de H^+ . Sin embargo las causas más probables del decrecimiento del pH durante el almacenamiento son las reacciones proteína-proteína que origina liberación de protones.

Mediante el análisis de varianza realizado para la variable pH (ANEXO 13) se determinó la influencia significativa de ciertas interacciones sobre la variación de pH de las leches UHT durante el almacenamiento. El efecto de dichas interacciones se observa en los GRAFICOS 18 y 19.



* Las barras verticales indican intervalo de confianza.

GRÁFICO 18. Interacción entre tiempo de almacenamiento y temperatura de almacenamiento para el pH en leches UHT.

A partir del GRAFICO 18 se apreciar que el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el pH comienza a hacerse significativo a partir de los 15 días, obteniéndose consecuentemente disminuciones mayores en los valores de pH para las leches sometidas a una mayor temperatura de almacenaje. La

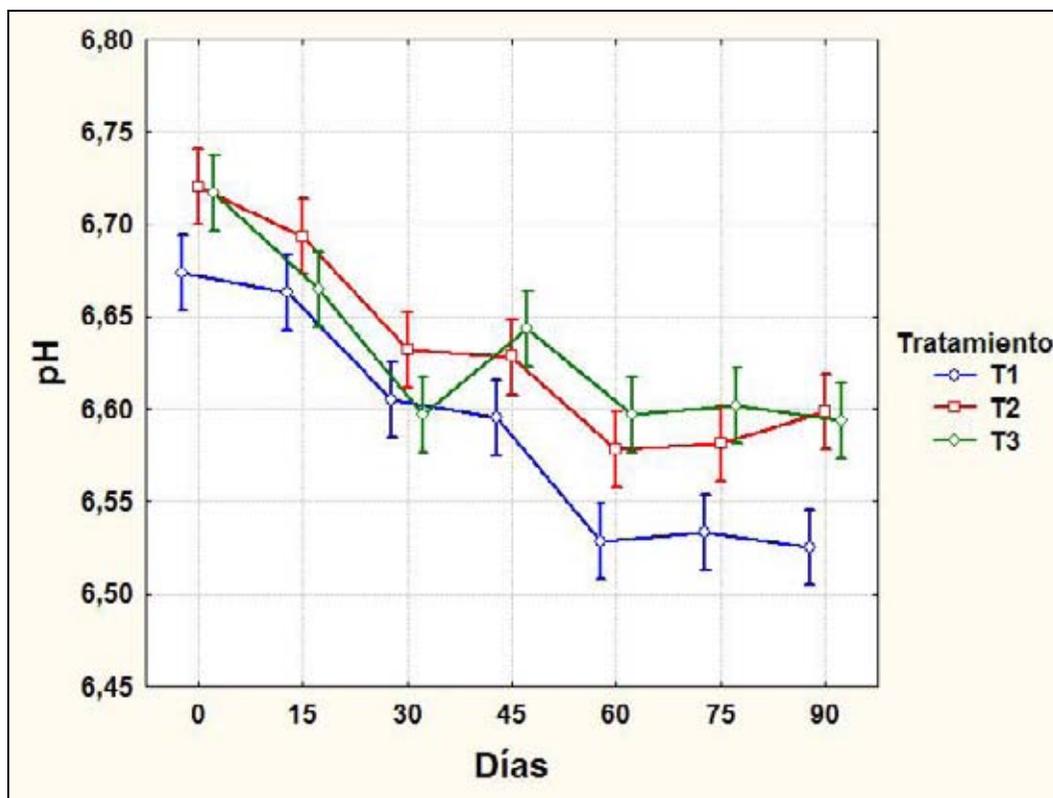
mayor disminución se observa entre 0 y 30 días de almacenamiento a ambas temperaturas.

La baja del pH por efecto de las temperatura de almacenamiento a través del tiempo también fue reportada por Flores (1990) y Poblete (2000), quienes obtuvieron valores de pH para las leches UHT almacenadas a 35°C con respecto a las almacenadas a 21°C.

Manji *et al.*, citados por Flores (1990), observaron que leches UHT procesadas por el sistema directo e indirecto, presentaban considerables disminuciones de pH a medida que la temperatura a las que eran almacenadas aumentaban, considerando un almacenamiento entre 22°C y 37°C.

Al respecto, tanto Kondal *et al.* (1991), Auldish *et al.* (1996) y Patel *et al.* (1996), quienes investigaron el comportamiento del pH en leches UHT, observaron que el decrecimiento de este parámetro durante el almacenamiento era proporcional al aumento en la temperatura a la que fueron almacenadas y señalan que este efecto puede ser consecuencia de reacciones que se desarrollan durante el almacenamiento como la reacción de Maillard, la que involucra la interacción de grupos amino de las proteínas de la leche con el grupo glicosídico hidroxil de la lactosa originando pérdidas de cargas positivas.

A partir del GRÁFICO 19 se puede inferir que mientras mas drástico es el tratamiento térmico aplicado a la leche, el decrecimiento del pH durante el almacenamiento es menor, esto concuerda con lo observado por Topçu *et al.* (2006). Como puede observarse la caída de pH es mayor para el tratamiento T1, en relación a los tratamientos T2 y T3, los cuales a los 90 días de almacenamiento tienen un pH similar.



* Las barras verticales indican intervalo de confianza.

GRÁFICO 19. Interacción entre tiempo de almacenamiento y tratamiento térmico para el pH en leches UHT.

A partir de las relaciones analizadas anteriormente se han definido las regresiones lineales que caracterizan la variación de pH en el tiempo en función de tratamiento térmico y el tiempo de almacenamiento y que están representadas en los GRÁFICOS 20 y 21.

Como puede observarse en el GRÁFICO 20 la evolución del contenido de HMF a través del tiempo en los tratamientos T1, T2 y T3 presenta una tendencia lineal considerando un almacenamiento a 20°C. Las rectas de regresión indican que la variación del contenido de HMF en T1, T2 y T3 es de aproximadamente -0,24; -0,30 y -0,28 % respectivamente cada 15 días.

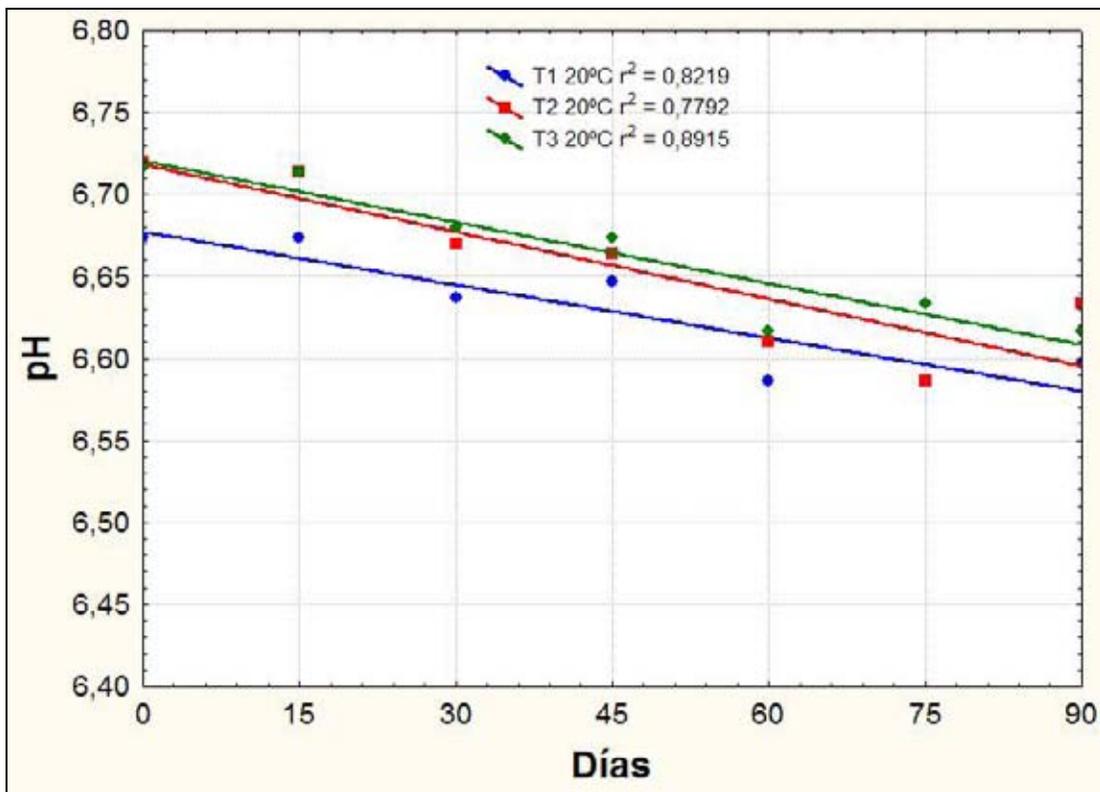


GRÁFICO 20. Variaciones de pH a través del tiempo, en leches UHT almacenadas a 20°C

Con las leches almacenadas a 35°C, se aprecia en el GRÁFICO 21, que la evolución del pH se ajusta a regresiones lineales, donde los tratamientos T1, T2 y T3 presentan variaciones de pH del orden de -0,59; -0,35 y -0,28 % respectivamente cada 15 días.

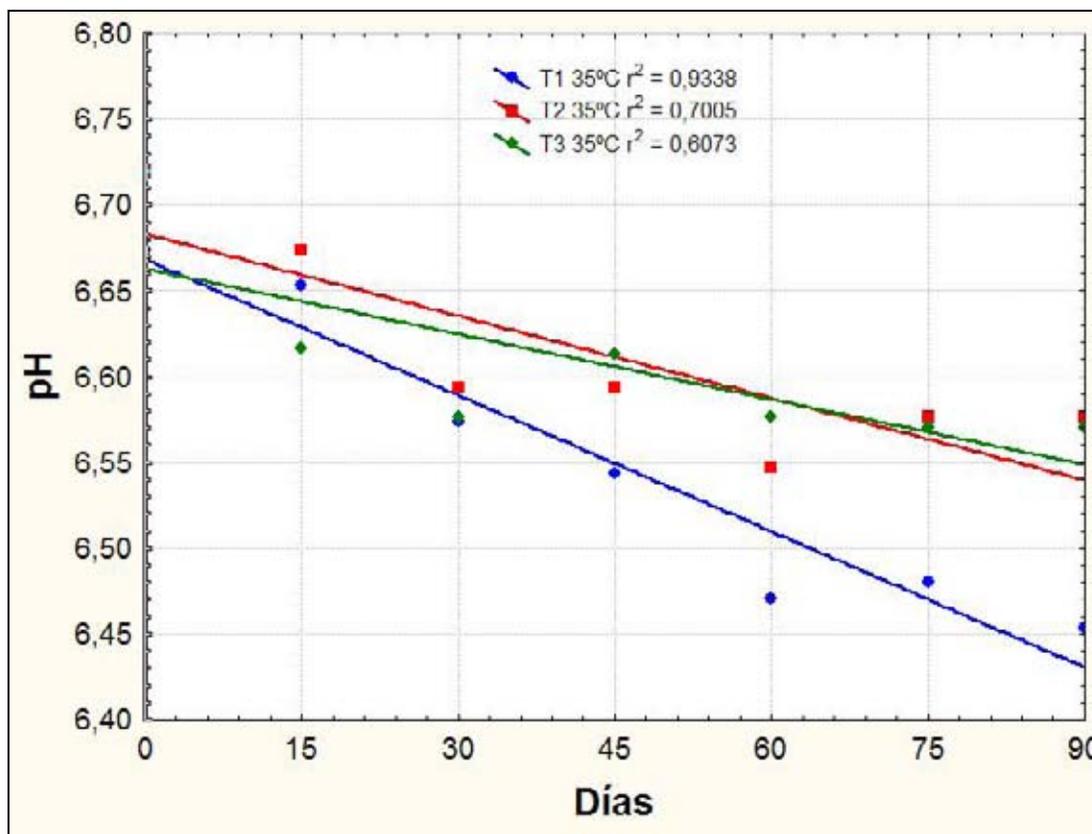


GRÁFICO 21. Variaciones de pH a través del tiempo, en leches UHT almacenadas a 35°C.

4.2.4 Índice de sedimentación. El promedio de los valores obtenidos para el análisis de este factor y los resultados obtenidos a partir de las pruebas de Kruskal-Wallis se pueden observar en el ANEXO 14.

En el GRÁFICO 22 es posible apreciar que no se observa sedimentación en T1, por otra parte en T2 se observa sedimentación a partir de los 60 días, y en T3 la sedimentación ocurre a partir de los 15 días.

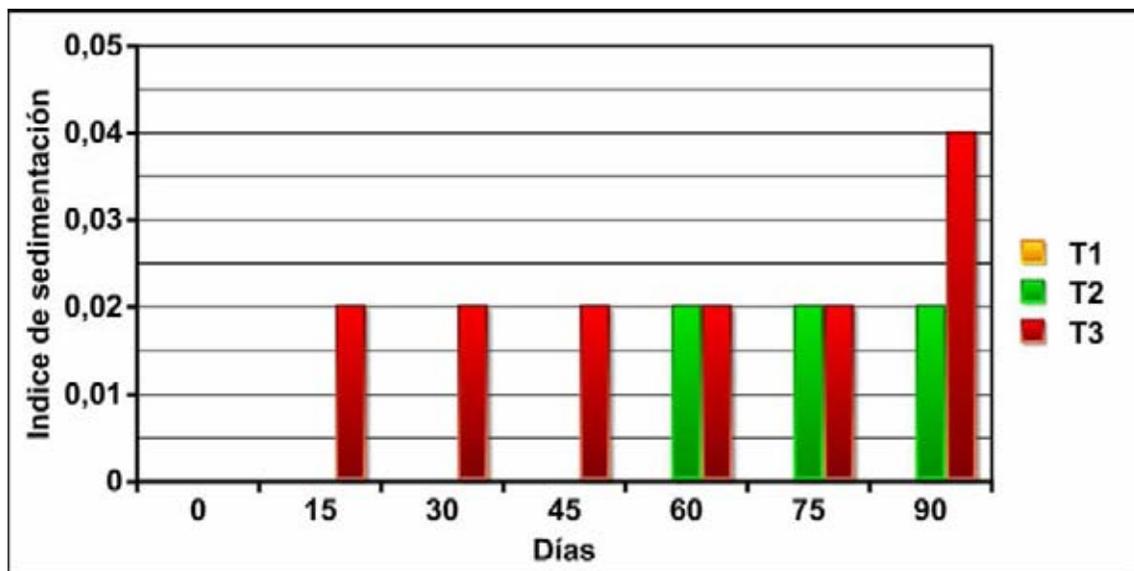


GRÁFICO 22. Evolución del índice de sedimentación en leches UHT almacenadas a 35°C.

La sedimentación en leches UHT se considera como la primera fase del proceso más complejo de la gelificación, ha sido objeto de muchos estudios por parte de varios investigadores por sus repercusiones en el mercado de la leche (Flores, 1990).

Al analizar el índice de sedimentación por el factor tratamiento es posible expresar que el tratamiento T3 fue significativamente diferente a T1, pero no a T2, y el tratamiento T2 fue similar a T1. De esta forma es posible señalar que a medida que el tratamiento térmico es más fuerte el índice de sedimentación también es mayor (ANEXO 14).

Al estudiar el índice de sedimentación por el factor temperatura de almacenamiento se puede apreciar claramente que en aquellas muestras almacenadas a 35°C los valores de sedimentación fueron mucho mayores (ANEXO 14). Eso concuerda con lo observado por Ramsey y Swartzel (1984) y Flores (1990) y lo declarado por Datta *et al.* (2002), ellos manifestaron que la

tasa de sedimentación fue mayor en leches UHT almacenadas a la temperatura mas alta. Es importante destacar que el método utilizado para cuantificar la sedimentación no fue lo suficientemente sensible para detectar índices inferiores a 0,02.

Al respecto Datta *et al.* (2002) señala que el tratamiento térmico de la leche a menudo crea agregados de proteína denaturada, materia grasa, lactosa y sales inorgánicas de composición variada. La cantidad de sedimento depende de varios factores tales como la calidad de la leche cruda, tipo e intensidad del tratamiento térmico, posición del homogeneizador, presión de homogeneización y temperatura de almacenamiento. La sedimentación puede ocurrir inmediatamente después del procesamiento o durante el almacenamiento.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados de la presente investigación se puede concluir lo siguiente:

- Al aumentar la intensidad y la acción aditiva de los tratamientos térmicos aplicados a la leche, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos térmicos aplicados a la leche, siendo los tratamientos T2 y T3 los más afectados por la temperatura.
- Los contenidos de HMF se incrementaron al aumentar la intensidad y la acción aditiva de los tratamientos térmicos aplicados a la leche, detectándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las materias primas y los tratamientos.
- El grado de proteólisis aumentó de manera significativa considerando el factor tiempo de almacenamiento. Al tomar en cuenta el factor tratamiento térmico, los tratamientos con leche reconstituida (T2 y T3) tuvieron un menor grado de proteólisis en comparación con la leche natural (T1). Además la temperatura de almacenamiento influyó significativamente sobre el grado de proteólisis, favoreciendo su desarrollo las temperaturas elevadas (35°C).
- El contenido de HMF aumenta de manera significativa al considerar el factor tiempo de almacenamiento. Al analizar el factor tratamiento térmico, el tratamiento T3 tuvo un mayor contenido de HMF en comparación con T1 y T2 (tratamientos en planta piloto). Además los

valores de HMF también aumentan al aumentar la temperatura de almacenamiento (35°C).

- Al utilizar leche concentrada descremada reconstituida para elaborar leche UHT (T2 y T3), el decrecimiento de pH durante el almacenamiento es menor en comparación con T1 (leche natural). La temperatura de almacenamiento influye significativamente sobre el pH obteniéndose una mayor disminución de pH en las leches sometidas a una mayor temperatura de almacenaje (35°C).
- Al utilizar leche concentrada descremada reconstituida en la elaboración de leche UHT (T2 y T3) el índice de sedimentación se incrementó durante el almacenamiento a 35°C.
- De acuerdo a los resultados obtenidos la utilización de leche concentrada descremada reconstituida para la elaboración de leche UHT es posible, ya que se obtiene un producto estable, con un bajo grado de proteólisis, aunque con una mayor desnaturalización de las proteínas del suero, mayor índice de sedimentación y niveles mayores de HMF que una leche fabricada con leche natural.

6. RESUMEN

Esta investigación evaluó la utilización de leche concentrada descremada reconstituida para la elaboración de leche UHT, en cuanto a sus efectos fisicoquímicos y de estabilidad. El experimento consideró 3 tratamientos relacionados con el tipo de materia prima y parámetros de proceso para elaborar la leche UHT, a saber, T1, leche natural termizada, descremada y procesada en planta piloto; T2, leche concentrada, descremada, reconstituida y procesada en planta piloto y T3, leche concentrada, descremada, reconstituida y procesada industrialmente. Se usaron dos temperaturas de almacenamiento, 20 y 35°C, y se determinó del tiempo de almacenamiento, a saber, 0, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 días sobre las variables de respuesta, grado de proteólisis, contenido de hidroximetilfurfural (HMF), pH e índice de sedimentación. El experimento tuvo un arreglo factorial de 3x2x7 con tres repeticiones.

Adicionalmente en el tiempo 0 se midió el contenido de proteínas no desnaturalizadas del suero, grado de proteólisis, contenido de HMF y pH en leche termizada, T1 y en leche reconstituida, T2 y T3. Los datos fueron analizados mediante un ANDEVA de una vía.

Del análisis de los resultados, se concluyó lo siguiente:

Tanto el contenido de hidroximetilfurfural como la desnaturalización de las proteínas del suero se incrementaron al aumentar la intensidad y la acción aditiva de los tratamientos térmicos aplicados a la leche, detectándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las materias primas y los tratamientos.

Durante el almacenamiento, las leches elaboradas con concentrado reconstituido mostraron un menor grado de proteólisis, un mayor pH, una mayor índice de sedimentación y un mayor contenido de HMF (sólo en T3), en comparación con la leche natural (T1). Además el grado de proteólisis, el contenido de HMF, la baja de pH y el índice de sedimentación fueron mayores al aumentar la temperatura de almacenamiento.

Utilizando leche concentrada descremada reconstituida para la elaboración de leche UHT se obtiene un producto estable, con un bajo grado de proteólisis, aunque con una alta desnaturalización de las proteínas del suero, mayor índice de sedimentación y niveles mayores de hidroximetilfurfural (HMF) que un producto fabricado con leche natural.

7. SUMMARY

This research evaluated the use of reconstituted concentrated milk for the elaboration of UHT milk and its physicochemical and stability effects. The experiment included three treatments related to the raw material type and process parameters to manufacturing UHT milk: T1, termized, skim milk processed in pilot plant; T2, concentrated, reconstituted skim milk, processed in pilot plant and T3, concentrated, reconstituted skim milk, processed in commercial plant. Two storage temperatures, 20 and 35°C, were used, and the effect of storage times, 0, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 days on the variables, proteolysis degree, hydroxymethylfurfural (HMF) content, pH and sedimentation index, was determined. The experiment had a 3x2x7 factorial array with three replications. ANOVA and Tukey analysis were carried out.

Additionally, at 0 time the non denaturized whey protein content, proteolysis degree, HMF content and pH were determined in termized milk, T1, reconstituted milk, T2 and T3. Data were analyzed by one way ANOVA.

From results of this work, the following conclusions can be gotten:

Both the hidroximetilfurfural content and the denaturation of whey proteins were increased when increasing the intensity and the additive action of the heat treatments applied to milk, significant differences were detected ($p < 0,05$) between the raw materials and treatments.

During the storage, the product elaborated with reconstituted concentrated milk showed a smaller degree of proteolysis, a higher pH, a higher sedimentation index and a higher HMF content (only in T3) in relation to natural milk (T1). The proteolysis degree, the HMF content, pH reduction and sedimentation index were higher with increasing the storage temperature.

Using reconstituted concentrated skim milk in the elaboration of UHT milk, a stable product, with a low degree of proteolysis is obtained, although it shows a higher whey protein denaturation, higher sedimentation index and HMF content than a product made with natural milk (T1).

8. BIBLIOGRAFÍA

Acosta, E. 1995. Efectos de pretratamientos térmicos en la inactivación de proteasas termorresistentes y en el desarrollo de proteólisis y lipólisis en leches UHT. Tesis Magíster en Ciencias y Tecnología de la leche Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 112 p.

Akalin, A y Gönç, S. 1997. Lactulose and 5-HMF contents in market milks *Milchwissenschaft* 52(7): 377-380.

Alais, C. 1985. Ciencia de la leche. Principios de la Técnica Lechera. 2ª Ed. Barcelona. Reverté. 873 p.

Albalá-Hurtado, S., Veciana-Nogués, M., Mariné-Font, A. y Vidal-Carou, M. 1998. Changes in furfural compounds during storage of infant milks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(8): 2998-3003.

Alkanhal, H.A. 2000. Suitability of methods used for the measurement of proteolysis in UHT milk. *The Australian Journal of Dairy Technology* 55(3):148-152.

Amiot, J. 1991. Ciencia y Tecnología de la leche. Editorial Zaragoza. España. 547 p.

Andrews, G. 1986. Effect of storage, light and homogenization on the color of ultra-heat treated and sterilized milk. *Journal of Dairy Research* 53(4): 615-624.

Auldist, M., Coats, S., Sutherland, B., Hardham, J., McDowell, G. y Rogers, G. 1996. Effect of somatic cell count and stage of lactation on the quality and storage life of ultra high temperature milk. *Journal of Dairy Research* 63(3): 377-386.

Ayhan, K., Durlu-Özkaya, F. y Tunail, N. 2005. Commercially important characteristics of Turkish origin domestic strains of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *International Journal of Dairy Technology* 58(3):150-157.

Burton, H. 1981. Sistemas de procesamiento UHT para leche y productos lácteos. In: Federation Internationale de Laitiere. Bulletin la leche UHT. Document N° 133: 76-89.

Burton, H. 1984. Reviews of the progress of Dairy Science: The bacteriological, chemical, biochemical and physical changes that occur in milk at temperatures of 100-150°C. *Journal of Dairy Research* 51(2): 341-363.

Chile, Instituto Nacional de Normalización. 1979. Leche y productos lácteos. Determinación de pH. Método potenciométrico. NCh 1671.

Cano-Ruiz, M.E. y Richter, R.L. 1998. Changes in Physicochemical Properties of Retort-Sterilized Dairy Beverages During Storage. *Journal of Dairy Science* 81(8):2116-2123.

Citti, J.E., Sandine, W.E., Elliker, P.R. 1963. Some observations on the Hull method for measurement of proteolysis in milk. *Journal of Dairy Science* 46:337.

Datta, N., Elliott, A., Perkins, M y Deeth, H. 2002. Ultra-high-temperature (UHT) treatment of milk: comparison of direct and indirect modes of heating. *The Australian Journal of Dairy Technology* 57(3):211-227.

Datta, N. y Deeth, H.C. 2003. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 36:173-182.

Elliot, A.J., Datta, N., Amenu, B., Deeth, H.C. 2005. Heat-induced and other chemical changes in commercial UHT milks. *Journal of Dairy Research* 72:1-5.

Erbersdobler, H.F., Dehn, B., Nangpal, A. y Reuter, H. 1987. Determination of furosina in heated milk as a measure of heat intensity during processing. *Journal of Dairy Research*. 54:147-151.

Evangelisti, F., Calcagno, C., Nardi, S. y Zunin, P. 1999. Deterioration of protein fraction by Maillard reaction in dietetic milks. *Journal of Dairy Research* 54(9): 491-493.

Fields, R. 1971. The measurement of amino groups in proteins and peptides. *Biochemical Journal* 124(2):581-590.

Fink, R. y Kessler, H. 1986. HMF values in heat treated and stored milk. *Milchwissenschaft* 41(10): 638-641.

Fink, R. y Kessler, H. 1988. Comparison of methods for distinguishing UHT treatment and sterilization of milk. *Milchwissenschaft* 43(5): 275-280.

Flores, O. 1990. Efecto del tratamiento térmico y condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad de leches UHT. Tesis Lic. Agronomía Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 70 p.

Folin, O. y Ciocalteau, V. 1927. On Tyrosine and Tryptofane Determinations in Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 73:627-650.

Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. 1998. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Blackie Academic & Professional. London. 478 p.

Gaimari, S. 1987. Efecto de la calidad higiénica de la leche y del tratamiento térmico sobre la actividad proteásica residual en leches UHT. Tesis Magíster en Ciencias y Tecnología de la leche Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 140 p.

Griffiths, M.W., Phillips, J.D., West, I.G. y Muir, D.D. 1988. The effect of extended low-temperature storage of raw milk on the quality of pasteurized and UHT milk. *Food Microbiology* 5: 75-87.

Guerrero, L., Román y Pacheco, 2003. Proteólisis During Cold Storage of Refrigerated Raw Milk. Effect of Proteolytic Enzymes on Casein Integrity. *Revista Científica, FCV-LUZ* 13(3):187-192.

Henning, D. R., Baet, R.J., Nassan, A.N. y Dave, R. 2006. Major Advances in Concentrated and Dry Milk Products, Cheese, and Milk Fat-Based Spreads. *Journal of Dairy Science* 89(4):1179-1188.

Hofmann, T., Bors, W. y Stettmaier, K. 1999. Radical-assisted melanoidin formation during thermal processing of foods as well as under physiological conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(2): 391-396.

Houghtby, G., Maturin, L. y Koenig, E. 1992. Chapter 6, Microbiological counts methods. In: Standard Methods for the examination of Dairy Products, 16^o Edition. Robert T. Marchall, Editor. American Public Health Association. pp 213-214.

Hull, M. 1947. Studies on milk proteins. II Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. *Journal of Dairy Science* 30(1):881-884.

Jimenez-Pérez, S. Corzo, N., Morales, F.J., Delgado, T., Olano, A. 1992. Effect of Storage Temperature on Lactulose and 5-hydroxymethyl-furfural Formation in UHT Milk. *Journal of Food Protection* 55(4):304-306.

Kahlhofer, H. 1982. Examinations of the Keeney-Bassette method for the examination of HMF in milk powder. *Osterreichische Milchwirtschaft* 1(11):1-8.

Keeney, M. y Bassette, R. 1959. Detection of intermediate compounds in the early stages of browning reactions in milk products. *Journal of Dairy Science* 42(6):945-960.

Kelly, A.L. y Foley, J. 1997. Proteolysis and storage stability of UHT milk as influenced by milk plasmin activity, plasmin/ β -lactoglobulin complexation, plasminogen activation and somatic cell count. *International Dairy Journal* 7:411-420.

Kondal, K., Nguyen, M.H., Kailasapathy, K. y Zadow, J.G. 1991. The effects of some treatments and storage temperatures on UHT whole milk. *The Australian Journal of Dairy Technology* 46(2):57-63.

Law, A.J.R., Banks, J.M., Horne, D.S., Leaver, J. y West, I.G. 1994. Denaturation of the whey proteins in heated milk and their incorporation into Cheddar cheese. *Milchwissenschaft* 49(2):63-66.

Levicán, J.O. 1990. Caracterización de la flora psicrotrófica y sus proteasas en leche cruda refrigerada. Tesis, Lic. en Bioquímica. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 78 p.

Lopez-Fandiño, R. y Olano, A. 1999. Selected indicators of the quality of thermal processed milk. *Food Science and Technology International* 5(2): 121-137.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall. R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.

Manji, B. y Kakuda, Y. 1988. Effect of storage temperature on age gelation of Ultra-High-Temperature milk processed by direct and indirect heating system. *Journal of Dairy Science* 69(12):2994-3001.

McKellar, R. 1981. Development of off-flavors in ultra-high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. *Journal of Dairy Science* 64(11):2138-2145.

McMahon, D.J. 1996. Age-gelation of UHT milk: Changes in that occur during storage on shelf-life and the mechanism by which age-gelation occurs. In: *Heat treatments and Alternative methods*, International Dairy Federation S.I.9602 pp 315-325.

Mittal, S.B., Hourigan, J.A. y Zadow, J.G. 1990. Effect of Added Sodium hexametaphosphate on certain technological aspects of UHT recombined milk. *The Australian Journal of Dairy Technology* 45(1):1-4.

Monti, S., Ritieni, A., Graziani, G., Randazzo, G., Mannina, L., Segre, A. y Fogliano, V. 1999. LC/MS analysis and antioxidative efficiency of Maillard reaction products from a lactose-lysine model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(4): 1506-1513.

Morales, F. y Jimenez-Pérez, S. 1998. Monitoring of heat-induced proteolysis in milk and milk-resembling systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(10): 4391-4397.

Morales, F. y Jimenez-Pérez, S. 1999. HMF formation during heat-treatment of milk-type products as related to milkfat content. *Journal of Food Science* 64(5): 855-859.

Morales, F.J., Romero, C. y Jimenez-Pérez, S. 2000. Characterization of industrial processed milk by analysis of heat-induced changes. *International Journal of Food Science and Technology* 35: 193-200.

Núñez, M. y Núñez, J.A. Proteasas y psicrótrofos gram negativos. Efectos sobre la leche y los productos lácteos. *Revista Española de Lechería* 130: 251-259.

O'Brien, J.M. y Morrissey, P.A. 1989. The Maillard Reaction in Milk Products. In: *Bulletin of the International Dairy Federation. Heat induced changes in milk. Document 238.* pp 53-61.

Paggi, G., Cappelini, P., Pancini, R., Pavanello, V. y Bartoletti, A. 1985. Protease e sedimentazione in latte UHT. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 36 (6):605-614.

Pagliarinni, E. Lametti, S., Peri, C. y Bonomi, F. 1990. An Analytical Approach to the evaluation of Heat Damage in Commercial Milks. *Journal of Dairy Science* 73(1):41-44.

Patel, A., Gandhi, H., Singh, S y Patil, G. 1996. Shelf-life modeling of sweetened condensed milk based on kinetics of Maillard browning. *Journal of Food Processing and Preservation* 20(6): 431-451.

Peña, C. 1995. Efectos de tratamientos térmicos UHT sobre las características fisicoquímicas y organolépticas de la leche. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 80p.

Perking, A. 1985. Review of UHT processing methods. *Journal of the Society of Dairy Technology* 38(3):69-73.

Picard, C., Plard, I., Rongdaux-Gaida, D. y Collin, J. 1994. Detection of proteolysis in raw milk stored at low temperature by an inhibition ELISA. *Journal of Dairy Research* 61(3): 395-404.

Pischetsrieder, M., Schoetter, C. y Severin, T. 1998. Formation of an aminoreductone during the Maillard reaction of lactose with N^α- acetyl-lysine or proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(3): 928-931.

Poblete, A. 2000. Tratamientos Térmicos UHT en Leche: Efecto del Almacenamiento a Dos Temperaturas en la Actividad Proteásica, Grado de

Proteólisis, Color y HMF. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 132p.

Postigo, M. 1986. Efecto de la actividad de proteasas sobre la estabilidad de leches UHT durante su almacenamiento. Tesis Magíster en Ciencias y Tecnología de la leche Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 170 p.

Ramsey, J. y Swartzel, K. 1984. Effect of Ultra-High-Temperature processing and storage conditions on rates of sedimentation and fat separation of aseptically packaged milk. *Journal of Food Science* 49(1): 257-262.

Rustom, I.Y.S., Lopez-Leiva, M.H. y Baboo, M.N. 1995. UHT-Sterilized Peanut Beverages: Changes in Physicochemical Properties during Storage. *Journal of Food Science* 60(2): 378-383.

Shah, N.P. 1994. Psychrotrophs in milk: a review. *Milchwissenschaft* 49(8):432-437.

Singh, H., Creamer, L.K. y Newstead. 1989. Effects on heat proteins of concentrated milk systems. *Bulletin of The International Dairy Federation* N°238: 94-104.

Spadaro, A.C., Droguetto, W., Nassif del Lama, S., Camargo, A. y Greene, J. 1979. A convenient manual Trinitrobenzenesulfonic acid method for monitoring amino acids and peptides in Chromatographic column effluents. *Analytical Biochemistry* 96(1): 317-321.

Spreer, E. 1991. *Lactología Industrial*. 2^{da} ed. Ed. Acribia. Zaragoza. 634 p.

Theobald, A., Müller, A. y Anklam, E. 1998. Determination of 5-hydroxymethylfurfural in vinegar samples by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(5): 1850-1854.

Topçu, A., Numanoğlu, E. y Saldamli, I. 2006. Proteolysis and storage stability of UHT milk produced in Turkey. *International Dairy Journal* 16(6):633-638.

Van Boekel, M. y Zia-Ur-Rehman. 1987. Determination of hydroxymethylfurfural in heated milk by high-performance liquid chromatography. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 41(4): 297-306.

Venkatachalam, N., McMahon, D.J. y Savello, P.A. 1993. Role of Protein and Lactose Interactions in the Age Gelation of Ultra High Temperature Processed Concentrated Skim Milk. *Journal of Dairy Science* 76(7): 1882-1894.

Walstra, P. y Jenness, R. 1984. *Dairy Chemistry and Physics*. Wiley Interscience, New York. 467 p.

Walstra, P., Geurts, T., Noomen, A., Jellema, A. y Van Boekel, M. 1999. *Dairy Technology. Principles of Milk Properties and Processes*. Marcel Dekker AG. USA. 727 p.

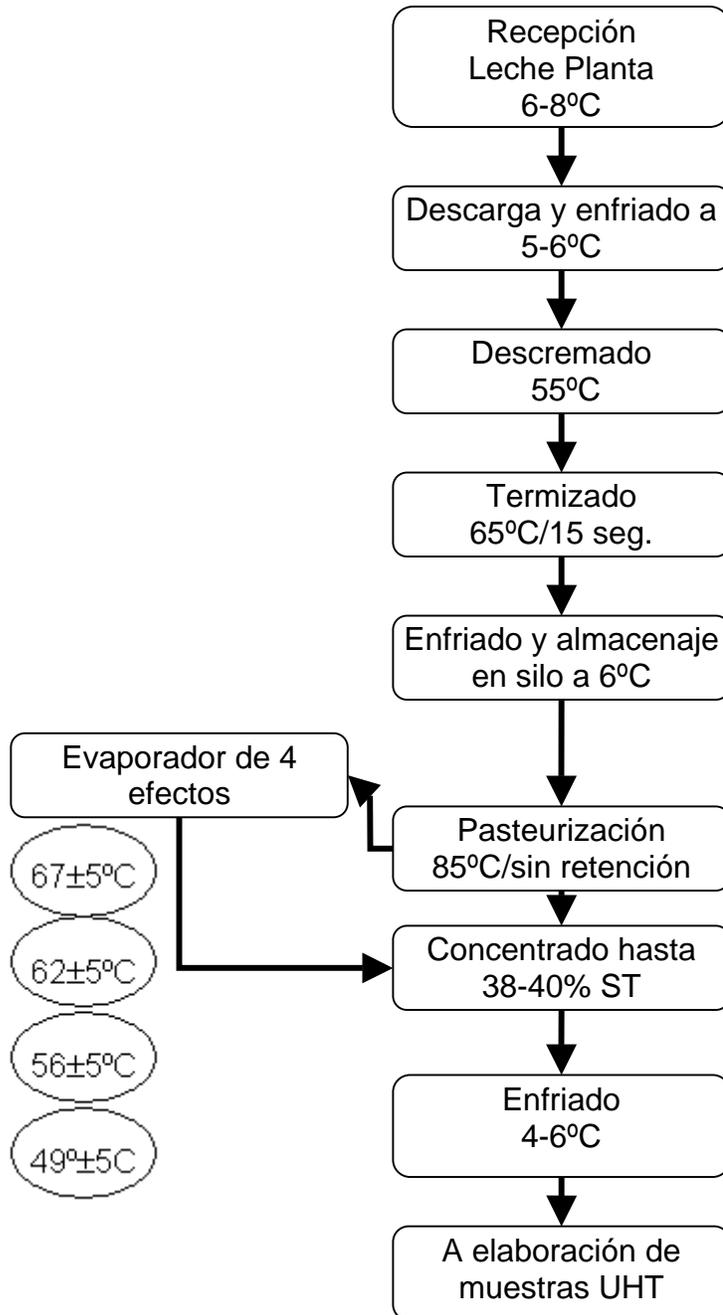
Wunderlin, D., Pesce, S., Amé, M. y Faye, P. 1998. Decomposition of hydroxymethylfurfural in solution and protective effect of fructose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(5): 1855-1863.

Zadow, J. 1971. The influence of pH and heat treatment on the color and stability of ultra-high-temperature sterilized milk. *Journal of Dairy Research* 38(3): 393-401.

ANEXOS

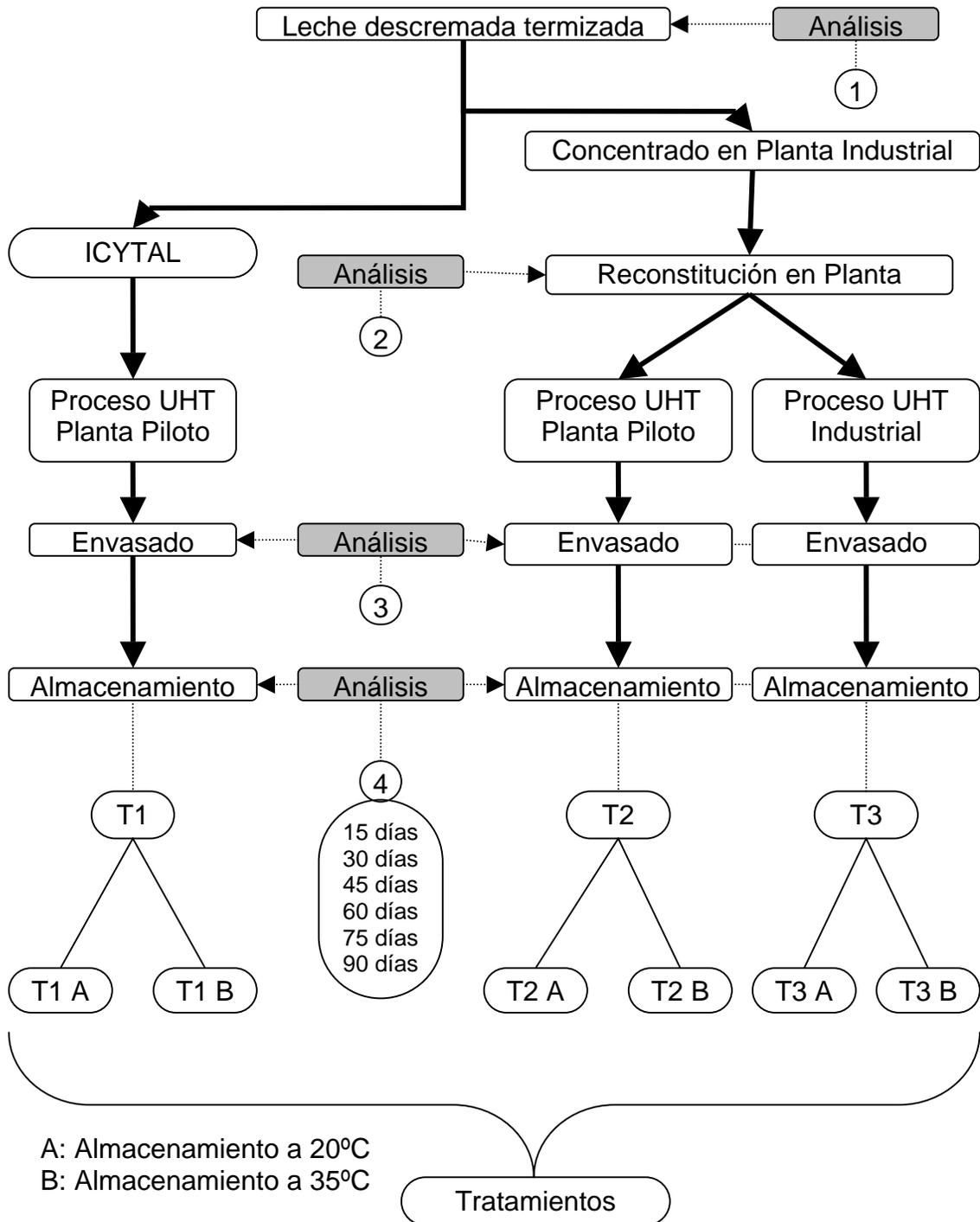
ANEXO 1

Línea de proceso del concentrado



ANEXO 2

Diagrama de los tratamientos



ANEXO 3

Determinación de las proteínas del suero por el método Folin-Ciocalteu

Método espectrofotométrico descrito por Folin y Ciocalteu (1927) y modificado por Lowry *et al.* (1951).

Fundamento del método: La determinación se basa en la reacción de la proteína con el cobre en medio alcalino y en la reducción del fosfomolibdato-fosfotungstato del reactivo de Folin Ciocalteu por las proteínas tratadas con cobre, específicamente por los aminoácidos aromáticos (tirosina y triptofano).

Materiales y Reactivos

- Ácido acético 33,3%
- Tampón acetato 3,33 N
- Solución A : Na_2CO_3 2% P/V disuelto en NaOH 0,1 N.
- Solución B : $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 1% P/V en tartrato de Na y K al 2%, mezclar en volúmenes iguales.
- Solución C : Mezclar solución A y B en proporción 50:1.
- Solución E : Reactivo de Folin 1 N.

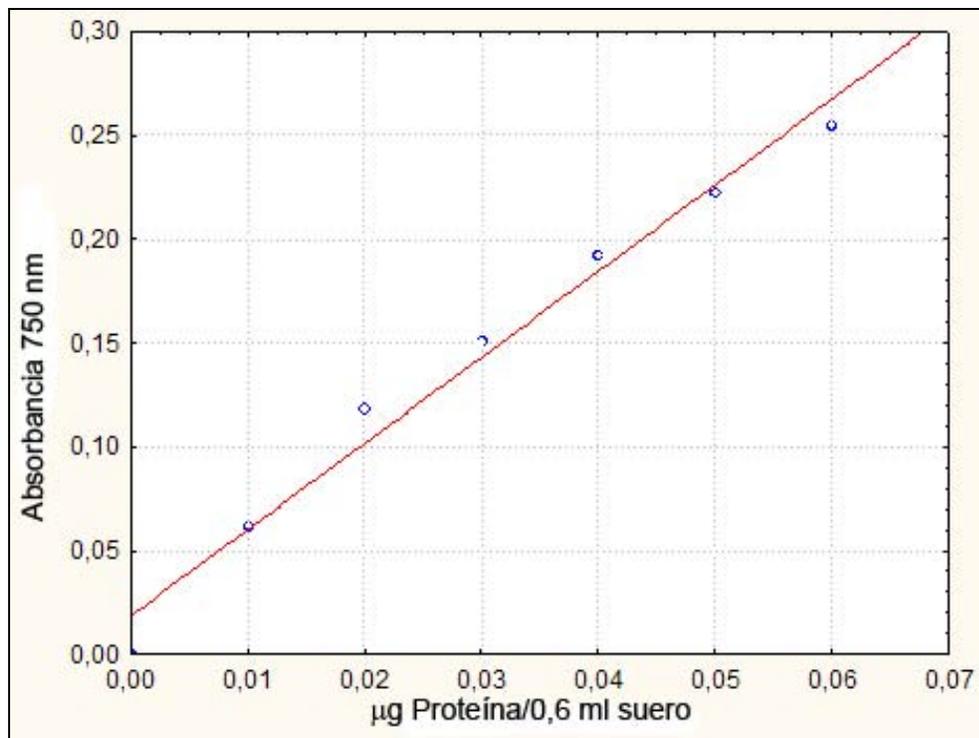
Muestra : El suero debe ser diluido 50 veces.

Descripción: El suero se obtiene mediante precipitación ácida pH 4,6, se transfieren 100 ml de leche en un matraz cónico limpio y seco, se lleva a 40°C y se agregan 3ml de ácido acético 33,3 % p/v y se colocan en baño maría. Luego de 10 minutos se agrega 3 ml de acetato de sodio 3,33 N, se mezcla y se esperan 3 minutos. Se filtra a través de filtro plegado Whatman #40 y se recibe el filtrado en matraz cónico seco.

Se adiciona a 0,6 ml del filtrado 3 ml de la solución C y se agita, se deja reposar durante 10 minutos a 22°C y se agrega 0,3 ml de la solución E y se agita. La solución es dejada en reposo por 30 minutos a 22°C, para luego medir la absorbancia a 750 nm.

Preparación del blanco : Se utiliza 0,6 ml de agua destilada y se continúa con el procedimiento anteriormente descrito.

Preparación de la curva estándar: Se preparó una solución de albúmina 0,05 % P/V para volúmenes entre 20 y 120 µl de la solución y se completa a un volumen final de 0,6 ml, y se continúa con el mismo procedimiento anterior.



$$\text{Proteína } (\mu\text{g}/0,6 \text{ ml suero}) = -0,00382 + 0,2366 (\text{absorbancia } 750 \text{ nm})$$

$$r^2 = 0,9812$$

ANEXO 4

Determinación del grado de proteólisis según Hull (1947)

Fundamento del método

El método se basa en la determinación de los aminoácidos al reaccionar con el reactivo de Folin y Ciocalteau, los cuales dan una coloración azul que se determina colorimétricamente.

Reactivos

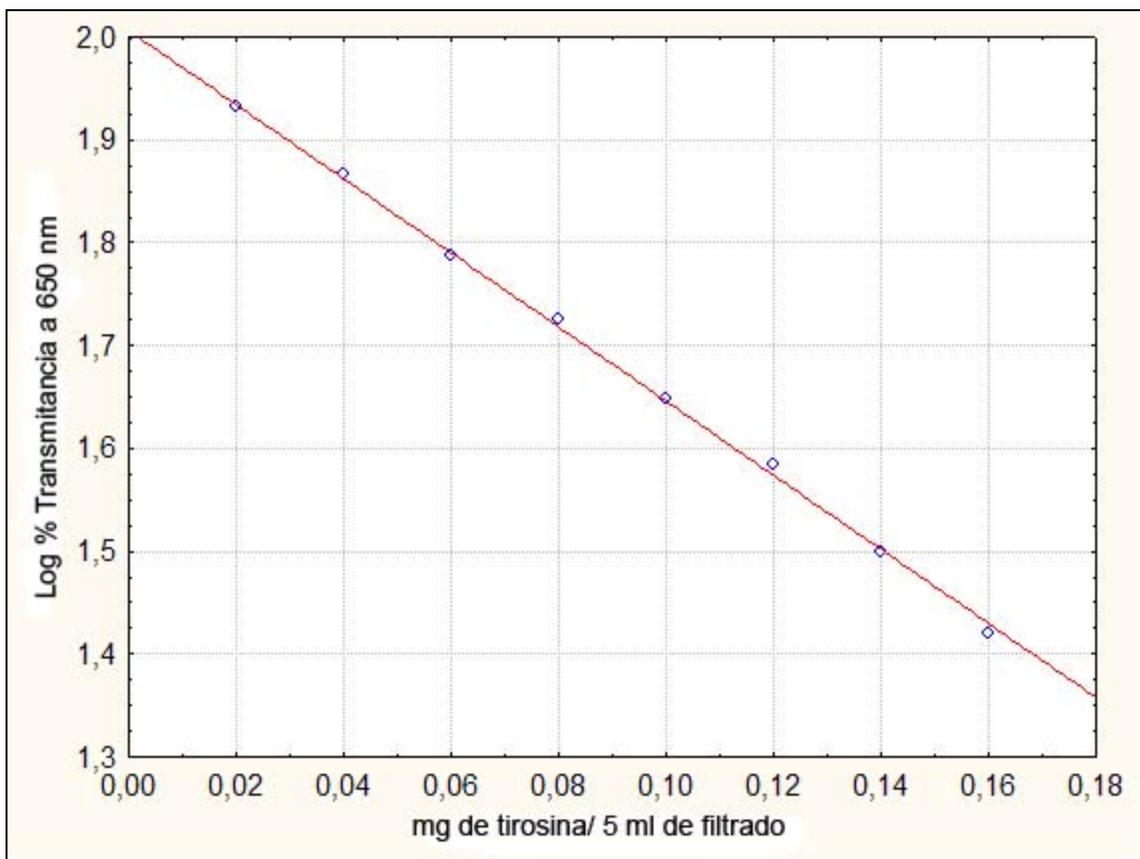
- Ácido tricloroacético 0,72 N.
- Reactivo fenol elaborado según Folin y Ciocalteau, dos volúmenes de agua destilada son adicionados por un volumen del reactivo fenol.
- Solución de carbonato de sodio anhidro y hexametáfosfato de sodio. Se disuelven 75 g de carbonato de sodio anhidro y 10 g de hexametáfosfato de sodio en agua destilada y se diluyen a 500 ml.

Procedimiento

1. Introducir en un tubo de ensayo limpio y seco: 5 ml de leche, 10 ml de ácido tricloroacético 0,72 N y 1 ml de agua destilada (Se utiliza un blanco de 5 ml de agua destilada).
2. Agitar vigorosamente
3. Dejar en reposo por 10 minutos
4. Filtrar usando papel filtro Whatman #1
5. Llevar 5 ml de filtrado a un matraz Erlenmeyer de 50 ml y adicionar 10 ml de la solución de carbonato de sodio y hexametáfosfato de sodio, cuya temperatura deberá ser de 40 °C.
6. Mezclar completamente y agregar 3 ml del reactivo Fenol (previamente diluido) agitando.

7. Mezclar nuevamente y dejar reposar.
8. Luego de 5 minutos aparecerá el color azul máximo.
9. Leer la transmitancia de la solución a 650 nm antes de 30 minutos

Preparación de curva estándar: La curva de calibración de tirosina es preparada agregando varias cantidades de tirosina a una serie de tubos de ensayo, completando un volumen de 6 ml con agua destilada y luego se sigue el proceso como una muestra de leche, exceptuando el filtrado.



$$\text{mg de tirosina/5ml} = 0,5562 - 0,2772 * (\text{Log \% Transmitancia})$$

$$r^2 = 0,9988$$

ANEXO 5

Determinación de hidroximetilfurfural (HMF)

Método espectrofotométrico descrito por Keeney y Bassette (1959), modificado por Kahlhofer (1982).

Fundamento del método. El HMF forma un compuesto de color amarillo con el ácido 2-tiobarbitúrico, el cual tiene su máximo de absorción a 443 nm y esta absorción es proporcional a la concentración de HMF formado.

Para la cuantificación del contenido de HMF se realiza una digestión selectiva que incluye un calentamiento con adición de ácido oxálico, para así convertir los compuestos intermediarios del pardeamiento a HMF.

Materiales y reactivos.

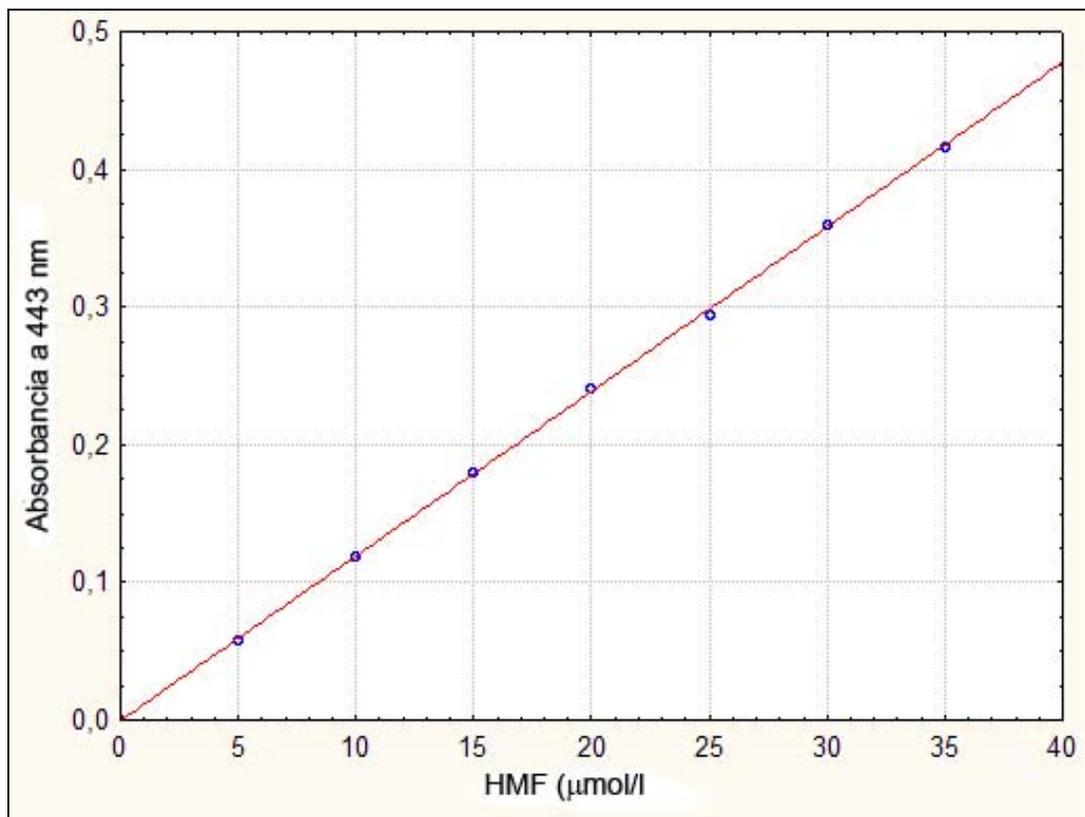
- Ácido oxálico [0,3 N]
- Ácido tricloroacético [40%]
- Ácido 2-tiobarbitúrico [0,05 M]
- Solución estándar de HMF [0,01M]
- Papel Filtro Whatman #42
- Espectrofotómetro, Spectronic Genesys 5.
- Baños termostáticos a 40°C y a 100°C
- Diverso material de vidrio.

Metodología.

1. En un tubo de ensayo de 50 ml agregar 10 ml de leche + 5 ml de ácido oxálico [0,3 N], tapar y mezclar el tubo.
2. Colocar el tubo en un baño termostático a 100°C durante 1 hora
3. Enfriar a temperatura ambiente y agregar 5 ml de ácido tricloroacético [40%].

4. Filtrar a través de papel Whatman #42.
5. Sacar 4 ml de filtrado y agregar 1 ml de ácido 2-tiobarbitúrico [0,05 M].
6. Incubar en baño termostático a 40°C durante 30 a 40 minutos.
7. Enfriar a temperatura ambiente y leer absorbancia a 443 nm, contra un blanco preparado igual que la muestra excepto que no se le agrega el ácido tiobarbitúrico.

Curva de calibración de HMF. A partir de una solución acuosa de HMF 0,01 M se preparan una serie de diluciones entre 5 y 30 [μM] de HMF. La curva de calibración se construye tratando estas soluciones de la misma forma que las muestras, exceptuando la etapa de calentamiento a ebullición. Las mediciones de absorbancia son convertidas a micromoles de HMF por litro de leche por medio de la solución estándar de HMF.



$$\text{HMF } (\mu\text{mol/l}) = 0,03077 + 83,685 \cdot (\text{Absorbancia a } 443\text{nm})$$

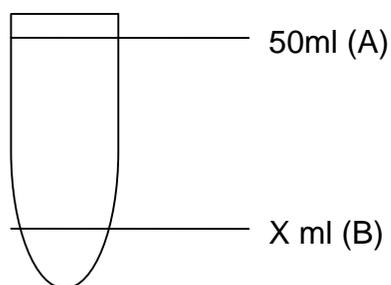
$$r^2 = 0,9998$$

ANEXO 6

Determinación del índice de sedimentación

Método descrito por Rustom *et al.*(1995) modificado por Cano-Ruiz y Richter (1998).

Las muestras son mezcladas, y se toman 50 ml (A) y se llevan a un tubo de ensayo cónico. Luego se centrifuga a 325 x g por 20 minutos o 1100 rpm por 20 minutos. Posteriormente se mide la altura del sedimento (X) formado en ml (B). El índice de sedimentación se expresa como $IS=B/A$.



ANEXO 7

Recuentos microbiológicos de leche termizada y reconstituida

Tipo de leche	Recuento total (ufc/mL)	Recuento psicrotróficas (ufc/mL)
Termizada	$5,1 \times 10^5$	$2,4 \times 10^4$
Reconstituida	$4,1 \times 10^4$	$1,46 \times 10^4$

Resultados correspondientes a 3 repeticiones.

ANEXO 8

Análisis de varianza para HMF en los diferentes tipos de leche y tratamientos térmicos

Fuente	Suma de cuadrados	G.l	Cuadrado medio	F	p-valor
Tipo de leche	237,163	4	59,2908	152,02	0,0000
Error	3,90011	10	0,390011		
Total	241,063	14			

Prueba de Tukey para HMF en los diferentes tipos de leche y tratamientos térmicos

Tipo de leche	n	Promedio	Grupos homogéneos	
Termizada	3	2,59833	X	c
Reconstituida	3	3,463	X	c
T1	3	6,86933	X	b
T2	3	7,02167	X	b
T3	3	13,8863	X	a
Contraste		Diferencia	+/- límites	
Reconstituida – T1		* -3,40633	1,6783	
Reconstituida – T2		* -3,55867	1,6783	
Reconstituida – T3		* -10,4233	1,6783	
Reconstituida – Termizada		*0,864667	1,6783	
T1 – T2		-0,152333	1,6783	
T1 – T2		* -7,017	1,6783	
T1 – Termizada		* 4,271	1,6783	
T2 – T3		* -6,86467	1,6783	
T2 – Termizada		* 4,42333	1,6783	

*Denota diferencia estadísticamente significativa

ANEXO 9

Análisis de varianza para proteínas del suero en los diferentes tipos de leche y tratamientos térmicos

Fuente	Suma de cuadrados	G.l	Cuadrado medio	F	p-valor
Tipo de leche	76,8154	4	19,2038	960,64	0,0000
Error	0,199907	10	0,0199907		
Total	77,0153	14			

Prueba de Tukey para proteínas del suero en los diferentes tipos de leche y tratamientos térmicos

Tipo de leche	n	Promedio	Grupos homogéneos
T3	3	0,365333	X d
T2	3	1,43667	X c
Reconstituida	3	2,45567	X b
T1	3	2,63933	X b
Termizada	3	7,00433	X a
Contraste		Diferencia	+/- límites
Reconstituida – T1		-0,183667	0,379967
Reconstituida – T2		* 1,019	0,379967
Reconstituida – T3		* 2,09033	0,379967
Reconstituida – Termizada		* -4,54867	0,379967
T1 – T2		* 1,20267	0,379967
T1 – T3		* 2,274	0,379967
T1 – Termizada		* -4,365	0,379967
T2 – T3		* 1,07133	0,379967
T2 – Termizada		* -5,56767	0,379967
T3 – Termizada		* -6,639	0,379967

*Denota diferencia estadísticamente significativa

ANEXO 10

Análisis de varianza para proteólisis en los diferentes tipos de leche y tratamientos térmicos

Fuente	Suma de cuadrados	G.l	Cuadrado medio	F	p-valor
Tipo de leche	0,0000453333	4	0,0000113333	1,10	0,4067
Error	0,000102667	10	0,0000102667		
Total	0,000148	14			

Análisis de varianza para pH en los diferentes tipos de leche y tratamientos térmicos

Fuente	Suma de cuadrados	G.l	Cuadrado medio	F	p-valor
Tipo de leche	0,00646667	4	0,00161667	3,07	0,0684
Error	0,00173333	10	0,000526667		
Total	0,00413333	14			

ANEXO 11

Análisis estadístico para proteólisis en leches UHT

Valores promedio para proteólisis en leches UHT

Nivel	n	Promedio	Error	Límite	Límite
Gran promedio	126	0,0664286			
Tratamiento					
T1	42	0,0783571	0,00260559	0,0731964	0,0835179
T2	42	0,062381	0,00260559	0,0572202	0,0675417
T3	42	0,0585476	0,00260559	0,0533869	0,0637083
T° Almacenamiento					
20°C	63	0,056619	0,00212746	0,0524053	0,0608328
35°C	63	0,0762381	0,00212746	0,0720244	0,0804518
Tiempo Almacenamiento					
0	18	0,0474444	0,00398011	0,0395613	0,0553276
15	18	0,0493889	0,00398011	0,0415058	0,057272
30	18	0,0629444	0,00398011	0,0550613	0,0708276
45	18	0,0660000	0,00398011	0,0581169	0,0738831
60	18	0,0680556	0,00398011	0,0601724	0,0759387
75	18	0,0838889	0,00398011	0,0760058	0,091772
90	18	0,0872778	0,00398011	0,0793947	0,0951609

Análisis de varianza para 1/proteólisis.

Fuente	suma cuadrados	g.l	cuadrado medio	F-calc	Valor-p
Efectos principales					
A: Tratamiento	108,337	2	54,1685	43,81	0,0000
B: T° Almacenamiento	286,529	1	286,529	231,75	0,0000
C: t_ Almacenamiento	1118,26	6	186,377	150,75	0,0000
Interacciones					
AB	66,3082	2	33,1541	26,82	0,0000
AC	161,649	12	13,4708	10,90	0,0000
BC	128,402	6	21,4003	17,31	0,0000
Residual	118,691	96			
Total (corregido)	1988,18	125			

Prueba de Tukey para 1/Proteólisis por tratamiento en leches UHT.

Tratamiento	n	promedio	grupos homogéneos
T1	42	15,1625	X b
T2	42	16,7914	X a
T3	42	17,3478	X a
Contraste			Diferencia
T1-T2			* -1,62894
T1-T3			* -2,18527
T2-T3			0,55633
			+/- límites
T1-T2			0,577643
T1-T3			0,577643
T2-T3			0,577643

* Denota diferencia estadísticamente significativa.

Prueba de Tukey para 1/proteólisis por temperatura de almacenamiento en leches UHT.

Tº Almacenamiento	n	promedio	grupos homogéneos	
35	63	14,9259	X b	
20	63	17,9419	X a	
Contraste			Diferencia	+/- límites
20-35			* 3,01599	0,393256

* Denota diferencia estadísticamente significativa.

Prueba de Tukey para 1/proteólisis por tiempo de almacenamiento en leches UHT

T almacenamiento	n	promedio	grupos homogéneos	
90	18	12,9708	X c	
75	18	13,3848	X c	
60	18	15,2700	X b	
45	18	15,6422	X b	
30	18	16,1537	X b	
15	18	20,3019	X a	
0	18	21,3138	X a	
Contraste			Diferencia	+/- límites
0-15			1,01188	1,11623
0-30			* 5,16015	1,11623
0-45			* 5,67162	1,11623
0-60			* 6,04387	1,11623
0-75			* 7,92903	1,11623
0-90			* 8,34304	1,11623
15-30			* 4,14827	1,11623
15-45			* 4,65974	1,11623
15-60			* 5,03199	1,11623
15-75			* 6,91715	1,11623
15-90			* 7,33116	1,11623
30-45			0,51147	1,11623
30-60			0,88372	1,11623
30-75			* 2,76888	1,11623
30-90			* 3,18289	1,11623
45-60			0,37225	1,11623
45-75			* 2,25741	1,11623
45-90			* 2,67142	1,11623
60-75			* 1,88516	1,11623
60-90			* 2,29917	1,11623
75-90			0,41401	1,11623

* Denota diferencia estadísticamente significativa.

ANEXO 12

Análisis estadístico para HMF en leches UHT

Valores promedio para HMF en leches UHT

Nivel	n	Promedio	Error	Límite	Límite
Gran promedio	126	11,1249			
Tratamiento					
T1	42	10,0256	0,40555	9,22238	10,8289
T2	42	9,33731	0,40555	8,53407	10,1406
T3	42	14,0118	0,40555	13,2086	14,8151
T° Almacenamiento					
20°C	63	8,77743	0,33113	8,12158	9,43327
35°C	63	13,4724	0,33113	12,8166	14,1283
Tiempo Almacenamiento					
0	18	9,25911	0,619488	8,03213	10,4861
15	18	9,22122	0,619488	7,99425	10,4482
30	18	10,1026	0,619488	8,87563	11,3296
45	18	11,344	0,619488	10,117	12,571
60	18	10,4839	0,619488	9,25691	11,7109
75	18	13,467	0,619488	12,24	14,694
90	18	13,9966	0,619488	12,7696	15,2236

Análisis de varianza para \log_{10} (HMF)

Fuente	suma cuadrados	g.l	cuadrado medio	F-calc	Valor-p
Efectos principales					
A: Tratamiento	1,02237	2	0,51119	270,19	0,0000
B: T° Almacenamiento	1,05508	1	1,05508	557,67	0,0000
C: t_ Almacenamiento	0,39806	6	0,06634	35,07	0,0000
Interacciones					
AB	0,20294	2	0,10147	53,63	0,0000
AC	0,10825	12	0,00902	4,77	0,0000
BC	0,69281	6	0,11547	61,03	0,0000
Residual	0,18163	96	0,00189		
Total (corregido)	3,66113	125			

Prueba de Tukey para \log_{10} (HMF) por tratamiento en leches UHT.

Tratamiento	n	promedio	grupos homogéneos
T2	42	0,94226	X b
T1	42	0,95641	X b
T3	42	1,14003	X a
Contraste			Diferencia
T1-T2			0,014142
T1-T3			* -0,183621
T2-T3			* -0,197762
			+/- límites
T1-T2			0,0225964
T1-T3			0,0225964
T2-T3			0,0225964

* Denota diferencia estadísticamente significativa.

Prueba de Tukey para log₁₀ (HMF) por temperatura de almacenamiento en leches UHT.

T° Almacenamiento	n	promedio	grupos homogéneos	
20	63	0,92139	X b	
35	63	1,10441	X a	
Contraste			Diferencia	+/- límites
20-35			* -0,183015	0,0153835

* Denota diferencia estadísticamente significativa.

Prueba de Tukey para log₁₀ (HMF) por tiempo de almacenamiento en leches UHT

T almacenamiento	n	promedio	grupos homogéneos	
0	18	0,941141	X e	
15	18	0,948461	X X de	
30	18	0,990807	X X cd	
60	18	0,997004	X X bc	
45	18	1,035430	X b	
75	18	1,082950	X a	
90	18	1,094500	X a	
Contraste			Diferencia	+/- límites
0-15			-0,007320	0,043665
0-30			* -0,049666	0,043665
0-45			* -0,094288	0,043665
0-60			* -0,055863	0,043665
0-75			* -0,141905	0,043665
0-90			* -0,153355	0,043665
15-30			-0,042345	0,043665
15-45			* -0,086968	0,043665
15-60			* -0,048543	0,043665
15-75			* -0,134485	0,043665
15-90			* -0,146035	0,043665
30-45			* -0,044623	0,043665
30-60			-0,006197	0,043665
30-75			* -0,092139	0,043665
30-90			* -0,103689	0,043665
45-60			-0,038425	0,043665
45-75			* -0,047517	0,043665
45-90			* -0,059066	0,043665
60-75			* -0,085942	0,043665
60-90			* -0,097492	0,043665
75-90			-0,011550	0,043665

* Denota diferencia estadísticamente significativa.

ANEXO 13

Análisis estadístico para pH en leches UHT

Valores promedio para pH en leches UHT

Nivel	n	Promedio	Error	Límite	Límite
Gran promedio	126	6,61754			
Tratamiento					
T1	42	6,58905	0,00502658	6,57909	6,599
T2	42	6,6331	0,00502658	6,62314	6,64305
T3	42	6,63048	0,00502658	6,62052	6,64043
T° Almacenamiento					
20°C	63	6,64684	0,00410419	6,6387	6,65495
35°C	63	6,58825	0,00410419	6,58013	6,59638
Tiempo Almacenamiento					
0	18	6,70333	0,00767823	6,68813	6,71954
15	18	6,67389	0,00767823	6,65868	6,6891
30	18	6,61111	0,00767823	6,5959	6,62632
45	18	6,62222	0,00767823	6,60701	6,63743
60	18	6,56778	0,00767823	6,55257	6,58299
75	18	6,57222	0,00767823	6,55701	6,58743
90	18	6,57222	0,00767823	6,55701	6,58743

Análisis de varianza para pH

Fuente	suma cuadrados	g.l	cuadrado medio	F-calc	Valor-p
Efectos principales					
A: Tratamiento	0,051287	2	0,0256437	33,7	0,0000
B: T° Almacenamiento	0,108064	1	0,1080640	142,00	0,0000
C: t_ Almacenamiento	0,309287	6	0,0051548	67,74	0,0000
Interacciones					
AB	0,006633	2	0,00331667	4,36	0,0154
AC	0,021579	12	0,00179828	2,36	0,0104
BC	0,021830	6	0,00363836	4,78	0,0003
Residual	0,073056	96	0,000760995		
Total (corregido)	0,591737	125			

Prueba de Tukey para pH por tratamiento en leches UHT.

Tratamiento	n	promedio	grupos homogéneos	
T1	42	6,58905	X	b
T3	42	6,63048	X	a
T2	42	6,63310	X	a
Contraste			Diferencia	+/- límites
T1-T2			* -0,0440476	0,014331
T1-T3			* -0,0414286	0,014331
T2-T3			0,0026191	0,014331

* Denota diferencia estadísticamente significativa.

Prueba de Tukey para pH por temperatura de almacenamiento en leches UHT.

Tº Almacenamiento	n	promedio	grupos homogéneos	
20	63	6,58825	X	b
35	63	6,64683	X	a
Contraste			Diferencia	+/- límites
20-35			* 0,0585714	0,00975649

* Denota diferencia estadísticamente significativa.

Prueba de Tukey para pH por tiempo de almacenamiento en leches UHT

T almacenamiento	n	Promedio	Grupos homogéneos	
60	18	6,56778	X	d
75	18	6,57222	X	d
90	18	6,57222	X	d
30	18	6,61111	X	c
45	18	6,62222	X	c
15	18	6,67389	X	b
0	18	6,70333	X	a
Contraste			Diferencia	+/- límites
0-15			* 0,0294444	0,027693
0-30			* 0,0922222	0,027693
0-45			* 0,0811111	0,027693
0-60			* 0,1355560	0,027693
0-75			* 0,1311110	0,027693
0-90			* 0,1311110	0,027693
15-30			* 0,0627778	0,027693
15-45			* 0,0516667	0,027693
15-60			* 0,1061110	0,027693
15-75			* 0,1016670	0,027693
15-90			* 0,1016670	0,027693
30-45			- 0,0111111	0,027693
30-60			* 0,0433333	0,027693
30-75			* 0,0388889	0,027693
30-90			* 0,0388889	0,027693
45-60			* 0,0544444	0,027693
45-75			* 0,05	0,027693
45-90			* 0,05	0,027693
60-75			- 0,0044444	0,027693
60-90			- 0,0044444	0,027693
75-90			0,0	0,027693

* Denota diferencia estadísticamente significativa.

ANEXO 14

Análisis estadístico para índice de sedimentación en leches UHT

Valores promedio para índice de sedimentación en leches UHT

Nivel	n	Promedio	Error	Límite	Límite
Gran promedio	126	0,0052381			
Tratamiento					
T1	42	0,0	0,00105558	-0,0020907	0,0020907
T2	42	0,00571429	0,00105558	0,00362358	0,00780499
T3	42	0,01	0,00105558	0,0079093	0,0120907
Tº Almacenamiento					
20°C	63	0,0	0,000861873	-0,00170705	0,00170705
35°C	63	0,0104762	0,000861873	0,00876914	0,0121832
Tiempo Almacenamiento					
0	18	0,0	0,00161242	-0,0031936	0,0031936
15	18	0,00333333	0,00161242	0,000139731	0,00652694
30	18	0,00333333	0,00161242	0,000139731	0,00652694
45	18	0,00666667	0,00161242	0,00347306	0,00985027
60	18	0,00666667	0,00161242	0,00347306	0,00985027
75	18	0,00666667	0,00161242	0,00347306	0,00985027
90	18	0,01	0,00161242	0,0068064	0,0131936

Prueba de Kruskal-Wallis para índice sedimentación por factor tratamiento en leches UHT

Tratamiento	n	Suma de rangos	H	Valor p
T1	42	2037,0	22,194	0,0000
T3	42	2775,0		
T2	42	3189,0		

Prueba de Tukey de rangos para índice de sedimentación por tratamiento en leches UHT.

Contraste	Diferencia de rangos	q	P<0,05
T3-T1	1152,0	4,868	Si
T3-T2	414,0	1,749	No
T2-T1	738,0	3,118	No

Prueba de Kruskal-Wallis para índice sedimentación por factor temperatura de almacenamiento en leches UHT

Tº Almacenamiento	n	Suma de rangos	H	Valor p
20	63	3055,5	38,80266	0,0000
35	63	4945,5		

Prueba de Kruskal-Wallis para índice de sedimentación por factor tiempo de almacenamiento en leches UHT

T almacenamiento	n	Suma de rangos	H	Valor p
0	18	873,0	10,46748	0,1063
15	18	1057,5		
30	18	1057,5		
45	18	1242,0		
60	18	1242,0		
75	18	1242,0		
90	18	1287,0		