



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**USO DE OPTIGRAPH PARA ESTIMAR CAPACIDAD COAGULATIVA DE LECHE  
DE VACA EN UN RODEO COMERCIAL**

**Por**

**Ignacio Ramón GONZÁLEZ COCARO  
Lucía RABAQUINO SARTI  
Gastón RODRIGUEZ MUNIZ**

**TESIS DE GRADO** presentada como  
uno de los requisitos para obtener el  
título de Doctor en Ciencias  
Veterinarias

**Orientación: Higiene, inspección,  
control y tecnología de los alimentos  
de origen animal**

**MODALIDAD: Ensayo experimental**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2017**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

**Tesis de grado aprobada por:**

**Presidente de mesa:**

---

Dra. Cecilia Cajaville

**Segundo miembro (Tutor):**

---

Dr. Darío Hirigoyen

**Tercer miembro:**

---

Dr. Álvaro González

**Cuarto miembro:**

---

Dra. Rosario de los Santos

**Fecha:**

28/11/2017

**Autores:**

---

Br. Ignacio González Cocaro

---

Br. Lucía Rabaquino Sarti

---

Br. Gastón Rodríguez Muniz

## **AGRADECIMIENTOS**

Nuestro más sincero agradecimiento:

Al Profesor titular del Departamento de Ciencia y Tecnología de la leche Dr. MSc. Darío Hirigoyen por su enriquecedora contribución científica al desarrollo de este trabajo, por su disponibilidad de tiempo y por sus continuas y valiosas orientaciones.

A la Dra. Rosario de los Santos y a la Dr. Lucía Grille por su gran apoyo para la elaboración de esta tesis y la culminación de nuestros estudios profesionales.

A la Q.F. Marina Constantin por su confianza, ánimo, accesibilidad y apoyo constante en las tareas prácticas en el laboratorio.

Al productor Enrique Celio por su valorable colaboración y confianza sin la cual no hubiésemos podido realizar este trabajo.

Al Sr. Wilfredo A. Ibañez por su colaboración en la realización de los Análisis Estadísticos.

A todo el equipo de COLAVECO por el apoyo recibido en las diferentes etapas del trabajo.

A nuestra Facultad por habernos permitido formarnos en ella, y gracias a todos los docentes que fueron partícipes de este proceso ya sea de manera directa e indirecta en todos estos años.

Agradecemos a nuestras familias y amigos por ser los principales promotores de nuestros sueños, y por confiar en nosotros y en nuestras expectativas.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>PÁGINA DE APROBACIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>3</b>
<b>LISTA DE TABLAS Y FIGURAS</b> .....	<b>6</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>9</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>11</b>
2.1 LECHE.....	11
2.2 PRODUCCIÓN MUNDIAL DE LECHE.....	11
2.3 PRODUCCIÓN DE LECHE EN URUGUAY.....	11
2.4 HISTORIA DE LA QUESERÍA EN URUGUAY.....	12
2.5 CONSUMO INTERNO DE QUESO .....	12
2.6 QUESERÍA Y CALIDAD DE LECHE.....	12
2.7 COAGULACIÓN DE LA LECHE EN QUESOS .....	14
2.8 OPTIGRAPH Y OTROS MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA COAGULACIÓN .....	19
2.9 CAPACIDAD COAGULATIVA DE LA LECHE .....	21
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL .....	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
4.1 MATERIALES .....	23
4.1.1 <i>Establecimiento y animales</i> .....	23
4.1.2 <i>Toma de muestras</i> .....	23
4.2 MÉTODO .....	23
4.2.1 <i>Análisis de rcs, composición y ph</i> .....	23
4.2.2 <i>Coagulación de la leche</i> .....	23
4.2.3 <i>Optigraph</i> .....	24
4.2.4 <i>Preparación de la muestra para el optigraph</i> .....	24
4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	24
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
5.1 COMPOSICIÓN (%), PH, CRIOSCOPIA Y RCS (CEL/ML) .....	26
5.2 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA PARA LOS PARÁMETROS DE COAGULACIÓN R, A20, A30 .....	26
5.3 CORRELACIONES ENTRE PROPIEDADES DE COAGULACIÓN, COMPOSICIÓN Y CRIOSCOPIA .....	27
5.4 DETERMINACIÓN DE COMPONENTES PRINCIPALES.....	27
5.5 MODELO MIXTO PARA R, A20 Y A30.....	28
5.6 IDENTIFICACIÓN DE LOS INDIVIDUOS MÁS APTOS DEL RODEO LECHERO	

PARA LA PRODUCCIÓN DE QUESO TENIENDO EN CUENTA R, A20 Y A30. 30

<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>37</b>
6.1 COMPOSICIÓN, CAPACIDAD COAGULATIVA DE LA LECHE Y DÍAS EN LACTACIÓN .....	37
6.2 UTILIZACIÓN DE OPTIGRAPH, ALCANCES Y LIMITACIONES DEL MÉTODO	37
6.3 ORDENAMIENTO DE LOS ANIMALES DE ACUERDO A LAS PCL.....	38
6.4 PERSPECTIVAS .....	38
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>40</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>41</b>
ANEXO 1 .....	41
1.1 VALIDACIÓN DE PARÁMETROS OPTIGRAPH®.....	41
1.2 LECHE SIN CONSERVANTE COMPARADA CON LECHE CON CONSERVANTE .....	41
1.3 LECHE FRESCA COMPARADA CON LECHE CONGELADA (CON CONSERVANTE Y SIN CONSERVANTE).....	42
1.4 LINEALIDAD.....	43
1.5 LÍMITE DE DETECCIÓN – CUANTIFICACIÓN .....	45
1.7 LINEALIDAD (35°C).....	47
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>49</b>

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA I. DATOS PROCESADOS DE MUESTRAS RECIBIDAS EN COLAVECO EN EL PERIODO DICIEMBRE – FEBRERO 2017.....	13
TABLA II. TIPOS DE COAGULACIÓN: ENZIMÁTICA, ÁCIDA, MIXTA.....	15
TABLA III. COMPOSICIÓN (%), PH Y CRIOSCOPIA DE LAS MUESTRAS DE LECHE UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS DE PROPIEDADES DE COAGULACIÓN DE LA LECHE .....	26
TABLA IV. ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS DE PROPIEDADES COAGULATIVAS DE LA LECHE.....	26
TABLA V. CORRELACIÓN Y PROBABILIDAD ENTRE LAS VARIABLES DE COAGULABILIDAD Y LA FRACCIÓN PROTEICA DE LA LECHE .....	27
TABLA VI. CORRELACIÓN Y PROBABILIDAD ENTRE LAS VARIABLES DE COAGULABILIDAD Y MATERIA GRASA (%), PH Y CRIOSCOPIA.....	27
TABLA VII. VALORES PROPIOS Y PROPORCIÓN DE COMPONENTES PRINCIPALES .....	27
TABLA VIII. CORRELACIONES CON VARIABLES ORIGINALES .....	28
TABLA IX. RELACIÓN ENTRE R, DÍAS EN LACTACIÓN Y COMPONENTES PRINCIPALES .....	29
TABLA X. RELACIÓN ENTRE A20, DÍAS EN LACTACIÓN Y COMPONENTES PRINCIPALES .....	29
TABLA XI. RELACIÓN ENTRE A30, DÍAS EN LACTACIÓN Y COMPONENTES PRINCIPALES .....	30
TABLA XII. RANKING DE INDIVIDUOS SEGÚN R .....	30
TABLA XIII. RANKING DE INDIVIDUOS SEGÚN A20.....	33
TABLA XIV. RANKING DE INDIVIDUOS SEGÚN A30 .....	35
FIGURA I. DIAGRAMA DE FLUJO ESQUEMÁTICO QUE MUESTRA LAS ETAPAS PRINCIPALES EN LA FABRICACIÓN DE UN QUESO.....	14
FIGURA II. CLASIFICACIÓN DE LOS QUESOS Y PRODUCTOS AFINES BASADOS PRINCIPALMENTE EN EL MÉTODO DE COAGULACIÓN DE LA LECHE.....	15
FIGURA III. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA DE ASPARTIL ENDOPEPTIDASA .....	16
FIGURA IV. SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE K-CASEÍNA .....	17
FIGURA V. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA COAGULACIÓN DE LA LECHE .....	18
FIGURA VI. FACTORES PRINCIPALES QUE AFECTAN AL TIEMPO DE COAGULACIÓN DEL CUAJO (ECA) DE LA LECHE .....	19
FIGURA VII. DIAGRAMA PRODUCIDO POR UN MEDIDOR DE COAGULACIÓN DE LA LECHE, Y LOS RASGOS DE PROPIEDAD DE COAGULACIÓN DE LECHE CALCULADOS A PARTIR DEL DIAGRAMA .....	21

## LISTA DE ABREVIATURAS

*a20* Firmeza de cuajada a los 20 minutos de adición de cuajo

*a30* Firmeza de cuajada a los 30 minutos de adición de cuajo

*CN* Caseína

*CP* Componentes principales

*CS* Células somáticas

*MG* Materia grasa

*NIR* Espectroscopía de infrarrojo cercano

*PCL* Propiedad coagulativa de la leche

*PV* Proteína verdadera

*PT* Proteína total

*R* y *RCT* Tiempo de coagulación

*RCS* Recuento de células somáticas

## RESUMEN

Hoy en día las exigencias de los diferentes mercados y consumidores llevan a que las industrias y productores artesanales de queso busquen mejorar su producto. Por este motivo, evaluar ciertas características de la leche es fundamental para obtener mejores rendimientos y calidad. Las propiedades coagulativas de la leche (PCL) se están convirtiendo en un factor de estudio de gran importancia para los rodeos de vacas lecheras. El objetivo de este trabajo fue evaluar en un rodeo vacuno distintas variables coagulativas de la leche considerando la composición de la misma, las características físico-químicas y los días en lactación, a fin de elaborar un ranking de animales en base a las PCL utilizando como herramienta el Optigraph.

Este trabajo se realizó en el establecimiento “La Cumbre”, ubicado en la Ruta 1 KM 114,500 de Nueva Helvecia, Colonia, Uruguay, el cual elabora quesos artesanales desde 1997 y pertenece a Enrique Celio que desarrolla un sistema de explotación familiar. Se tomaron muestras de 60 vacas Holstein que estaban sometidas a un plan de alimentación, que tiene como base anual forrajera *Dactylis glomerata* en mezcla con alfalfa (*Medicago sativa*), complementando en época estival con sorgo forrajero (*Sorghum*) y en época invernal con avena (*Avena sativa*). La alimentación se complementó también con silo de maíz (*Zea mays*) en el periodo de abril a setiembre, utilizando la planta entera; y con cebada (*Hordeum vulgare*) seca molida en el período de diciembre a marzo. En la sala de ordeño se alimentó a los animales con 5Kg de maíz húmedo o seco más un kilo de núcleo de pellet de soja (*Glycine max*) y fosfato de calcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ). La información obtenida en este estudio, junto con las correlaciones que existen entre las PCL y la composición de la leche, son una herramienta para mejorar la producción de quesos y poder avanzar en el estudio de estas características. Se concluyó que la determinación de las PCL es útil para los productores uruguayos que deseen mejorar la calidad del producto elaborado y que lleven una base de datos de la cual extraer la información, sobre todo teniendo en cuenta que los rodeos nacionales están conformados por la raza Holstein, la cual dentro de las razas lecheras no es la que presenta mejores PCL e incluso presenta animales no coagulantes.



## SUMMARY

Nowadays, the demands of different markets and consumers lead cheese industries and producers to seek to improve their product. For this reason, evaluating certain characteristics of the milk seems fundamental in order to obtain higher yields and better quality. The milk coagulation properties (MCP) are becoming a very important subject of study for herds of dairy cows. The main objective of this study was to evaluate different coagulation variables of the milk in a herd of cows taking into account its composition, the physicochemical characteristics and the lactation days, with the aim of elaborating an animal ranking based on the MCP using the Optigraph as the main tool. This investigation was carried out in the establishment "La Cumbre" located in Ruta 1 km 114.500, in Nueva Helvecia, Colonia, Uruguay; where handmade cheese is elaborated since 1997, and which belongs to Enrique Celio who develops a familiar exploitation system. The samples were taken from 60 Holstein cows that were subjected to a feeding plan based on an annual forage dactylis (*Dactylis glomerata*) mixed with Alfalfa (*Medicago sativa*), complemented with forage sorghum (*Sorghum*) in summer season, and with oat (*Avena sativa*) in winter season. The feeding was also complemented with corn silo (*Zea mays*) in the time period from April to September, using the whole plant, while from December to March it was complemented with dry ground barely (*Hordeum vulgare*). In the milking parlor, the cows were fed with 5 kg of wet or dry corn, plus one kilo of soybean pellet core (*Glycine max*) and calcium phosphate ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ). The information obtained in this study, together with the existing correlations between the MCP and the milk composition, are a key tool to improve the cheese production and to develop the study of these characteristics. It was concluded that the determination of the MCP is useful for Uruguayan producers who wish to improve the quality of the product elaborated, and who have a database from where to take the information, especially taking into account that national herds are formed by the Holstein breed.

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción lechera es una forma especializada de la ganadería más intensiva y asociada a la agricultura forrajera. El Uruguay cuenta con 3919 establecimientos lecheros, los cuales pueden ser de explotación exclusiva o complementaria de otras explotaciones. Estos abastecen el consumo interno que es de los más elevados del continente y mantienen una corriente exportadora de productos lácteos que se intensifica, siendo el queso el segundo producto de exportación lácteo más importante. De hecho, un 27% de los establecimientos producen queso artesanal en el predio (INALE, 2016).

Desde 1990, la quesería artesanal acompañó el crecimiento de la cadena lechera en Uruguay, constituyéndose en un subsector de la producción agropecuaria, que de a poco fue demostrando su inserción a nivel nacional (Anchieri y col., 2007).

A pesar de que nuestro país tiene uno de los costos de producción más bajos del mundo, en el año 2015 el sector lechero atravesó una de las peores crisis causando grandes pérdidas a los productores. El Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca anunció distintas medidas de apoyo con el fin de promover el sector. La elaboración del queso es un proceso complejo en el que intervienen varias etapas y diversas transformaciones bioquímicas. Todas estas variables influyen sobre el rendimiento, la composición y la calidad del queso (Walstra y col., 2001).

A continuación, se presentará una revisión bibliográfica donde quedarán plasmados temas relacionados con la producción mundial y nacional de leche, la historia y el consumo de queso en Uruguay; como también el proceso de coagulación de la leche y los equipos que permiten la medición de diferentes parámetros durante la misma. Este trabajo busca evaluar las PCL en conjunto con las características de la composición, el pH y el recuento de células somáticas (RCS), mediante una herramienta analítica llamada Optigraph; logrando resultados que permitan a los productores conocer y seleccionar los animales que brindan mejor aptitud quesera en su leche y por lo tanto mejorar el rendimiento y calidad de los quesos obtenidos.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Leche**

La leche se define como el producto integral del ordeño total e ininterrumpido de vacas lecheras sanas, adecuadamente nutridas y no fatigadas, obtenida de forma higiénica y sin contener calostro. Desde un punto de vista físico-químico, la leche es una mezcla compleja y heterogénea de muchos componentes: un sistema coloidal con dos fases, una solución de minerales y carbohidratos disueltos en agua, una suspensión proteica y finalmente, una emulsión de grasa en agua (Centro de información oficial, 1994).

Las propiedades físico-químicas que nos permiten caracterizar la leche son también propiedades de interés para determinar la calidad y la autenticidad del producto. Estas propiedades dependen de factores intrínsecos (composición y estructura) y extrínsecos (temperatura y tratamiento luego del ordeño) (Walstra, 2001). Las PCL se definen como la capacidad de la leche para reaccionar con una enzima de coagulación y formar una cuajada con una firmeza adecuada en un tiempo razonable para la elaboración de quesos. Estas están influenciadas por muchos factores: el tipo y concentración de enzima utilizada, la temperatura y procedimiento de elaboración, así como la composición de la leche como materia prima (Bittante, 2011).

La composición de la leche está influenciada por la raza, la edad y el número de lactancias, entre otros factores (Politis y Ng Kwai-Hang, 1989; Aleandri et al, 1989). En nuestro país, los productores más destacados mantienen al día registros donde se detallan todas estas variables. Gracias a la disponibilidad de estos datos y en base a ellos, se podría predecir la capacidad de coagulación de la leche de los individuos que integran el rodeo y seleccionar un grupo de ellos en función de la aptitud coagulativa de la leche para destinarla a la fabricación de quesos.

### **2.2 Producción mundial de leche**

Desde hace aproximadamente 10 años, la producción mundial de leche ha estado en constante crecimiento y evolución, esperándose un incremento del 2% anual para el período 2010-2020. Sin embargo, en el año 2016 la producción de los cinco principales exportadores de lácteos (Argentina, Australia, Unión Europea (UE), Nueva Zelanda y Estados Unidos) disminuyó y los precios aumentaron en los mercados (INALE, 2016). Tanto los márgenes agrícolas negativos como las condiciones difíciles llevaron a una caída de la producción láctea mundial más rápida de lo esperado. Como afirma Kevin Bellamy en Rabobank Global Dairy Strategist (2016), "Los excedentes de exportación se reducirían año a año en más de 3,4 millones de toneladas, más que en cualquier momento desde la crisis financiera mundial, y habría una nueva reducción de 2,5 millones de toneladas en el 2016".

### **2.3 Producción de leche en Uruguay**

La producción comercial uruguaya se sitúa en 2182 millones de litros

aproximadamente. Estos provienen de 3919 establecimientos lecheros, con un total de 783 mil animales. Cerca del 90% de esta producción, se remite a la industria, siendo las más importantes CONAPROLE, INDULACSA y CALCAR (DIEA, 2016). Con respecto a la calidad de la leche, el 82% de la remisión cumple con el estándar internacional de menos de 400.000 células somáticas (CS) por mL (INALE, 2016).

Nuestro país contribuye con el 0.3% de la producción mundial. Sus principales mercados son Brasil (27%), México (17%), Venezuela (11%), Cuba (6%) y Corea del Sur (5%). Los productos de exportación de mayor importancia son leche en polvo, queso y manteca. A su vez, nuestro país tiene uno de los costos de producción más bajos del mundo (0.20 U\$S/l) y un elevado consumo de leche por persona (228litros/hab/año), el mayor de Latinoamérica (FIL/IDF, 2010).

En el año 2015, el sector lechero atravesó una de las peores crisis de su historia. La caída internacional de los precios y un extenso período de sequía determinaron altos costos productivos, liquidez en el sector y el descenso del precio pagado por litro de leche al productor (INALE, 2016).

#### ***2.4 Historia de la quesería en Uruguay***

Los primeros elaboradores de quesos en forma organizada en nuestro país fueron los inmigrantes europeos, principalmente aquellos de origen suizo. Si bien existía una producción de queso nacional a pequeña escala, se introdujeron nuevas técnicas de elaboración, que adaptaron al tipo de leche y las pasturas autóctonas. Las primeras queserías artesanales atendían el mercado interno e incluso exportaban sus excedentes a Buenos Aires. Al pasar los años, se empezaron a elaborar quesos en la zona que hoy conocemos como Nueva Helvecia. Estos quesos se conocían en Montevideo como quesos “de la Colonia”, refiriéndose a Colonia Suiza (Borbonet, 2001).

#### ***2.5 Consumo interno de queso***

El 54% de las familias uruguayas consumen principalmente quesos de tipo Sbrinz, Colonia y Danbo. Los departamentos con mayor producción son Colonia, San José y Montevideo y el 50% del mismo es artesanal. En los departamentos del interior de nuestro país que no tienen tradición en la elaboración de quesos, el consumo es un 15% inferior que en los departamentos nombrados. Se estima que el consumo en el país es de 20 Kg por hogar y por año y 6,5 Kg por persona y por año (FONADEP, 2008).

#### ***2.6 Quesería y calidad de leche***

La calidad quesera de la leche se puede definir como la aptitud para dar un buen queso, con un rendimiento satisfactorio, en condiciones de trabajo normales. Esta depende de diversos factores: la composición química, en particular del contenido de caseínas, la calidad bacteriológica, la aptitud para el desarrollo de bacterias lácticas y el comportamiento frente al cuajo utilizado (Leonoir y Schneid, 1987).

En lo referente a la composición y la calidad de la leche de tanque uruguaya, estudios realizados por el laboratorio COLAVECO, permitieron determinar que las variables antes mencionadas satisfacen los niveles exigidos para calificarla como leche tipo A descritos en el Decreto 57/99 y que se acercan a los parámetros más exigentes establecidos por FONTERRA (Tabla I).

**Tabla I. Datos procesados de muestras recibidas en COLAVECO en el periodo diciembre – febrero 2017.**

	<b>Recuento bacteriano</b>	<b>Recuento celular*</b>	<b>Grasa*</b>	<b>Proteína*</b>	<b>Lactosa</b>	<b>Sólidos totales*</b>	<b>Crioscopia*</b>	<b>Urea</b>
	X 1000 eq UFC/ml	X 1000cel/ml	%peso/vol	%peso/vol	%peso/vol	%peso/vol	(°C)	Mg/dl
	52.48	504.26	3.90	3.27	4.27	12.56	-0.520	18.63
Muestras	3490	4276	4276	4276	4276	4145	4276	3023

(\*) Ensayos acreditados ISO 17025 por O.U.A.

En la elaboración de queso normalmente se distinguen tres etapas fundamentales: la coagulación de la leche, la pesca, el desuerado y en el caso del queso colonia el afinado o maduración. Durante la coagulación de la leche, se forma un gel y se desarrolla un coágulo de consistencia semisólida. El desuerado sirve para regular la cantidad de agua que exige el tipo de queso deseado. Durante la maduración coexisten procesos enzimáticos de lipólisis, y proteólisis que confieren al queso aspecto, sabor y textura característicos resultado de los fenómenos físico-químicos, microbiológicos y reológicos de los constituyentes de la cuajada (Lenoir et al., 1985) (Figura I).

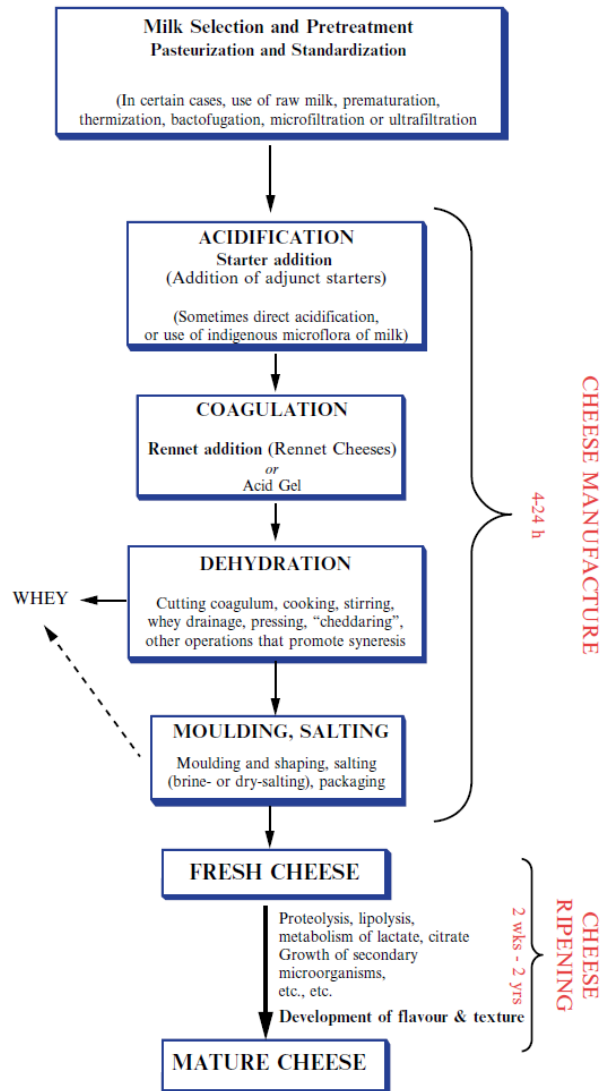


Figura I. Diagrama de flujo esquemático que muestra las etapas principales en la fabricación de un queso (McSweeney et al., 2004).

## 2.7 Coagulación de la leche en quesos

El proceso de coagulación de la leche es una etapa indispensable en la elaboración de cualquier tipo de queso. Las siguientes etapas de la elaboración están condicionadas por el tipo y por las condiciones de la misma. La coagulación afectará considerablemente el rendimiento y la calidad del producto (Van Hooydonk y Walstra, 1987) (Figura II).

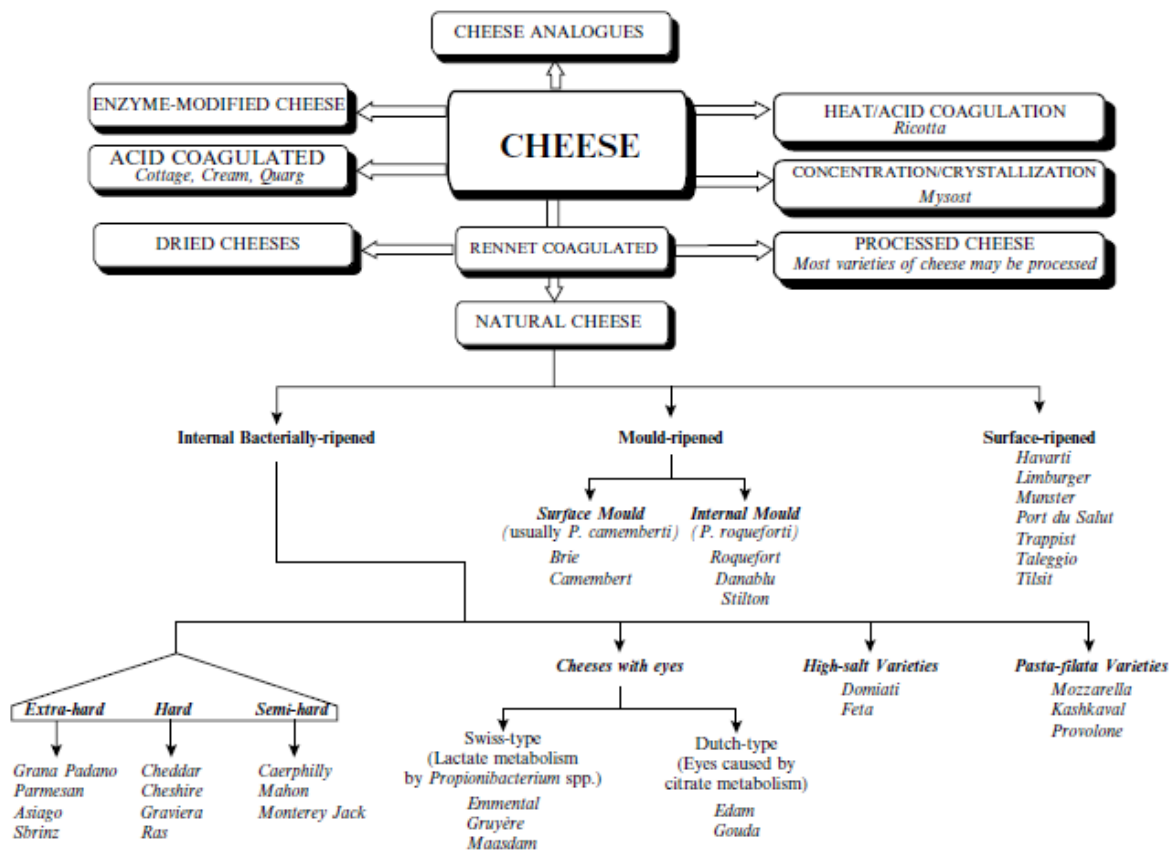


Figura II. Clasificación de los quesos y productos afines basados principalmente en el método de coagulación de la leche (McSweeney et al., 2004).

Desde el punto de vista tecnológico y del agente empleado para inducir la coagulación, ésta puede clasificarse en ácida, enzimática o mixta (Tabla II).

Tabla II. Tipos de coagulación: enzimática, ácida, mixta.

TIPOS DE COAGULACIÓN	Modificaciones físico-químicas	Características de la cuajada
<b>ENZIMÁTICA</b>	La quimosina hidroliza la k-caseína y desestabiliza la fase coloidal.	Elástica (mayor sinéresis), impermeable y regular.
<b>ÁCIDA</b>	Insolubilización de la k-caseína que precipita a pH semejante a su punto isoelectrico.	Friable (poca sinéresis) e irregular.
<b>MIXTA</b>	Es el resultado de la acción de la acidificación láctica y de la enzima coagulante. La relación entre la acidez y la cantidad de cuajo dará al coagulo características típicas, y así se podrán obtener coágulos mixtos muy ácidos o muy enzimáticos.	Cuajadas muy ácidas: friables Cuajadas muy enzimáticas: más firmes

Durante la coagulación enzimática, por acción de la quimosina, ocurre la formación de un gel debido a los cambios fisicoquímicos que tienen lugar en las micelas de caseína, en combinación con un proceso de agregación (fase no enzimática). El gel se forma cuando las partículas normalmente dispersas se agregan lo suficiente como para formar una red continua a través del líquido que las dispersa (Solorza y Bell, 1998). La caseína normalmente se encuentra formando micelas estables (Han y Spradlin, 2001). Para inducir la gelación, la estabilidad coloidal debe ser reducida y permitir la agregación y floculación donde entonces la caseína y la grasa se concentran unas diez veces debido a la deshidratación (Corredig, 2009; Lucey y Fox, 1993). Luego ocurre la separación de fases, presentándose por un lado el coágulo (caseína y grasa) y por otro el suero (agua, lactosa y proteínas séricas) (Han y Spradlin, 2001).

La renina o quimosina es una enzima secretada por el abomaso de terneros de 2 a 3 semanas de edad, que han recibido una alimentación exclusivamente láctea (Veisseyre, 1988). Su función es coagular la leche, iniciando así la digestión de la misma, para proveer a los animales jóvenes de los nutrientes contenidos en ella. Es una enzima de la familia de las proteasas, conocida como aspartil endopeptidasa (Figura III) (Han y Spradlin, 2001).

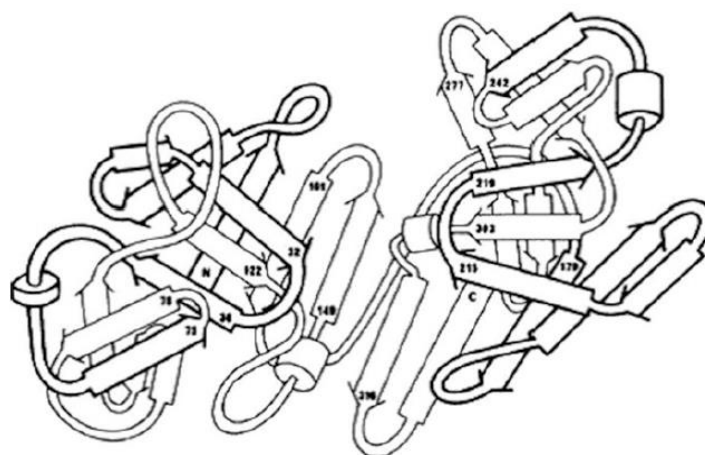


Figura III. Representación esquemática de la estructura terciaria de aspartil endopeptidasa, mostrando la hendidura que contiene el sitio activo; las flechas indican estructuras beta y los cilindros las hélices alfa (Foltmann, 1987).

En la fase enzimática o primaria de la coagulación, la quimosina hidroliza la unión fenilalanina 105-metionina 106 de la caseína  $\kappa$  (Figura IV). Esta hidrólisis genera la formación de dos polipéptidos; la parte N-terminal, básica e hidrófoba, llamada paracaseína  $\kappa$  (segmento 1-105) que queda integrada a la micela y la parte C-terminal, o caseinmacropéptido (segmento 106-169) de carácter hidrófilo y ácido, que es liberada en el lactosuero (Mercier et al., 1973; Mercier y Chobert, 1976). Para la coagulación enzimática la temperatura óptima se halla entre 35 y 45 °C.





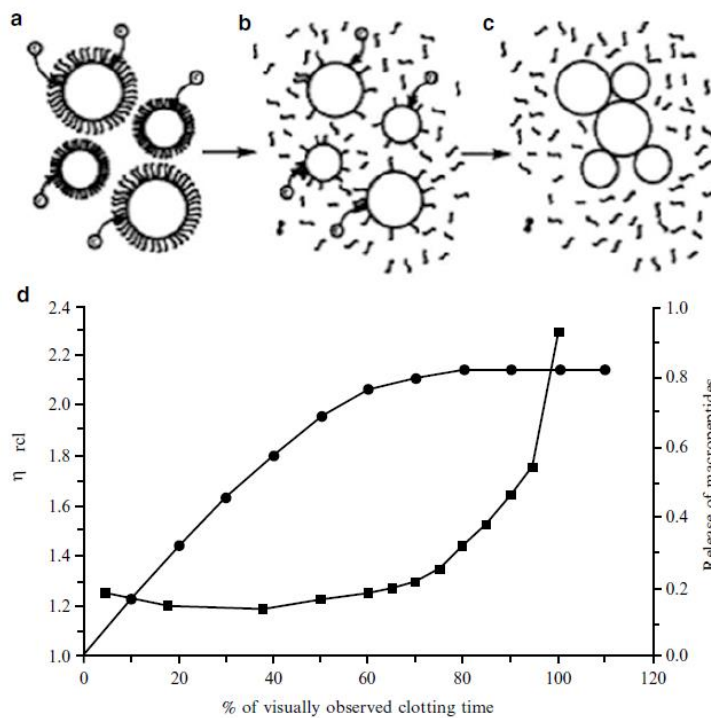


Figura V. Representación esquemática de la coagulación de la leche. (a) Micelas de caseína con capa de k-caseína intacta atacada por quimosina (C); (b) micelas parcialmente desnudadas de k-caseína; (c) micelas extensamente desnudadas en el proceso de agregación; (d) liberación de macro péptidos (círculos rellenos) y cambios en la viscosidad relativa (cuadrados rellenos) durante el curso de la coagulación del cuajo (McSweeney et al., 2004).

En la primera fase, la de formación del caseinomacropéptido y la para-k-caseína, el proceso no es sensible a la temperatura. En la segunda fase, es extremadamente sensible a la temperatura y la acción de iones  $Ca^{2+}$  (Veisseyre, 1988).

Otro factor que incide en la coagulación es el pH. La renina se inactiva en medio alcalino, mientras que a pH inferior a 7, la gelificación se acelera gradualmente hasta alcanzar su pH óptimo (5.5). Esto, sumado a la reducción de cargas eléctricas en las micelas de caseína, altera su estabilidad. A pH de 6.3, la fase enzimática como la reducción de cargas se desarrolla al mismo tiempo. Cuando el pH es inferior a 6.3, la coagulación se acelera y finaliza antes de que la fase enzimática haya concluido (Eck, 1990).

Por otro lado, los iones  $Ca^{2+}$  son necesarios para la existencia de micelas de caseína, favorecen el endurecimiento de la cuajada, contribuyen al proceso de desuerado y facilitan la retención de grasa en la cuajada. Las micelas de caseína son muy sensibles a los iones  $Ca^{2+}$  cuando han sido sometidas a la acción coagulante de la renina, ya que los residuos de fosfoserina expuestos durante la hidrólisis fijan iones  $Ca^{2+}$ , estableciendo puentes de calcio entre las moléculas de para-k-caseína (Eck, 1990). Por esta razón las leches con bajo contenido en iones  $Ca^{2+}$  reaccionan lentamente frente al cuajo, o en los casos en que la leche es previamente tratada con un reactivo que secuestre al calcio como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), no coagulará. Por último, el fosfato cálcico coloidal

sensibiliza la para- $\kappa$ -caseína y ésta a su vez a los iones  $\text{Ca}^{2+}$ . En presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  el tiempo de coagulación disminuye, e incrementa la fuerza del gel a medida que el contenido de fosfato cálcico coloidal aumenta (Eck, 1990). Además, tiene un efecto buffer durante la acidificación del queso y la leche (Lucey y Fox, 1993) (Figura VI).

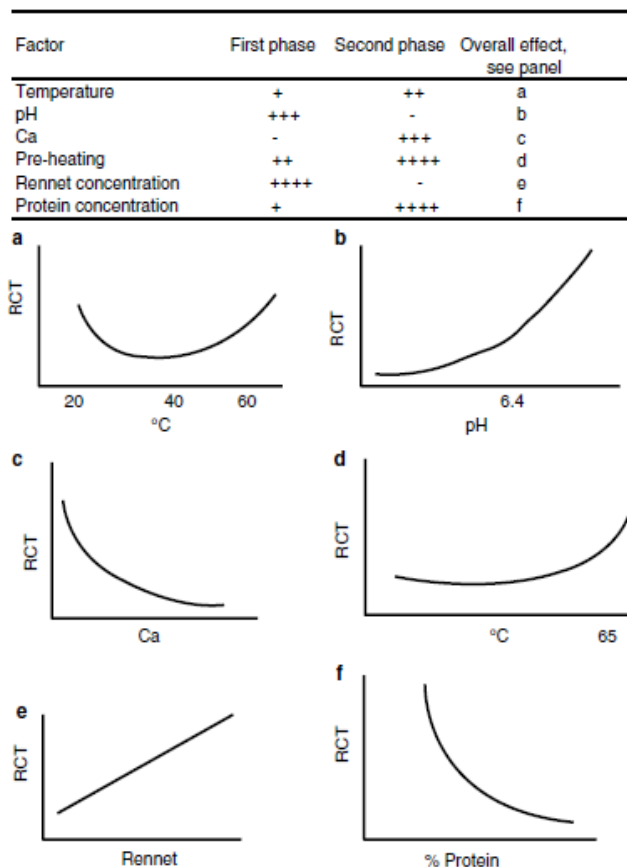


Figura VI. Factores principales que afectan al tiempo de coagulación del cuajo (ECA) de la leche (McSweeney et al., 2004).

## 2.8 Optigraph y otros métodos para la determinación de la coagulación

El método más común para determinar la coagulación de la leche es la observación visual, donde observamos la formación de un coágulo o la fractura repentina de una película de leche en la pared de una botella o tubo de ensayo. Sin embargo, para el estudio de la coagulación de la leche también existen diversos métodos que se basan en las propiedades reológicas de la leche. Se distinguen distintos instrumentos para su estudio, entre los que se encuentran el gelógrafo, el fromógrafo, el penetrómetro, el viscosímetro, el reómetro, el texturómetro y el vatímer. En la mayoría de los métodos, se somete a la cuajada a fuerzas que llevan a su ruptura o deformación, sin embargo, estos no resultan prácticos para su uso en la línea de producción. Por ello, se han diseñado otro tipo de equipos basados en la medida de conductividad térmica, eléctrica y de ultrasonidos. A posteriori surgió la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) a la línea de elaboración, sin causar daño a la cuajada (Van Hooydonk y Van den Berg, 1988).

El Formagraph es un instrumento diseñado para registrar las PCL. La técnica

mediante la cual el Formagraph determina la coagulación se basa en el movimiento de pequeños péndulos de lazo de acero inoxidable sumergidos en muestras que oscilan linealmente en la leche coagulante. Durante este proceso se aplican fuerzas mínimas a los péndulos como consecuencia de la formación de un gel en la muestra de leche. Un flash de luz en cada extremo de la oscilación de la muestra registra la posición del péndulo en el papel fotográfico auto-desarrollado. El resultado es un diagrama de firmeza versus tiempo (McMahon y Brown 1982).

El Optigraph es un sistema (hardware y software) que permite caracterizar la capacidad de la leche para coagular mediante la medición óptica en la región infrarrojo. Este puede calcular en tiempo real todos los parámetros necesarios para el proceso de fabricación del queso, siendo estos: tiempo de la coagulación, firmeza de la cuajada y velocidad de agregación. Es posible acceder a estos datos a través de puntos característicos (o descriptores), extraídos de la información óptica adquirida en tiempo real durante la prueba. Las mediciones realizadas no se basan en un método reológico, sino en una señal óptica emitida por el NIR. Para obtener los diferentes valores se mide la atenuación de esta señal, después de su paso a través de la muestra de leche colocada en cada una de las cubetas. Durante una prueba de coagulación, la cantidad de luz emitida que va atravesando la leche se va reduciendo, debido a los cambios en la estructura micelar de la caseína. Esta atenuación, que es registrada por medio de un detector óptico, está influenciada por numerosos factores: el volumen de cuajo utilizado, el contenido de proteínas en la muestra de leche, y el pH de la misma, entre otros. Antes de cada análisis, la intensidad de la luz emitida para la prueba se ajusta automáticamente, para tener una recepción constante de 1 voltio (este valor se puede modificar si la leche es muy opaca). Este ajuste automático de las condiciones de la medida es una garantía para obtener resultados fidedignos (AMS, 2008).

La medición de las PCL es de especial relevancia para la fabricación de queso. Los instrumentos más utilizados para evaluar dichas propiedades son Formagraph y Optigraph, por el cual el tiempo de coagulación (RCT), tiempo de cuajada-reafirmante (k20), y firmeza de la cuajada (a20 y a30) se miden después de la adición de la enzima de coagulación de la leche cruda (Annibaldi et al., 1977; Zannoni y Annibaldi, 1981; McMahon y Brown, 1982). Durante el proceso de coagulación, registran los cambios físico-químicos que ocurren en la leche cuando la enzima agregada hidroliza  $\kappa$  caseína induce cambios en la viscosidad y la elasticidad de la leche (Auldish et al., 2001; O'Callaghan et al., 2002).

Recientemente, se han adoptado dos categorías de instrumentos ópticos infrarrojos para predecir PCL a nivel de laboratorio. La primera incluye los espectrómetros de infrarrojo medio (MIRS) para predecir PCL a partir de muestras de leche cruda analizados sin inducción de la coagulación del cuajo (Dal Zotto et al., 2008; De Marchi et al., 2009). La segunda incluye el Optigraph que ha sido propuesto para determinar PCL a través de la inducción de la coagulación del cuajo de la leche (Panari et al., 2002; Kübarsepp et al., 2005).

## 2.9 Capacidad coagulativa de la leche

El proceso de coagulación de la leche a través de la adición de la enzima para la fabricación del queso es un proceso que ocurre en tres pasos superpuestos que se pueden describir con un diagrama producido por un medidor de coagulación de la leche como el Optigraph (Figura VII). El  $K_{20}$ , representa el tiempo necesario, desde la adición de la enzima hasta que la cuajada es suficientemente firme para ser cortada, donde la anchura del diagrama es 20 mm;  $a_{30}$  es el parámetro que describe la firmeza de la cuajada 30 minutos después de agregada la enzima de coagulación. Estas PCL se miden por 30 minutos o más ya que, en la práctica para la elaboración de la mayoría de los quesos a nivel mundial, la cuajada se corta alrededor de 30 minutos después de la adición de la enzima de coagulación a la leche (Ikonen, 2000).

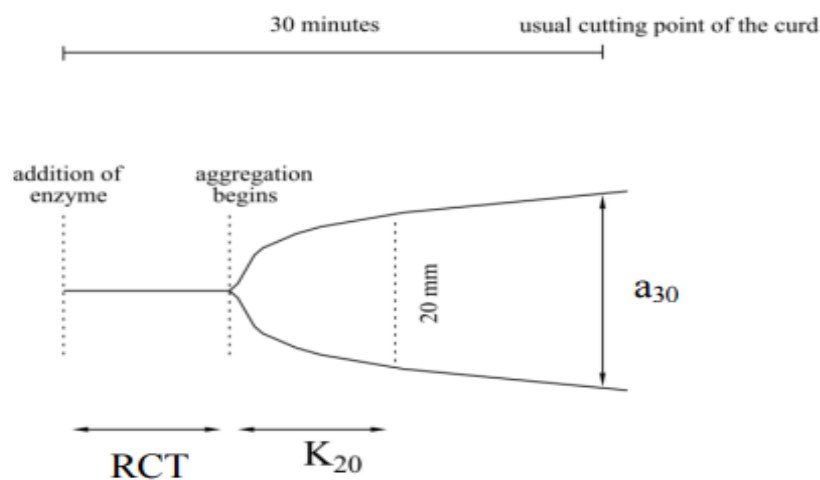


Figura VII. Diagrama producido por un medidor de coagulación de la leche, y los rasgos de propiedad de coagulación de leche calculados a partir del diagrama: RCT, tiempo de coagulación del cuajo;  $K_{20}$ , el tiempo de cuajada-reafirmante;  $a_{30}$ , firmeza de cuajada 30 minutos después de la adición de la enzima de coagulación (Ikonen, 2000).

El tiempo de coagulación es importante ya que determina la composición de la cuajada: la leche que coagula rápidamente es capaz de atrapar más caseína y grasa en el coágulo antes de que se corte, en comparación con leches de coagulación lenta. La caseína y la grasa constituyen alrededor del 90% de los sólidos en el queso, por lo que la cantidad de caseína y grasa perdida en el suero de queso tiene un efecto sustancial en la eficiencia de la fabricación del queso (Johnson, 1988, Politis y Ng-Kwai-Hang 1988a, 1988b; Lawrence et al, 1993).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 *Objetivo general***

El objetivo principal de este estudio fue establecer un ranking de la aptitud quesera seleccionando los individuos mas aptos para producir quesos en un rodeo comercial en base a las PCL de la misma utilizando como instrumento de medida el Optigraph.

#### **3.2 *Objetivos específicos***

- Desarrollar y poner a punto la técnica de Optigraph para evaluar las PCL con fines queseros.
- Relacionar la composición físico-química, la calidad sanitaria de las muestras de leche y su influencia en las PCL.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Materiales**

#### **4.1.1 Establecimiento y animales**

Se trabajó con un rodeo de 100 vacas de raza Holstein pertenecientes al establecimiento "La Cumbre" ubicado en la Ruta 1, km 114,500 de la ciudad de Nueva Helvecia, departamento de Colonia, Uruguay, perteneciente al Sr. Enrique Celio. Para este estudio se seleccionaron 60 animales los cuales presentaron siete muestreos en el período comprendido entre diciembre 2015 y marzo 2016.

#### **4.1.2 Toma de muestras**

El muestreo se realizó de acuerdo a la metodología descrita por la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF 50C:1995). Se estandarizó el proceso de muestreo mediante el uso de lactómetros, de manera de que fuera representativo de todo el ordeño (Trutest®). Se obtuvieron muestras de leche de estos animales en el primer ordeño de la mañana (04:00 hs) en frascos de propileno de 50cc, limpios y secos, conteniendo conservante Bronopol. Las muestras fueron enviadas al laboratorio (COLAVECO) en menos de tres horas para ser analizadas, refrigeradas y correctamente acondicionadas en contenedores de material isotérmico.

### **4.2 Método**

#### **4.2.1 Análisis de RCS, composición y pH**

El ensayo analítico de la leche se realizó una vez llegadas las muestras al laboratorio COLAVECO. El nivel de células somáticas se midió por citometría de flujo con contador fluoro-óptico electrónico, modelo Somascope MK2 de Delta Instruments, registrado con norma ISO 13366-2 / IDF 148-2:2006. La muestra se mezcló con un colorante (DAPI) con la finalidad de dispersar glóbulos de grasa y al mismo tiempo teñir núcleos de células somáticas. Se inyectó una alícuota en un fluido portador de flujo laminar. Las células teñidas se separaron por el flujo y se expusieron al haz luminoso de un diodo emisor de luz (LED) emitiendo una luz de fluorescencia amarilla dirigida hacia dos receptores. Los impulsos cuyas intensidades superaron un umbral fijo (en mV) y que fueron recibidos por ambos detectores, se contaron y se transformaron en términos de concentración celular utilizando una ecuación de calibración (Delta Instruments, 2017). La proteína total, la caseína, la grasa, los sólidos totales y el pH se midieron por espectrofotometría con transformación de Fourier; según la norma IDF 141 C: 2000 con un equipo Lactoscope de Delta Instruments. Este instrumento posee un espectrómetro ABB-bomen, un calentador de muestras y una bomba; y permite analizar productos con grasa o derivados de la crema con límites de hasta un 20 %, Proteína 0-10 %, Lactosa de 0-15 % y Crema 0- 55% (Delta Instruments, 2015).

#### **4.2.2 Coagulación de la leche**

Para la coagulación de la leche, se utilizó cuajo modificado genéticamente "Maxiren 600" 100% Quimosina ( $\geq 600$  IMCU / ml), y la dilución empleada fue 20  $\mu$ l a 500  $\mu$ l con agua destilada.

### **4.2.3 Optigraph**

Los ensayos se efectuaron en el equipo Optigraph, donde se midieron tres parámetros: R, a20 y a30 los cuales nos permiten evaluar la coagulación.

### **4.2.4 Preparación de la muestra para el Optigraph**

1. Se pre-calentaron las muestras de leche en un baño de agua a 40°C durante 10 minutos.
2. Se llenaron las cubetas con 10 ml de muestras de leche.
3. Se colocó el rack de 10 cubetas. Se seleccionó la temperatura de proceso, 35° C basado en el procedimiento de validación efectuado previamente (Anexo 1). Se seleccionó el tiempo de duración del proceso, 30 minutos.
4. Se seleccionaron las cubetas que se utilizaron en la prueba, que tenían un borde amarillo.
5. Cuando las cubetas seleccionadas alcanzaron la estabilidad sus ventanas, que se muestran en la pantalla principal, se volvieron verdes. Luego de esto se agregó 0,20 ul de cuajo Maxiren 600® al 12% (ver anexo 1) en las cubetas (AMS, 2008).

### **4.3 Análisis estadísticos**

Se realizaron análisis estadísticos para evaluar las propiedades significativas en la coagulación.

Las variables de composición, crioscopia, densidad, pH y RCS fueron analizadas siguiendo el procedimiento descriptivo univariante para describir el promedio de las variables estudiadas en la población y así obtener una descripción del rodeo.

El coeficiente de correlación de Pearson fue obtenido mediante el procedimiento CORR utilizado para determinar la asociación entre variables. Se consideró una correlación significativa entre las variables cuando el valor de  $p < 0,05$ .

Los Componentes Principales (CP) fueron determinados por el procedimiento factor datos estandarizados con rotación varimax para reducir la dimensión de la información y describir inter-relaciones entre variables cuantitativas.

Debido a que los animales varían en la cantidad de días que se encuentran en lactación y estos a su vez influyen de forma diferente en cada animal, fue necesario realizar un análisis de dos factores en parcelas al azar con co-varianza (ANCOVA) y procedimiento mixed BLUP para poder extraer cualquiera de las diferencias generadas por este efecto.



El modelo básico probado fue

$$\begin{aligned}
 Y_{ijk} = & \mu + \tau_i + \beta_1 (x_{1i} - x_1) + \beta_{11} (x_{11i} - x_{11}) + \\
 & + \beta_2 (x_{2i} - x_2) + \beta_3 (x_{3i} - x_3) + \beta_4 (x_{4i} - x_4) + \\
 & + \beta_5 (x_{5i} - x_5) + \beta_6 (x_{6i} - x_6) + \beta_7 (x_{7i} - x_7) + \xi_{ijk}
 \end{aligned}$$

donde  $Y_{ijk}$  es tiempo de inicio de la coagulación y firmeza de la cuajada;  $\mu$  es el efecto constante común a todos los niveles;  $\tau$  es el efecto estimado del tratamiento (vacas considerado aleatorio);  $\beta_1$  y  $\beta_{11}$  son los coeficientes de regresión de  $x$ ;  $X_1$  días de lactación;  $X_{11}$  días de lactación al cuadrado respectivamente;  $\beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5, \beta_6,$  y  $\beta_7$  son los coeficientes para  $X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7$  (representando a CP1, CP2, CP3, CP4, CP5, Y CP6) y  $\xi_{ijk}$  es el error de estimación del modelo ajustado.

Se analizaron las 11 variables que, en el estudio de R, a20, a30 se usarían como co-variables: células somáticas, grasa, proteína, proteína verdadera, caseína, lactosa, sólidos totales, crioscopia, urea, densidad y pH. Los datos se analizaron con el Software SAS (SAS Institute, versión 9.1, Cary, NC, USA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Composición (%), pH, crioscopia y RCS (cel/ml)

Los datos reportados en la tabla III muestran que la leche obtenida de los animales fue de buena calidad en cuanto al porcentaje de sólidos que presenta, MG (%) 4.01 y PT (%) 3.35, siendo los valores establecidos de MG (%) 3.6-3.8 y PT (%) 3.3; los cuales se ven reflejados en el pago al productor. Los resultados dejan en manifiesto la buena calidad sanitaria de la leche, ya que se observó un valor promedio de CS 35.000 cel/ml siendo el límite máximo establecido por la última actualización del decreto 400.000 cel/ml.

Tabla III. Composición (%), pH y crioscopia de las muestras de leche utilizadas para el análisis de propiedades de coagulación de la leche

PARAMETROS DE COMPOSICION Y CRIOSCOPIA	ESTADISTICA BASICA DESCRIPTIVA				
	N	MEDIA	DS	MIN	MAX
LOG Recuento Células Somáticas	394	4.54	1.2157	2.64	8.08
Materia Grasa	394	4.01	0.8202	1.66	6.66
Proteína	394	3.35	0.3720	2.60	4.80
Proteína Verdadera	394	3.13	0.3757	2.41	4.40
Caseína	394	2.59	0.3564	1.86	3.90
Lactosa	394	4.80	0.2488	3.89	5.90
Sólidos Totales	394	12.84	1.0912	10.10	16.44
Crioscopia	394	524	7.43	501	550
Urea	394	42.37	11.2689	12.00	83.00
Densidad	394	1.28	0.0120	1.23	1.32
pH	394	6.49	0.0684	6.24	6.65

LOG Recuento Células Somáticas: Recuento Células somáticas (log10), N: Número total de muestras, DS: Desvío estándar, MIN: Mínimo, MAX: Máximo.

### 5.2 Estadística descriptiva para los parámetros de coagulación R, a20, a30

Los valores para las variables en estudio fueron los esperados teniendo en cuenta la composición físico-química de la leche y la concentración de cuajo.

Tabla IV. Estimación de parámetros de propiedades coagulativas de la leche

PARAMETRO	N	MEDIA	DS	MIN	MAX
R (seg)	394	649	86.69	497	900
a20 (V)	394	10.54	6.2143	0.47	49.12
a30 (V)	394	10.77	7.0053	0.19	54.90

R: tiempo de inicio de coagulación en segundos; a20 y a30: firmeza de la cuajada en voltios a los 20 y 30 minutos de inicio de coagulación, N: Número total de muestras, DS: Desvío estándar, MIN: Mínimo, MAX: Máximo. Existe correlación cuando el valor de  $p < 0,05$ .

### 5.3 Correlaciones entre propiedades de coagulación, composición y crioscopia

En cuanto a la fracción proteica se estableció una correlación negativa entre R y PT, PV y CN. Por otro lado, se observó una correlación positiva y significativa entre los componentes de la fracción proteica y a20, a30 (Tabla V).

**Tabla V. Correlación y probabilidad entre las variables de coagulabilidad y la fracción proteica de la leche**

PARAMETRO	PROTEINA TOTAL	Prob >  r	PROTEINA VERDADERA	Prob >  r	CASEINA	Prob >  r
R	-0,13	0,01	-0,12	0,02	-0,10	0,05
a20	0,36	<.0001	0,39	<.0001	0,33	<.0001
a30	0,28	<.0001	0,32	<.0001	0,25	<.0001

R: tiempo de inicio de coagulación; a20 y a30: firmeza de la cuajada a los 20 y 30 minutos de inicio de coagulación. Existe correlación cuando el valor de  $p < 0,05$

Se observó que la MG y crioscopia presentan una correlación positiva y significativa con los parámetros a20 y a30. Las variables crioscopia y pH presentan una correlación negativa y significativa con R (Tabla VI).

**Tabla VI. Correlación y probabilidad entre las variables de coagulabilidad y materia grasa (%), pH y crioscopia**

PARAMETRO	MATERIA GRASA	Prob >  r	pH	Prob >  r	CRISCOPIA	Prob >  r
R	-0,06	0,25	0,20	<.0001	-0,10	0,05
a20	0,26	<.0001	-0,01	0,88	0,32	<.0001
a30	0,22	<.0001	0,02	0,72	0,26	<.0001

R: tiempo de inicio de coagulación; a20 y a30: firmeza de la cuajada a los 20 y 30 minutos de inicio de coagulación. Existe correlación cuando el valor de  $p < 0,05$ .

### 5.4 Determinación de componentes principales

Se retuvieron seis componentes principales con el criterio NFACTOR, con el objetivo de reducir la dimensión de la información y describir interrelaciones entre las variables, donde la proporción acumulada es 91.19%, no teniendo valor estadístico la utilización de los demás componentes (Tabla VII).

**Tabla VII. Valores propios y proporción de componentes principales**

CP	Valor Propio	Diferencia	Proporción	Proporción Acumulada
1	4.35237858	2.46524090	0.3957	<b>0.3957</b>
2	1.88713768	0.63221073	0.1716	<b>0.5672</b>
3	1.25492695	0.19272825	0.1141	<b>0.6813</b>
4	1.06219870	0.25779550	0.0966	<b>0.7779</b>
5	0.80440321	0.13413810	0.0731	<b>0.8510</b>

**Tabla VII. Valores propios y proporción de componentes principales (continuación)**

CP	Valor Propio	Diferencia	Proporción	Proporción Acumulada
6	0.67026511	0.25760508	0.0609	<b>0.9119</b>
7	0.41266003	0.21502975	0.0375	0.9495
8	0.19763027	0.02519836	0.0180	0.9674
9	0.17243191	0.00609594	0.0157	0.9831
10	0.16633597	0.14670437	0.0151	0.9982
11	0.01963160		0.0018	1.0000

CP: Numero de componente principal

El primer componente es la mezcla de variables originales que resume mejor la información, en este caso tiene alta correlación con la PT, PV, CN, ST y MG. El componente principal 2 tiene alta correlación con la densidad y la lactosa; el 3 con la crioscopia, el 4 con CS (cel/ml); el 5 con la Urea y el último CP (CP6) con el pH (Tabla VIII).

**Tabla VIII. Correlaciones con variables originales**

Parámetros de composición y crioscopia	Componentes principales					
	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6
<b>Proteína</b>	<b>0.94<sup>a</sup></b>	0.01	0.03	0.04	0.03	0.01
<b>Proteína Verdadera</b>	<b>0.92<sup>a</sup></b>	0.02	0.09	0.04	0.08	0.01
<b>Caseína</b>	<b>0.91<sup>a</sup></b>	0.04	0.10	0.05	0.09	0.01
<b>Sólidos Totales</b>	<b>0.85<sup>a</sup></b>	-0.17	0.43	-0.08	0.00	0.04
<b>Materia Grasa</b>	<b>0.68<sup>a</sup></b>	-0.45	0.48	-0.09	-0.04	0.04
<b>Densidad</b>	0.02	<b>0.95<sup>a</sup></b>	-0.13	-0.05	0.08	0.00
<b>Lactosa</b>	-0.08	<b>0.77<sup>a</sup></b>	0.42	-0.22	-0.08	0.05
<b>Crioscopia</b>	0.31	0.09	<b>0.85<sup>a</sup></b>	-0.01	-0.04	-0.10
<b>LOG Recuento Células Somáticas</b>	0.03	-0.16	-0.04	<b>0.97<sup>a</sup></b>	-0.03	0.08
<b>Urea</b>	0.11	0.02	-0.04	-0.02	<b>0.99<sup>a</sup></b>	-0.01
<b>pH</b>	0.05	0.03	-0.06	0.08	-0.01	<b>0.99<sup>a</sup></b>

LOG Recuento Células Somáticas: Recuento Células somáticas (log10); CP: Número de componente principal; a: Alta correlación.

### **5.5 Modelo mixto para R, a20 y a30.**

Los resultados obtenidos muestran que los días de lactación (periodo comprendido entre 90-360 días) afectaron el tiempo de coagulación al igual que la PT, PV, CN, ST y MG en forma negativa, y estos últimos con alta correlación con el CP1 (Tabla IX).

Tabla IX. Relación entre R, días en lactación y componentes principales

Efecto	Estimación parámetro	Error	Grados de libertad	Valor de t	Pr >  t
Intercepto	599.29	24.7015	59	24.26	<.0001
Días lactación	0.5183	0.2269	326	2.28	<b>0.0230</b>
DL2	-0.0011	0.00055	326	-2.01	<b>0.0457</b>
CP1	-11.3655	5.1243	326	-2.22	<b>0.0272</b>
CP2	-1.6962	4.5835	326	-0.37	0.7116
CP3	1.2882	3.8888	326	0.33	0.7407
CP4	2.6338	5.8712	326	0.45	0.6540
CP5	-0.9176	3.5973	326	-0.26	0.7988
CP6	6.2494	3.7200	326	1.68	0.0936

DL2: Días de lactación (2); CP: Numero de componente principal; Existe correlación cuando el valor de  $p < 0,05$

La PT, PV, CN, ST, MG que están en alta correlación con CP1 y la crioscopia con el CP3, afectan la firmeza de la cuajada positivamente a los veinte minutos de iniciada la coagulación (Tabla X).

Tabla X. Relación entre a20, días en lactación y componentes principales

Efecto	Estimación parámetro	Error	Grados de libertad	Valor t	Pr >  t
Intercepto	10.8078	1.5995	59	6.76	<.0001
Días lactación	0.005414	0.01597	326	0.34	0.7349
DL2	-0.00003	0.000039	326	-0.75	0.4520
CP1	2.3836	0.3430	326	6.95	<b>&lt;.0001</b>
CP2	0.4885	0.3163	326	1.54	0.1234
CP3	1.0606	0.2869	326	3.70	<b>0.0003</b>
CP4	-0.3326	0.3634	326	-0.92	0.3607
CP5	-0.2015	0.2714	326	-0.74	0.4582
CP6	-0.02111	0.2784	326	-0.08	0.9396

DL2: Días de lactación (2); CP: Numero de componente principal; Existe corrección cuando el valor de  $p < 0,05$

La PT, PV, CN, ST, MG que están en alta correlación con CP1 y la crioscopia en con el CP3 afectan la firmeza de la cuajada positivamente a los treinta minutos de iniciada la coagulación (Tabla XI).

Tabla XI. Relación entre a30, días en lactación y componentes principales

Efecto	Estimación parámetro	Error	Grados de libertad	Valor de t	Pr >  t
Intercepto	11.0273	1.8905	59	5.83	<.0001
Días lactación	0.000666	0.01886	326	0.04	0.9719
DL2	-9.85E-6	0.000046	326	-0.21	0.8307
CP1	1.8135	0.4053	326	4.47	<b>&lt;.0001</b>
CP2	0.2463	0.3736	326	0.66	0.5102
CP3	1.0965	0.3385	326	3.24	<b>0.0013</b>
CP4	-0.5121	0.4299	326	-1.19	0.2345
CP5	0.1778	0.3201	326	0.56	0.5789
CP6	0.08316	0.3284	326	0.25	0.8003

DL2: Días de lactación (<sup>2</sup>); CP: Numero de componente principal; Existe correlación cuando el valor de p<0,05

### 5.6 Identificación de los individuos más aptos del rodeo lechero para la producción de queso teniendo en cuenta R, a20 y a30.

El individuo en la posición número uno en el ranking considerando su media BLUP tanto para R, a20 y a30, es el que mejor representa la variable en estudio (Tabla XII, XIII, XIV) el cual no presenta diferencia con su posición en el ordenamiento por el valor de su media original. Los demás animales pueden tener diferencias entre su posición en los ranking.

Tabla XII. Ranking de individuos según R

Número de Identificación	Media Original	BLUP	Ranking BLUP	Ranking MEDIA
108	544	506	1	1
1149	547	507	2	2
227	557	519	3	4
269	556	521	4	3
199	557	521	5	5
201	559	523	6	6
211	585	538	7	11
264	593	540	8	13
89	579	543	9	9
282	591	545	10	12

**Tabla XII. Ranking de individuos según R (continuación)**

<b>Número de Identificación</b>	<b>Media Original</b>	<b>BLUP</b>	<b>Ranking BLUP</b>	<b>Ranking MEDIA</b>
292	578	547	11	8
217	597	549	12	14
6700	610	553	13	19
220	584	557	14	10
6703	577	558	15	7
7552	611	558	16	21
126	601	558	17	15
268	608	558	18	18
159	602	559	19	16
221	612	560	20	22
265	615	569	21	23
266	621	570	22	24
234	604	572	23	17
262	611	574	24	20
107	634	579	25	26
7362	626	579	26	25
7231	668	583	27	37
295	644	585	28	29
236	643	595	29	28
249	646	597	30	30
291	656	599	31	33
287	670	601	32	38
275	662	604	33	35
267	651	605	34	31
6711	642	605	35	27

**Tabla XII. Ranking de individuos según R (continuación)**

<b>Número de Identificación</b>	<b>Media Original</b>	<b>BLUP</b>	<b>Ranking BLUP</b>	<b>Ranking MEDIA</b>
177	654	609	36	32
106	675	616	37	39
179	659	621	38	34
188	665	626	39	36
260	690	626	40	42
273	676	627	41	40
136	694	631	42	43
141	697	634	43	45
272	680	635	44	41
1143	710	644	45	48
261	694	644	46	44
158	721	654	47	51
284	731	654	48	54
184	720	655	49	49
245	707	655	50	47
215	720	656	51	50
239	706	657	52	46
280	743	663	53	56
185	724	665	54	52
296	737	670	55	55
170	724	672	56	53
110	766	689	57	57
212	780	690	58	58
186	782	707	59	59
235	804	719	60	60



**Tabla XIII. Ranking de individuos según a20**

<b>Número de Identificación</b>	<b>Media Original</b>	<b>BLUP</b>	<b>Ranking BLUP</b>	<b>Ranking MEDIA</b>
6703	21,6934286	17,5619	1	1
273	20,2168571	15,9106	2	2
199	16,4615714	14,6408	3	4
266	16,0871429	14,5298	4	6
292	18,9001429	14,2167	5	3
261	16,3198571	13,5770	6	5
291	15,7108571	13,3609	7	7
236	12,0186667	12,5372	8	17
170	13,9780000	12,3347	9	10
249	11,3345714	12,3284	10	22
239	11,5307143	12,2638	11	20
201	12,8461429	12,1623	12	15
275	14,0275714	12,1211	13	9
141	11,0440000	12,0958	14	26
108	10,6387143	12,0800	15	28
188	13,4600000	12,0656	16	11
296	13,3514286	11,9232	17	13
126	10,4061667	11,7382	18	30
295	11,1380000	11,3573	19	25
234	14,4368333	11,2249	20	8
107	8,5708571	11,0298	21	38
260	12,4140000	11,0113	22	16
211	11,5974286	10,9146	23	19
287	10,1145000	10,8969	24	33
1149	9,8005714	10,8676	25	34
184	11,2550000	10,8654	26	23
177	11,2462857	10,8502	27	24
159	10,4675714	10,8204	28	29
221	8,7603333	10,7424	29	36
284	8,6990000	10,7188	30	37

**Tabla XIII. Ranking de individuos según a20 (continuación)**

<b>Número de Identificación</b>	<b>Media Original</b>	<b>BLUP</b>	<b>Ranking BLUP</b>	<b>Ranking MEDIA</b>
245	13,3716667	10,5706	31	12
110	5,8005714	10,5101	32	54
264	8,0784286	10,3452	33	42
280	7,6431667	10,2127	34	45
158	7,6775714	10,1020	35	44
268	8,4834286	10,0869	36	39
7231	3,9395000	10,0590	37	59
7362	11,3441429	10,0512	38	21
89	6,7247143	10,0278	39	50
185	5,9300000	9,8819	40	53
269	10,3047143	9,7724	41	31
267	11,6481667	9,7438	42	18
227	5,9845000	9,5740	43	52
272	13,0340000	9,5145	44	14
262	9,7055714	9,3759	45	35
220	10,8710000	9,2349	46	27
136	6,0850000	9,2168	47	51
7552	6,7901429	9,1539	48	49
282	8,3327143	9,0595	49	40
186	5,7300000	9,0494	50	55
6711	7,4455714	9,0272	51	47
212	4,6992000	9,0100	52	57
1143	7,7603333	8,9408	53	43
217	6,9983333	8,8479	54	48
106	8,2500000	8,7499	55	41
215	5,5617143	8,3536	56	56
235	4,6570000	8,3522	57	58
6700	3,0392857	8,0832	58	60
179	10,2280000	7,4575	59	32
265	7,5248571	7,3537	60	46

**Tabla XIV. Ranking de individuos según a30**

<b>Número de Identificación</b>	<b>Media Original</b>	<b>BLUP</b>	<b>Ranking BLUP</b>	<b>Ranking MEDIA</b>
273	19,9349286	16,1321	1	1
6703	18,9614286	16,0111	2	3
266	17,3204286	15,4702	3	4
199	17,2380000	15,4539	4	5
292	19,5607143	15,3218	5	2
236	15,0285000	14,4078	6	12
108	15,0407143	14,3169	7	11
275	17,0935714	14,1451	8	6
261	16,6860000	13,8844	9	8
260	15,7771429	13,6438	10	10
295	13,7318571	13,5730	11	15
141	13,1955714	13,3692	12	18
184	14,0421429	13,0302	13	14
234	16,0608333	12,7834	14	9
296	13,2885710	12,6710	15	17
272	16,7928571	12,5987	16	7
126	12,3253333	12,5882	17	20
249	11,3951429	12,4892	18	24
170	13,3494286	12,0745	19	16
239	11,2252857	12,0197	20	25
245	14,6410000	11,9025	21	13
177	11,6672857	11,8357	22	22
1149	10,9854286	11,6902	23	27
158	9,2790000	11,2947	24	31
110	8,4200000	11,2876	25	38
7362	13,0532857	11,2384	26	19
201	11,2078571	11,1095	27	26
291	12,3185714	11,0501	28	21
211	11,5187143	11,0053	29	23
7231	6,0455000	10,6589	30	51

**Tabla XIV. Ranking de individuos según a30 (continuación)**

<b>Número de Identificación</b>	<b>Media Original</b>	<b>BLUP</b>	<b>Ranking BLUP</b>	<b>Ranking MEDIA</b>
221	8,9111667	10,5256	31	33
264	8,8660000	10,4868	32	36
7552	8,8755714	10,4168	33	35
284	8,3290000	10,2999	34	40
188	10,4890000	10,2203	35	29
280	8,2820000	10,1873	36	41
262	10,5144286	10,1208	37	28
185	6,0114286	10,0831	38	52
106	9,0221429	9,7320	39	32
217	8,4706667	9,7297	40	37
220	10,4608333	9,6744	41	30
89	6,2744286	9,5466	42	49
159	8,1302857	9,3915	43	42
287	7,4891667	9,3379	44	45
1143	8,0298333	9,1606	45	43
269	8,3381429	9,1005	46	39
268	6,7851429	8,9981	47	47
136	6,2333333	8,8548	48	50
186	5,8775000	8,8047	49	53
107	5,7397143	8,7520	50	54
212	4,1612857	8,7481	51	59
227	5,1426667	8,7138	52	57
6711	6,5358571	8,5422	53	48
215	5,1612857	8,1709	54	56
235	4,2665000	7,9184	55	58
282	5,6028571	7,6055	56	55
179	8,8910000	7,5858	57	34
267	7,6550000	7,4833	58	44
265	7,3515714	7,3730	59	46
6700	2,1451429	7,0155	60	60

## **6. DISCUSIÓN**

### **6.1 Composición, capacidad coagulativa de la leche y días en lactación**

Los resultados de composición obtenidos en este trabajo se encuentran en línea con lo reportado por De Marchi y col. (2007) de un conjunto mayor de datos y a su vez con lo investigado por G. Bittante. (2011).

Los resultados obtenidos demuestran que la fracción proteica (PT, PV, CN) y MG inciden directamente en el inicio del tiempo de coagulación, en la firmeza y sinéresis de la cuajada; obteniendo en este trabajo muy buenos valores de proteína y proteína verdadera. Los resultados coinciden con lo descrito por Okigbo et al. (1985), y Marziali y Ng-Kwai-Hang (1986). Esto podría explicarse dado que, de las proteínas en la leche, sólo se utilizan las caseínas en la producción de queso, siendo estas esenciales para la formación del gel encontrándose en gran proporción junto con la grasa; mientras que las proteínas séricas se pierden en el suero de queso (Han y Spradlin, 2001). También Brown (1981) demostró que la firmeza de la cuajada se vio afectada considerablemente por el contenido de la proteína e indicó que el tiempo desde que se inicia la coagulación hasta el momento indicado para el corte en la fabricación de queso se acortó cuando el contenido de proteína era alto.

Asimismo, según los resultados obtenidos, se observó que las PCL se encontraban óptimas al inicio de la lactancia. Durante los tres meses siguientes, estas propiedades se fueron deteriorando, alcanzando valores inferiores en la lactancia media. Durante el último tercio de la lactancia, las propiedades coagulativas mejoraron, pero no alcanzaron el nivel observado al inicio de la lactancia. Esto podría explicarse ya que elementos esenciales para la coagulación como el contenido de grasa, de proteínas y caseína de la leche son altos al inicio de la lactancia, alcanzando sus valores más bajos durante el primer tercio, volviendo a aumentar durante la lactancia media y aumentando abruptamente durante el último tercio de la lactancia. Los resultados concuerdan con los estudios realizados por Ikonen (2004) quien halló que los días de lactación influyen en el inicio del tiempo de coagulación. No obstante, este estudio deja en manifiesto que el análisis se puede realizar en cualquier etapa de la lactación, ya que, si bien se obtuvo que los días en lactación afectan significativamente las PLC, también se demostró que no hay demasiada variación entre la media BLUP y la media original.

Este ensayo se realizó en un rodeo que estuvo sometido a las mismas condiciones ambientales y de alimentación, lo cual permitió que no existieran diferencias en la valoración de los resultados al comparar los individuos. Este es un aspecto muy importante ya que la nutrición de los animales puede ser un medio para hacer cambios rápidos en la composición de la leche a pesar de que la relación entre los componentes de la alimentación y la composición de la leche es compleja (Sutton, 1989).

### **6.2 Utilización de Optigraph, alcances y limitaciones del método**

El estudio dirigido por el Dr. Hirigoyen en 2014 en conjunto con el laboratorio COLAVECO en un rodeo vacuno lechero uruguayo es pionero en el área de

investigación de las PCL. Debido a ello, en el ámbito nacional no hay resultados con los que se puedan comparar. Sin embargo, la bibliografía internacional es frecuente a partir del año 2000. Esta describe al Optigraph como una herramienta útil ya que a nivel mundial la cantidad de leche utilizada para la fabricación de queso es cada vez mayor, siendo el segundo producto de exportación de Uruguay (Bittante, 2011). Los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los obtenidos por otros autores, sin embargo, dichos autores han utilizado otras razas de animales además de la utilizada en el presente trabajo, así como diferentes condiciones de alimentación, número de pariciones y etapa de la lactación.

Con respecto a los estudios extranjeros, en la mayoría se describen las aptitudes coagulativas de diferentes razas. Dentro de ellas, la holando, aunque prima en los rodeos uruguayos, no es la que presenta mejores PCL e incluso presenta animales no coagulantes, aquellos cuyas muestras no se agregaron y formaron cuajada dentro de los 30 minutos luego de la adición de la enzima (Bittante, 2011). Cabe destacar que de los 40 animales que no fueron incluidos en este trabajo por no tener siete repeticiones en su medición, dos de ellos presentaron una muestra de leche que no coagulaba en el tiempo comprendido de 30 minutos, coincidiendo con lo realizado por Bittante. Por lo anteriormente mencionado, consideramos interesante el estudio comparado de esta característica con otras razas en nuestro país. Esto contribuiría a ampliar el conocimiento en futuras oportunidades, dado que el mismo estudio ya se ha realizado también en otra especie de producción quesera como lo es la cabra (Grille, Varela, Varela, Hirigoyen, 2017).

Según lo hallado en este estudio y lo encontrado en la revisión de bibliografía, la herramienta del Optigraph permite a los productores que ya tienen controlada su estructura productiva, mejorar el producto que elaboran a través de una leche de coagulación óptima. Es una metodología rápida, accesible en su costo y complementaria a otros análisis rutinarios que permite a los productores mejorar la aptitud quesera en base a una selección de los mejores individuos del rodeo, calificando directamente la actitud quesera mediante el uso de esta herramienta.

### **6.3 Ordenamiento de los animales de acuerdo a las PCL**

Este trabajo permitió identificar los animales que producen leches con mejores aptitudes queseras pudiendo establecer un ranking, el cual analizado con el productor puede ser de gran utilidad para la selección de animales, mejorar gradualmente el queso que produce, posicionarse en el mercado con un producto de calidad superior y obtener un mayor beneficio económico. No se establecieron grupos de animales rápidos, intermedios o lentos válidos para nuestro país por no disponer aún de suficientes datos y no contar con la mayor frecuencia en una distribución de datos (moda) de los mismos.

### **6.4 Perspectivas**

Dado que en Uruguay el segundo producto de exportación en materia de lácteos es el queso y el consumo por habitante es alto, es posible que en un futuro se pueda brindar un incentivo a los productores dependiendo de la calidad de coagulación de la leche destinada a la quesería. Asimismo, la capacidad predictiva de la

determinación realizada con Optigraph podría evitar pérdidas debido a la poca coagulabilidad de la leche que, a su vez, iría en desmedro del queso elaborado que tendría en el mercado un precio más bajo, pudiéndose destinar la leche con mala PCL a otros fines.

Para lograr resultados fructíferos con mayor impacto, el Optigraph no debería quedar restringido única e individualmente a unos pocos productores, sino que sería de mayor utilidad la existencia de laboratorios que ofrezcan el análisis a aquellos que lo soliciten, ya que con un bajo costo se podrían tomar mejores decisiones para la selección de ganado y obtener mayor rentabilidad en el producto.

## 7. CONCLUSIONES

Aplicando esta herramienta y efectuando un análisis de los datos, es posible establecer un ranking de animales según los valores de PCL que orienten a los productores hacia la mejora de la producción quesera.

Se trata de un análisis rápido y accesible que brinda información predictiva, precisa, y oportuna sobre una etapa fundamental de la elaboración de los quesos.

Se puede aplicar en un rodeo comercial, sometido a las mismas condiciones ambientales y de alimentación, donde existe cierta heterogeneidad en los días de lactancia y grado de pariciones, permitiendo compararlos entre ellos sin un error significativo.

En los rodeos uruguayos predominantemente de raza Holstein es más importante poder identificar las PCL, en comparación con otras razas, ya que como se reporta en otros países esta raza presenta en muchos individuos alteraciones de la coagulación de la leche.

Uruguay es un país netamente exportador de lácteos, que compite por el mercado externo para colocar sus productos, debido a ello los mercados son cada vez más exigentes y esta sería una herramienta para elevar la calidad de los quesos elaborados en nuestro país y mejorar además los rodeos orientados a la producción de quesos.



## ANEXOS

### Anexo 1

#### 1.1 Validación de parámetros Optigraph®

La validación de métodos, es el proceso por el cual se demuestra que los procedimientos analíticos son aptos para el uso indicado (HHS, 2000). A fines del año 2014 se inició con el trabajo teórico y práctico en Optigraph® buscando el manejo eficaz y preciso del equipo, así como solucionar cualquier problema que se pudiera presentar en el futuro. En combinación con el personal del laboratorio el cual ya había sido entrenado en el uso y manejo del Optigraph®, se comenzaron las corridas cambiando parámetros para familiarizarse con el equipo. Se realizaron corridas a diferentes temperaturas, concentraciones de cuajo, tiempo de corridas, se procesó también leche fresca, leche congelada, leche con conservante y leche sin conservante. Los diferentes resultados fueron relacionados y se efectuaron cálculos estadísticos.

#### 1.2 Leche sin conservante comparada con leche con conservante

Se relacionaron y se compararon los dos tipos de leche buscando alguna variación en algunos de los parámetros del Optigraph®. Se evaluó leche fresca sin conservante y leche fresca con conservante (Bronopol) en 5 diferentes grupos (Tabla I).

##### Condiciones:

1. Temperatura: variable (25°C y 32°C)
2. Dilución cuajo: 20/500 uL agua
3. uL cuajo/ cubeta: 20
4. n= 60 muestras de leche (30 con conservante y 30 sin conservante)
5. Tiempo de corrida: 180 minutos

Tabla I. Grupos de muestras

	Muestras de leche con conservante	Muestras de leche sin conservante
Grupo 1	5	5
Grupo 2	5	5
Grupo 3	10	10
Grupo 4	5	5
Grupo 5	5	5
Total	30	30

Se analizó estadísticamente mediante distribución t de student para leche con conservante y leche sin conservante (Tabla II).

**Tabla II. Comparación de medianas**

Nº de Grupo	R	AR	A2R
1	i	i	na
2	i	ni	ni
3	i	i	ni
4	ni	i	i
5	ni	ni	ni

R: tiempo de inicio de coagulación; AR: Parámetro de consistencia del gel medida como señal óptica a un tiempo igual a 2R; A2R: Parámetro de consistencia del gel medida como señal óptica a un tiempo igual a 3R; i: Igual; ni: No igual; na: No aplica.

### 1.3 Leche fresca comparada con leche congelada (con conservante y sin conservante)

Se procesaron muestras de leche fresca y leche congelada tanto con conservante (Bronopol) como sin conservante en 5 diferentes grupos (Tabla III).

#### Condiciones:

1. Temperatura: variable (25°C y 32 °C)
2. Dilución cuajo: 20/500 uL agua
3. uL cuajo/ cubeta: 20
4. n = 65 muestras de leche sin conservante (30 leche fresca, 35 leche congelada)
5. n = 40 muestras de leche con conservante (20 leche fresca, 20 leche congelada)

**Tabla III. Grupo de muestras**

	Muestras de leche fresca	Muestras de leche congelada
Grupo 1	5	5
Grupo 2	5	5
Grupo 3	10	10
Grupo 4	5	5
Grupo 5	5	5
Total	30	30

Se analizó estadísticamente mediante distribución t de student para leche con y sin conservante (Tabla IV).

**Tabla IV. Comparación de medianas**

Nº de grupo	R	AR	A2R
1	i	i	na
2	i	ni	ni
3	i	i	ni
4	ni	i	i
5	ni	ni	ni

R: tiempo de inicio de coagulación; AR: Parámetro de consistencia del gel medida como señal óptica a un tiempo igual a 2R; A2R: Parámetro de consistencia del gel medida como señal óptica a un tiempo igual a 3R; i: Igual; ni: No igual; na: No aplica.

## 1.4 Linealidad

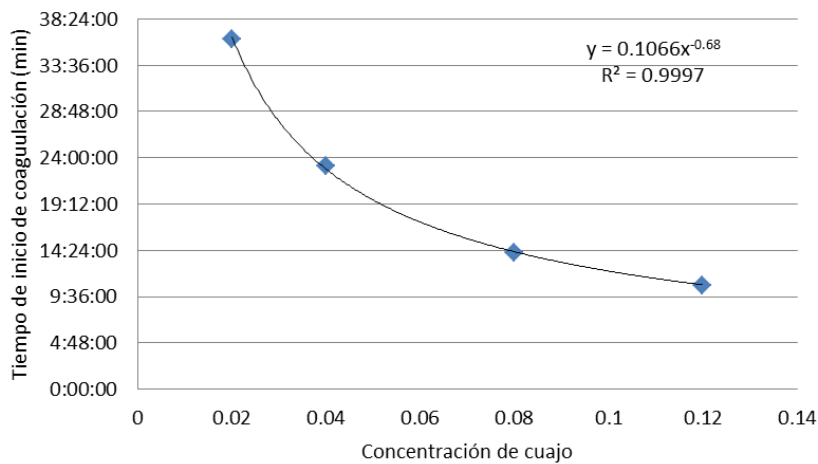
La linealidad de un método analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado.

Se realizaron tres variantes de linealidad en diferentes días con las mismas concentraciones, obteniendo resultados similares:

1. Temperatura: 25°C
2. Dilución cuajo: 60/500 uL agua destilada (0,12)
  - 40/500 uL agua destilada (0,08)
  - 20/500 uL agua destilada (0,04)
  - 10/500 uL agua destilada (0,02)
  - 5/500 uL agua destilada (0,01)
3. n= 50 muestras de leche (10 muestras para cada concentración)

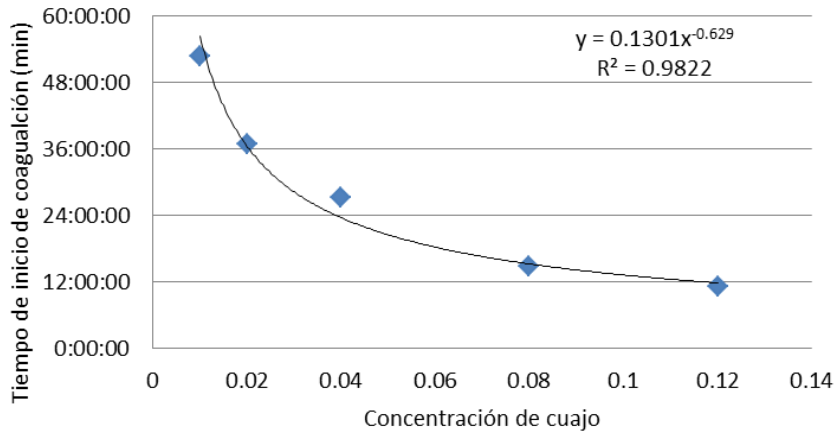
En la primera se corrieron dos muestras para cada concentración con un total de n=10.

**Gráfico I. Linealidad 1**



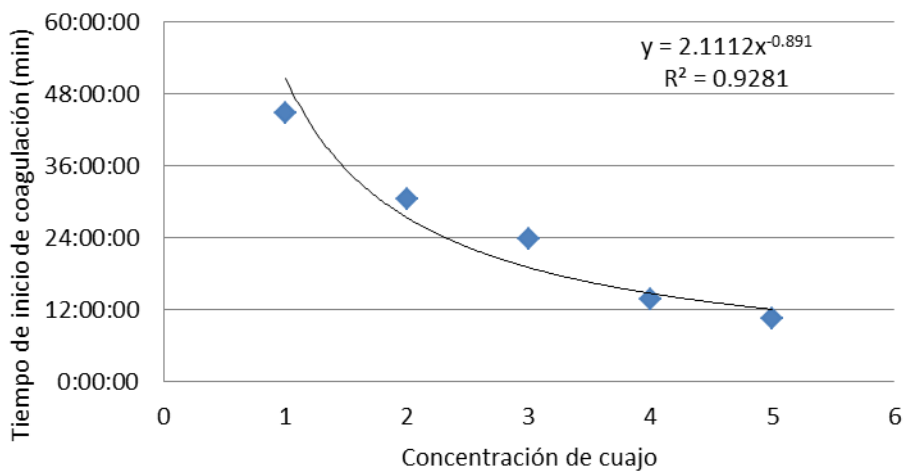
En la segunda Linealidad se corrieron seis muestras para cada dilución, n=30

**Gráfico II. Linealidad 2**



Por último, en la tercera linealidad se procesaron dos muestras para cada dilución, n=10.

**Gráfico III. Linealidad 3**



Luego se realizó nuevamente Linealidad a 35°C

Los tres gráficos (grafico I, II, III) muestran claramente que, al aumentar la concentración de cuajo, disminuye el tiempo de inicio de la coagulación (R). Con la mayor concentración utilizada en esta validación se obtiene el tiempo de R que fácilmente se puede llevar a la práctica de manera eficiente.

## 1.5 Límite de detección – cuantificación

### LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección es la menor cantidad de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones del experimento indicadas. Así, las pruebas de límite confirman simplemente que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de un cierto nivel.

Métodos instrumentales: Análisis de muestras con concentraciones conocidas de analitos para establecer la concentración mínima a la cual el analito puede detectarse en forma confiable.

### LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

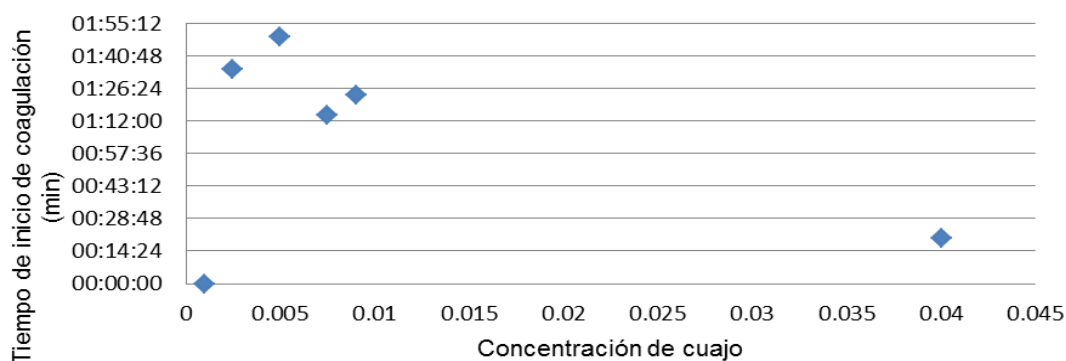
El límite de cuantificación es la menor cantidad de analito en una muestra que puede determinarse con una precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones del experimento establecidas.

Condiciones del ensayo:

- Se realizó a diferentes temperaturas 25°C y 32°C
- Se procesaron n= 20 con diferentes concentraciones cuajo
- Se fijó un tiempo de duración de duración de 180 minutos

Claramente se puede notar que al aumentar la concentración de cuajo, aumenta la velocidad de coagulación R. Teóricamente, este es el resultado que se debería haber obtenido. Sin embargo, prácticamente las variables no se han comportado de dicha manera. Esto se puede haber debido a un error en el procesamiento tanto de la muestra de leche como de la concentración de cuajo. El error también pudo ser producto del trabajo con un bajo número de muestras. Se procesaron tres muestras para las concentraciones 0,001; 0,0025; 0,0075 y 0,0090; 6 muestras para 0,0050 y dos para el control 0,04 (Grafico IV).

**Grafico IV. Límite de Detección - Cuantificación**



	Concentración	Promedio R
1	0,0010	0:00:00
2	0,0025	1:35:02
3	0,0050	1:49:20
4	0,0075	1:14:43
5	0,0090	1:23:27
6	0,04	0:20:10

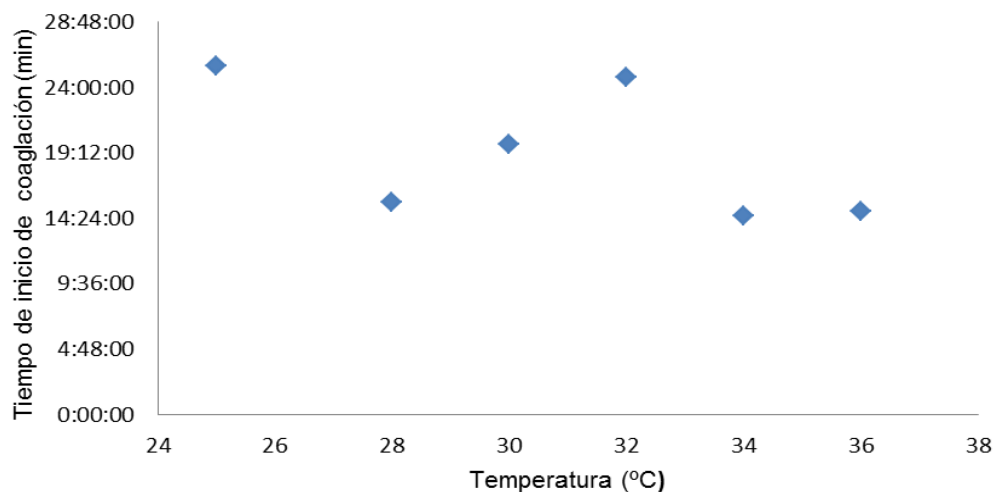
## 1.6 Influencia de la temperatura

Se realizaron corridas a diferentes temperaturas para comparar los tiempos de inicio de la coagulación (R). Se procesaron 75 muestras de la siguiente manera:

Muestras	Temperatura
30	25°C
10	28°C
10	30°C
5	32°C
10	34°C
10	36°C

La variación de la temperatura demuestra diferencias en la actividad de la enzima, siendo la temperatura óptima 25° y 32°C (Grafico V). Luego que se estudió el efecto de la temperatura sobre RCT. Se definió una temperatura de 35°C para trabajar, debido a los estudios y trabajos previos, y por ser la temperatura que utilizan muchos queseros en tina. Una vez puesto a punto el equipo, se realizó la linealidad nuevamente a 35°C.

**Gráfico V. Efecto de la temperatura sobre R**



## 1.7 Linealidad (35°C)

Se realiza la linealidad con leche fresca con conservante.

Condiciones:

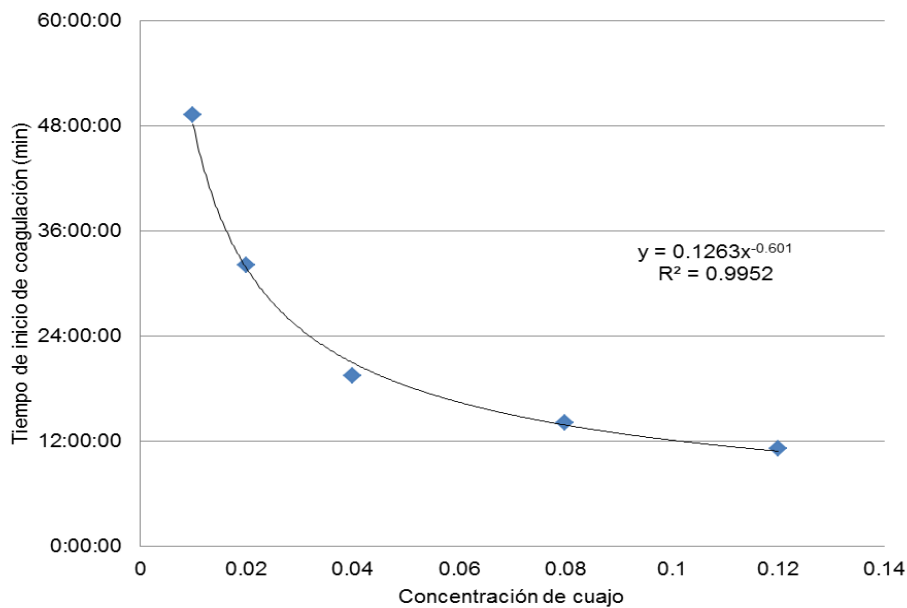
1. Temperatura: 35°C

2. Dilución cuajo:

- 60/500 uL agua destilada (0,12)
- 40/500 uL agua destilada (0,08)
- 20/500 uL agua destilada (0,04)
- 10/500 uL agua destilada (0,02)
- 5/500 uL agua destilada (0,01)

N =20 muestras de leche (4 muestras para cada concentración).

Gráfico VI. Linealidad a 35°C



Concentración	Promedio
0.01	49:15:30
0.02	32:05:15
0.04	19:26:45
0.08	14:05:00
0.12	11:04:30

Se continuó trabajando a una temperatura de 35°C debido a las causas mencionadas anteriormente. Con respecto a la concentración, también se obtuvieron buenos resultados [60/500] para leche bovina y una buena relación con el tiempo.

Las corridas demoran un tiempo que perfectamente se puede llevar a la práctica diaria. Además de estas corridas en Optigraph® que ayudaron para practicar y validar el equipo, se han escrito y expuesto diferentes tipos de trabajos tanto orales como escritos relacionados a este tema. Uno de ellos es el realizado por Hirigoyen, De los Santos, Rodríguez, Espino, Barca y Constantin (2015), en donde se obtuvieron buenos resultados. Los optigramas de cada una de las leches analizadas respondieron de manera diferente frente al mismo cuajo.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Alais, C. (1984). Science du lait. 4a ed. Paris, Société d'édition et de promotion agro-alimentaires, industrielles et commerciales, 814p.
2. AMS France (2008). Optigraph - Manual del Usuario, Frepillon, 30p.
3. Anderson, T.W., Theodor, W.A. (1984). An introduction to multivariate statistical analysis. 2a ed, Nueva York, Wiley, 675p.
4. Banks, J. M., Muir, D.D. (1984). Coagulum strength and cheese yield. Dairy Ind. Int., 49: 17-21, 36.
5. Bittante, G. (2011). Modeling rennet coagulation time and curd firmness of milk. J. Dairy Sci, 94: 5821-5832.
6. Borbonet, S. (2001). Historia de la Quesería en Uruguay. Disponible en: <http://www.portalechero.com/innovaportal/v/296/1/innova.front/historia-de-la-queseria-en-uruguay.html> Fecha de consulta: 11/3/2015.
7. Brown, R. J. (1981). Mechanism of milk clotting. Proceeding 2º Biennial. Marschall Internationa cheese conference. Madison, USA, septembre 15-18, 1981, p. 107-112.
8. Brule, G. (1981). Les minéraux du Lait. Revue laitière Française, 400: 61-65.
9. Brule, G, Lenoir, J. (1987). La coagulation du lait. En ECK, A., Gillis, J-C. Le fromage. Paris, Lavoisier, 1: 1-21.
10. Centro de Información Oficial (IMPO) (1994). Leche y derivados. En IMPO. Reglamento Bromatológico Nacional, Montevideo, Dirección Nacional de Impresiones y Publicaciones Oficiales, 16: 134-144.
11. Cheryan, M., Van Wyk, P.J., Olson, N.F., Richardson, T. (1974). Secondary phase and mechanism of enzymic milk coagulation. J. Dairy Sci., 58: 477-481.
12. Coulon, J. B., A. Delacroix-Buchet, Martin, B. (2004). Relationships between ruminant management and sensory characteristics of cheeses: A review. Lait, 84: 221-241.
13. Dalgleish, D.G. (1979). Proteolysis and aggregation of casein micelles treated with immobilized or soluble chymosin. J. Dairy Res., 46: 653-661.
14. Dalgleish, D.G., Brinkhuis, J., Payens, T.A. (1981). The coagulation of differently sized casein micelles by rennet. Eur. J. Biochem, 119: 257-261.
15. Dalgleish, D.G. (1983). Coagulation of renneted bovine casein micelles: dependence on temperature, calcium ion concentration and ionic strenght. J. Dairy Res., 50: 331-340.
16. Ferrier, L.K., Richardson, T., Olson, N.F., Hicks, C. L. (1972). Characteristics of insoluble pepsin used in a continous milk-Clothing system. J. Dairy Sci., 55: 726-734.
17. FONADEP (Fondo Nacional De Preinversión). (2008). Primer informe de avance. Desarrollo de la Quesería Artesanal de la Cuenca Lechera del Litoral, Departamentos de Salto Paysandú y Río Negro, Uruguay. Consultoría financiada con recursos de FONADEP Salto-Paysandú-Río Negro- Uruguay, p.1-72.
18. González, B. (1991). Análisis multivariante: Aplicación al ámbito sanitario. Barcelona, SG editores S.A., 247p.
19. Green, M.L., Hobbs, D.G., Morant, S.V., Hill, V.A. (1978) Intermicellar relationship in rennet-treated separated milk, II. Process of gel assembly. J. Dairy Res., 45: 413-422.
20. Green, M.L., Marshal, R.J. (1979). Interaction of ionic materials with casein micelle. J. Dairy Res., 46: 365-367.

21. Grille, L., Varela, C., Varela, F., Hirigoyen, D. (2017). Capacidad coagulativa de la leche de cabra: diferencias entre razas y numero de lactancias. Jornadas Uruguayas Buiatría XLV, Paysandú, Uruguay, p. 197-200.
22. Hirigoyen, D., Constantin, M., Rodríguez, G., González, I., Rabaquino, L. (2015). Validación de la técnica de estimación de las propiedades coagulativas de la leche mediante dispositivo de medición (Optigraph). Jornadas Técnicas Veterinarias, Montevideo, Uruguay, 9 ° CD ROM.
23. Hirigoyen, D., De los Santos R., Rodriguez, G., Espino, F., Barca, J., Constantin, M. (2015). Valoración de las propiedades coagulativas de la leche de vaca, mediante Optigraph. Jornadas Uruguayas Buiatría XLIII, Paysandú, Uruguay p. 262-265.
24. Ibanez W. (2006). Introducción al uso de Componentes Principales en Investigación. Seminario, Salto, Uruguay, 17p.
25. INALE. (2016). Situación y Perspectivas Mercado Mundial de Lácteos. Disponible en: <http://www.portalechero.com/innovaportal/v/10177/1/innova.front/uruguay:-inale-lanzo-su-informe-sobre-situacion-y-perspectivas-mercado-mundial-de-lacteos.html>. Fecha de consulta: 20/05/2017
26. INALE. (2014). Venta de queso común en el mercado interno. Informe anual 2014. Disponible en: <http://www.inale.org/innovaportal/v/138/4/innova.front/queso-comun.html> Fecha de consulta: 11/3/2015.
27. Ikonen, T., Ahlfors, K., Kempe, R., Ojala, M., Ruottinen, O. (1999). Genetic parameters for the milk coagulation properties and prevalence of noncoagulating milk in Finnish dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 82: 205–214.
28. Ikonen, T., Morri, S., Tyriseva, A., Ruottinen, O., Ojala, M. (2004). Genetic and phenotypic correlations between milk coagulation properties, milk production traits, somatic cell count, casein content and ph of milk. *J. Dairy Sci.*, 87: 458-467.
29. Lenoir, J., Lambert, G., Schmidt, J.L., Tourneur, C. (1985). La maîtrise du bioreacteur fromage. *Biofutur*, 41: 23-50.
30. Lenoir, J., Schneid, N. (1987). L'aptitud du lait a la coagulation par la presure. En ECK, A., Gillis, J-C. *Le fromage*. Paris, Lavoisier, p. 139-150.
31. Lenoir, J., Veisseyre, R. (1987). Coagulation du lait par la presure er correction des laits de fromagerie. En CEPIL. *Le lait, matière première de la industrie laitière*. Paris, Institut national de la recherche agronomique, p 327-342.
32. Macheboeuf, D., Coulon, J. B., D'Hour, P. (1993). Effect of breed, protein genetic variants and feeding on cows' milk coagulation properties. *J. Dairy Res.*, 60: 43–54.
33. Marziali, A. S., Ng-Kwai-Hang. K. F. (1986). Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk. *J. Dairy Sci.*, 69: 1793–1798.
34. McMahon, D. J., Brown, R. J. (1982). Evaluation of Formagraph for comparing rennet solutions. *J. Dairy Sci.*, 65: 1639-1642.
35. McSweeney, P. L. H., Ottogalli, G., Fox, P. F. (2004). Diversity of cheese varieties: An overview. En Fox, P. F, McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M., Guinee, T. P., *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. Volumen 2. Major cheese groups, 3a ed, Amsterdam p. 1-22.
36. McSweeney, P. L. H. (2004). Biochemistry of cheese ripening: Introduction and overview. En Fox, P. F, McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M., Guinee, T. P., *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. Volumen 1. General aspects, 3a ed. Amsterdam, Elsevier, p. 347-360.

37. Mehaia, M.A., Cheryan, M. (1983). Treatment of casein micelles with soluble and immobilized neuraminidase: implications in structure of the micelle. *J. Dairy Sci.*, 66: 390-395.
38. Mercier, J.C., Brignon, G., Ribadeau-Dumas, B. (1973). Primary Structure of bovine caseine. Complete sequence. *Eur. J. Biochem*, 35: 22-235.
39. Mercier, J. C., Chobert, J. M. (1976). Comparative study of the amino acid sequences of the caseinmacropeptides from seven species. *F.E.B.S. Letters*, 72: 208-214.
40. Morrison, N., Donald, F. (1976) *Multivariate statistical methods*. 2a ed. New York, Mc Graw-Hill Book Company, 415p.
41. Niki, R., Arima, S. (1984). Effects of size of casein micelle on firmness of rennet curd. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 55: 409-415.
42. Butendieck B. (1997). Células mastitis y calidad de la leche. Disponible en: <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/seriesinia/NR22423.pdf>. Fecha de consulta: 20/05/2017.
43. Okigbo, L. M., G. H. Richardson, R. J. Brown, Ernstrom, C. A. (1985). Variation in coagulation properties of milk from individual cows. *J. Dairy Sci.*, 68: 822–828.
44. Payens, T. A. J. (1976). On the enzymic triggered clotting of casein. A preliminary account. *Neth Milk Dairy J.*, 30: 55-59.
45. Pierre, A. (1983). Influence de la modification de la charge des micelles de caséine sur le taux de caséinomacropeptide libéré para la présure au moment de la coagulation du lait. *Le lait*, 63: 217-229.
46. Portal Lechero. (2016). Producción mundial de leche reacciona ante bajos precios. Disponible en: <http://www.portalechero.com/innovaportal/v/10267/1/innova.front/produccion-mundial-de-leche-reacciona-ante-bajos-precios.html>. Fecha de consulta: 20/05/2017.
47. RABOBANK (2016). Dairy Quarterly Q3 2016: Markets Tighter despite Hight Stocks. Disponible en: <https://research.rabobank.com/far/en/sectors/dairy/dairy-quarterly-q3-2016.html> Fecha de consulta: 27/03/2017
48. SAS Institute Inc. (1988). *SAS/STAT User's guide*, release 6.03 Edition. Cary, NC: SAS institute Inc., 1028 p.
49. Schmidt, D.G. (1982). Association of Caseins and Casein Micelle Structure. En FOX, P.F. *Developments in dairy chemistry*. London, Applied Science Publishers, p. 61-86.
50. Sutton, J.D. (1989). Altering milk composition by feeding. *J. Dairy Sci.*, 72: 2801-2814.
51. Tarodo de la Fuente, B., Lablee, J. (1987). Aspects nouveaux concernant la coagulation du lait et la synérèse du coagulum. *Revue des ENIL*, 118: 26-28.
52. Van Dijk, H. J. M. (1982). Doctoral thesis: Syneresis of curd. Agricultural university of Wageningen, 87p.
53. Van Hooydonk, A. C. M., Van Den Berg, G. (1988). Control and determination of the curd-setting during cheesemaking. Brussels, International Dairy Federation, 225: 2-10.
54. Vanderheiden, G. (1976) An apparatus for continuously monitoring the structural rigidity of a gel. En *CSIRO Food Research Quarterly* 36: 45-47.
55. Veisseyre, R. (1975) *Technologie du lait*. 3a. ed. Paris. La Maison Rustique, 709p.
56. Verdalet, I. (1989). Las aptitudes queseras de la leche. *Revista la ciencia y el Hombre*. Universidad Veracruzana, México, 9: 63-70.

57. Walstra, P., Van Vliet, T. (1986). The physical chemistry of curd making. *Neth. Milk Dairy J.*, 40: 241-259.
58. Weber, F. (1987). L'égouttage du coagulum. En *Le Fromage*, 2a ed, ECK, A, Lavoisier, Paris, p.22-36.