

NORDOM 57 (1ra Rev.)

CT: 67-1

Coordinadora: Modesta B. Acosta

Leche y productos lácteos — Determinación del contenido de proteínas

ANTEPROYECTO

Advertencia

Este documento no es una Norma Nacional NORDOM. Se distribuye para su revisión y comentarios. Está sujeto a cambios sin previo aviso y no puede ser referido como un Estándar Internacional.

Los destinatarios de este borrador están invitados a enviar, con sus comentarios, la notificación de cualquier derecho de patente relevante del que tengan conocimiento y proporcionar documentación de respaldo.

Contenido

Prefacio	iii
1 Objeto y campo de aplicación.....	1
1.1 Objeto.....	1
1.2 Campo de aplicación.....	1
2 Referencias normativas.....	1
3 Términos y definiciones.....	1
4 Principio.....	1
5 Reactivos.....	1
6 Aparatos.....	2
7 Muestreo	2
8 Preparación y conservación de la muestra	3
8.1 Leche cruda, leche pasteurizada y homogeneizada	3
8.2 Leche concentrada sin adición de azúcar (leche evaporada).....	3
8.3 Leche concentrada azucarada (leche condensada).....	3
8.4 Leche en polvo y leche malteada.....	3
9 Procedimiento	3
9.1 Preparación de la solución de prueba.....	4
9.2 Determinación	4
9.2.1 Configuración del quemador de digestión	4
9.2.2 Digestión.....	4
9.2.3 Destilación	5
10 Expresión de los resultados.....	5
10.1 Verificación de recuperación de nitrógeno	5
10.2 Cálculos	5
Bibliografía	6

Prefacio

El Instituto Dominicano para la Calidad (INDOCAL), es el organismo oficial que tiene a su cargo el estudio y preparación de las Normas Dominicanas (NORDOM) a nivel nacional. Es miembro de la Organización Internacional de Normalización (ISO), Comisión Internacional de Electrotécnica (IEC), Comisión del Codex Alimentarius y Comisión Panamericana de Normas Técnicas (COPANT), representando a la República Dominicana ante estos organismos.

La norma **NORDOM 57 (1ra Rev.) Leche y productos lácteos. Determinación de proteínas**, ha sido preparada por la Dirección de Normalización del Instituto Dominicano para la Calidad (INDOCAL).

La decisión de revisar esta norma surgió por iniciativa de la Dirección de Normalización del Instituto Dominicano para la Calidad (INDOCAL) en cumplimiento de los procedimientos aplicables de actualización de los documentos luego de haber cumplido el período de vigencia y, por considerar que la misma forma parte de los requisitos de algunas normas de aplicación para la leche y los productos lácteos.

El estudio de la citada norma estuvo a cargo del **Comité Técnico CT 67:1 Leche y productos lácteos**, integrado por representantes de los sectores de producción, consumo y técnico, quienes iniciaron su trabajo tomando como base **el Método Oficial AOAC 991.20 Nitrógeno (total) en la leche. Métodos Kjeldahl y la NORDOM 57 Leche y productos lácteos. Determinación de proteínas**, de los cuales partió la propuesta a ser estudiada por el comité.

Dicha propuesta de norma fue aprobada como anteproyecto de norma por el Comité Técnico de Trabajo, en la reunión **No.395** de fecha **21 septiembre 2022** y enviado a encuesta pública por un período de 60 días.

Formaron parte del comité técnico, las entidades y personas naturales siguientes:

Modesto Pérez	Punto de Contacto Codex/Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (PCC-RD/MISPAS)
Fernando Disla	Dirección General de Medicamentos, Alimentos y Productos Sanitarios (DIGEMAPS/MISPAS)
Wáscar Sánchez Cristian González Leomilka Jiménez	Instituto Nacional de Protección de los Derechos del Consumidor (Pro Consumidor)
Denise Candelario	Productos Químicos Industriales (PQI)
Leandro Vargas	Consejo Nacional para la Reglamentación y Fomento de la Industria Lechera (CONALECHE)
Virginia Morales	Asesora en el área de alimentos
María Celeste Rodríguez	Consejo Nacional de Consumidores & Usuarios (CONACONU)
Rosalina Rodríguez	Mejía Arcalá
Julia Carrasco	Sigma Alimentos, S.A.
Svetlana Afanasieva	Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MISPAS)/ Programa de Nutrición del Viceministerio de Salud Colectiva

Rosa Houlemont	Grupo SID
José Valenzuela	Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña (UNPHU)
Yuderky Pérez Mariana Furakis	Consejo Nacional para la Reglamentación y Fomento de la Industria Lechera (CONALECHE)
Miguel Acosta	Ministerio de Industrias, Comercio y Mipymes (MICM)
Milagros Peralta Jairo Martínez José Sierra Miguelina Garabito	Laboratorio Nacional de Salud Pública Doctor Defilló (LNSPDD)
Carmen Gutiérrez	Ministerio de Agricultura, M.A. / Dpto. Inocuidad Agroalimentaria
Ana Melania Soriano	Observatorio Nacional para la Protección del Consumidor (ONPECO)
Karedy Cohen	Nestlé Dominicana
Zaira Martir	Unilever Caribe
Elsa Peña Crispatri Patricio Liverca Gómez	Helados Bon Comisión Nacional de Defensa de la Competencia (PRO-COMPETENCIA)
Juan Araujo	Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD)
Raquel Perelló	Pasteurizadora Rica
Modesta B. Acosta	Instituto Dominicano para la Calidad (INDOCAL)

Leche y productos lácteos — Determinación del contenido de proteínas

ADVERTENCIA — El uso de esta norma puede implicar materiales, operaciones y equipos peligrosos. No se pretende considerar todos los problemas de seguridad o ambientales asociados con su uso. Es responsabilidad de los usuarios de esta norma adoptar las medidas apropiadas para garantizar la seguridad y la salud del personal y el medio ambiente antes de la aplicación de la norma, y cumplir con los requisitos legales y reglamentarios para este propósito.

1 Objeto y campo de aplicación

1.1 Objeto

Esta norma establece el método para determinar el contenido de proteínas en leches destinadas al consumo directo o a la elaboración posterior.

1.2 Campo de aplicación

Esta norma aplica para la leche cruda, pasteurizada y homogeneizada, evaporada, condensada, en polvo y malteada (enteras, parcial o totalmente descremadas).

2 Referencias normativas

Los siguientes documentos se mencionan en el texto de tal manera que parte o todo su contenido constituye requisitos de este documento. Para las referencias con fecha, sólo se aplica la edición citada. Para las referencias sin fecha, se aplica la última edición del documento referenciado (incluidas las enmiendas).

NORDOM 30, Toma de muestra para la leche y los productos lácteos. Definiciones y directrices

Método Oficial AOAC 936.15 (A.1.06), Solución estándar de ácido clorhídrico

3 Términos y definiciones

Para los fines de este documento, se aplica el siguiente término y definición:

3.1

Contenido de proteínas en la leche

Cantidad de nitrógeno total de la leche, expresado convencionalmente como contenido de proteínas y determinada mediante procedimientos normalizados.

4 Principio

Se determina el contenido de nitrógeno total por el método de Kjeldahl y se multiplica el resultado por el factor 6.38 para expresarlo como proteína.

5 Reactivos

5.1 Ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 95-98 %, libre de nitrógeno

5.2 Solución de catalizador de cobre

5.3 Sulfato de potasio (K_2SO_4), libre de nitrógeno

5.4 Solución de hidróxido de sodio (NaOH), libre de nitrato al 50% (p/p)

5.5 Perlitas de ebullición. Se sugiere un tamaño de malla 10. Granulado de alundum anfótero de alta pureza, simple.

5.6 Solución indicadora de rojo de metilo/verde de bromocresol. Disolver 0.2 g de rojo de metilo y diluir a 100 cm³ en etanol al 95%. Mezcle una parte de solución de rojo de metilo con cinco partes de solución de verde de bromocresol (combine todas las soluciones).

5.7 Solución de ácido bórico al 4 % con indicador. Disuelva 40 g de H_3BO_3 y diluya a 1 L en agua y agregue 3 cm³ de solución indicadora de rojo de metilo/verde de bromocresol. La solución tendrá un color naranja claro.

5.8 Solución estándar de ácido clorhídrico 0.1000 M. Prepare como en el Método Oficial AOAC 936.15 (Ver A.1.06) o use solución preparada con un rango de especificación certificado 0.0995 – 0.1000 M y use 0.1000 M para el cálculo.

5.9 Sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$, al 99 %

5.10 Triptófano o Clorhidrato de Lisina ($C_{11}H_{12}N_2O_2$) al 99 %, o $C_6H_{15}ClN_2O_2$

5.11 Sacarosa. Libre de nitrógeno.

6 Aparatos

Los aparatos de laboratorio habituales y, en particular, los siguientes:

6.1 Matraces de digestión-Kjeldahl. Vidrio duro, moderadamente grueso, bien recocido. Capacidad total entre 500 u 800 cm³.

6.2 Matraces de destilación. Los mismos matraces Kjeldahl que en (6.1), equipados con un tapón de goma a través del cual pasa el extremo inferior de un bulbo o trampa de goma eficiente para evitar el arrastre mecánico de NaOH durante la destilación. Conecte el extremo superior del bulbo al tubo del condensador mediante un tubo de goma. Use un matraz de titulación Erlenmeyer graduado de 500 ml para recolectar el destilado. Colocar una trampa en la salida del condensador para asegurar la completa absorción de NH_3 destilado en la solución de ácido bórico.

6.3 Sistema de digestión/destilación. Aparato tradicional con controles ajustables para matraces individuales.

6.4 Bureta de titulación de 50 ml, Clase A o equivalente.

7 Muestreo

7.1 El muestreo no es parte del método especificado en esta norma. Un método de muestreo recomendado se proporciona en la NORDOM 30 Toma de muestra para la leche y los productos lácteos. Definiciones y directrices.

7.2 Una muestra representativa deberá enviarse al laboratorio y no deberá dañarse ni cambiarse durante el transporte o almacenamiento.

8 Preparación y conservación de la muestra

8.1 Leche cruda, leche pasteurizada y homogeneizada

Se calienta la muestra a una temperatura de 20 °C, aproximadamente, se mezcla hasta que esté homogénea, vaciándola repetidas veces de un recipiente limpio a otro y se mide o se pesa rápidamente la cantidad que se va a utilizar en el ensayo. Si se forman grumos de crema y estos no se dispersan, se calienta la muestra en baño María a 38 °C aproximadamente, y se mezcla hasta que esté homogénea, usando un agitador apropiado si es necesario para reincorporar cualquier partícula de crema adherida al recipiente o tapón. Cuando la grasa permanezca dispersa, se enfría la muestra a 20 °C aproximadamente antes de transferir la porción de ensayo.

8.2 Leche concentrada sin adición de azúcar (leche evaporada)

8.2.1 Se agita el envase y al mismo tiempo se invierte varias veces, luego se abre y se vierte el producto, lentamente, a un segundo envase provisto de una tapa adecuada. Se mezcla vertiendo el contenido repetidas veces de un envase a otro, teniendo cuidados de incorporar en la muestra cualquier cantidad de grasa u otro constituyente adherido a las paredes o a los bordes del primer envase.

8.2.2 Finalmente se transfiere la leche, tan completamente como sea posible al segundo envase y se cierra éste. Si es necesario, se calienta el envase sin abrir en baño María de 40 °C - 60 °C durante 2 horas, sacándolo cada 15 minutos para agitarlo vigorosamente. Luego se deja enfriar a la temperatura ambiente y se procederá como al inicio de este apartado.

8.3 Leche concentrada azucarada (leche condensada)

8.3.1 Se abre el envase y se mezcla perfectamente la leche con una cuchara o con una espátula. Se emplea movimiento rotatorio de arriba abajo, en tal forma que el contenido del envase se remueva y se mezcle. Deberá tenerse cuidado de incorporar en la muestra cualquier cantidad de leche adherida a las paredes y en los bordes del envase.

8.3.2 Se transfiere el producto tan completamente como sea posible al segundo envase provisto de tapa adecuada y se cierra.

8.3.3 Si fuera necesario, se calienta el envase sin abrir en un baño María de 30 °C a 40 °C, se abre y vacía todo el producto raspando con una espátula lo que haya quedado adherido a las paredes, en una cápsula de capacidad suficiente para efectuar un mezclado perfecto, el cual se lleva a cabo hasta que toda la masa esté completamente homogénea. Luego se pesan 100 g de la muestra, se transfieren a un matraz volumétrico de 500 cm³, se completa el volumen con agua destilada y se agita vigorosamente.

8.4 Leche en polvo y leche malteada

8.4.1 Con el objeto de mezclar perfectamente la leche en polvo, se transfiere la muestra a un recipiente bien seco, provisto de una tapa adecuada y que tenga una capacidad igual al doble de la cantidad de la muestra; se cierra y se mezcla bien el contenido agitando e invirtiendo sucesivamente el recipiente.

8.4.2 Para sacar la porción de muestra para análisis, se abre y se cierra el recipiente tan rápido como sea posible para reducir al mínimo la absorción de humedad.

9 Procedimiento

Dependiendo del tipo de producto, se pesa o se mide la cantidad de muestra que se indica a continuación:

- a) Leche cruda, leche pasteurizada y homogeneizada, 5 g de la muestra preparada como se indica en 8.1.

- b) Leche evaporada, 5 g de la muestra preparada como se indica en 8.2.
- c) Leche condensada, 10 cm³ de la muestra preparada y diluida como se indica en 8.3.
- d) Leche en polvo y leche malteada, 1 g de la muestra preparada como se indica en 8.4.

9.1 Preparación de la solución de prueba

Agregue 15.00 g K₂SO₄, 1 cm³ de solución catalizadora de CuSO₄ · 5H₂O y 8-10 perlitas de ebullición a los matraces de digestión. Caliente la leche a 38 °C ± 1 °C. Mezcle la leche según el tipo de acuerdo a lo indicado en el capítulo 8. Pese la muestra caliente (5 ± 0.1 cm³) e inmediatamente colocarla en matraces de digestión. Añadir 25 cm³ de H₂SO₄ enjuagando la leche del cuello de los matraces hasta el bulbo. Los matraces se pueden tapar y mantener para la digestión en un momento posterior. Digerir y destilar un blanco (todos los reactivos y ningún producto de prueba) cada día.

NOTA Los pesos deberán registrarse con una precisión de 0.0001 g

9.2 Determinación

9.2.1 Configuración del quemador de digestión

Realice la digestión sobre un dispositivo de calentamiento que se puede ajustar para llevar 250 cm³ H₂O a 25 °C a ebullición en aprox. 5-6 min. Para determinar la configuración máxima del calentador que se utilizará durante la digestión, precaliente 10 min (gas) o 30 min (eléctrico) en el ajuste del quemador a evaluar. Agregue 3 o 4 perlitas en ebullición a 250 ml de H₂O a 25 °C y coloque el matraz en un quemador precalentado. Determine la configuración del calentador que hace que el agua pase de 25 °C a punto de ebullición en 5-6 min sobre cada quemador. Esta es la configuración máxima del quemador durante la digestión.

9.2.2 Digestión

a) Coloque los matraces en posición inclinada con el sistema de expulsión de humos activado. Comience con un ajuste lo suficientemente bajo para que la porción de prueba no forme espuma en el cuello del matraz Kjeldahl. Digerir al menos 20 min o hasta que aparezcan vapores blancos en el matraz. Luego, aumente la configuración del quemador a la mitad de la configuración máxima del quemador determinada en (9.2.1) y caliente durante 15 min. Luego, aumente el calor al ajuste máximo determinado en (9.2.1). Cuando la digestión se aclare (transparente con un color azul verdoso claro), continúe hirviendo de 1 a 1.5 h en el ajuste máximo (tiempo total aproximado de 1.8 a 2.25 h).

b) Para determinar el tiempo de ebullición específico necesario para las condiciones de análisis en el laboratorio, seleccione una muestra de prueba de leche alta en proteínas y grasa y determine el contenido utilizando diferentes tiempos de ebullición (1-1.5 h) después de la limpieza. La prueba de proteína media aumenta con el aumento del tiempo de ebullición (0-1.5 h), se vuelve constante y luego disminuye cuando el tiempo de ebullición es demasiado largo. Seleccione el tiempo que produce la prueba de proteína máxima.

c) Al final de la digestión, la digestión deberá ser clara y libre de material no digerido. Enfriar el ácido a temperatura ambiente (aprox. 25 min.). El digesto enfriado deberá ser líquido o líquido con pocos cristales pequeños. (Una gran cantidad de cristalización antes de la adición de agua indica muy pocos residuos de H₂SO₄ al final de la digestión y puede resultar en valores de prueba bajos). Después de que la digestión se enfríe a temperatura ambiente, agregue 300 cm³ de H₂O a los matraces y agite para mezclar (para matraces de 800 ml, agregue 400 ml de H₂O). Cuando se agrega agua a temperatura ambiente, se pueden formar algunos cristales y luego disolverse; esto es normal. Deje que la mezcla se enfríe a temperatura ambiente antes de la destilación. Los matraces se pueden tapar para la destilación en un momento posterior.

9.2.3 Destilación

a) Abra el agua del condensador. Agregue 50 ml de solución de H_3BO_3 con el indicador al matraz de titulación Erlenmeyer graduado de 500 cm^3 y coloque el matraz debajo de la punta del condensador de modo que la punta quede muy por debajo de la superficie de la solución de H_3BO_3 . A la digestión diluida a temperatura ambiente, agregue cuidadosamente 75 cm^3 de NaOH al 50 % por la pared lateral del matraz Kjeldahl sin agitación. El NaOH forma una capa transparente debajo del digerido diluido. Conecte inmediatamente el matraz al bulbo de destilación del condensador. Agitar enérgicamente el matraz para mezclar bien el contenido; calentar hasta que se haya destilado todo el NH_3 (≥ 150 ml destilado; ≥ 200 ml de volumen total).

b) No deje la destilación sin supervisión. El matraz (500 cm^3) puede chocar en este punto. Baje el matraz de dosificación y deje que el líquido drene de la punta del condensador. Apague el calentador de destilación. Titular la solución receptora de H_3BO_3 con solución estándar de HCL 0.1000 M hasta el primer rastro de color rosa. El iluminar la placa de agitación ayudará a visualizar el punto final. Registre cm^3 HCL con una precisión mínima de 0.05 cm^3 .

10 Expresión de los resultados

El contenido de proteínas en la muestra de leche se expresa en porcentaje en masa y se obtiene de acuerdo a las ecuaciones siguientes:

10.1 Verificación de recuperación de nitrógeno

Ejecute recuperaciones de N_2 para verificar la precisión del procedimiento y el equipo.

a) Pérdida de nitrógeno. - Utilizar 0.12 g de sulfato de amonio y 0.85 g de sacarosa por matraz. Agregue todos los demás reactivos como se indica en el apartado 9.1. Digerir y destilar en las mismas condiciones que para una porción de prueba de leche. Las recuperaciones serán de al menos el 99 %.

b) Eficacia de la digestión. - Utilizar 0.16 g de clorhidrato de lisina o 0.18 g de triptófano, con 0.67 g de sacarosa por matraz. Agregue todos los demás reactivos como se indica en 9.1. Digerir y destilar en las mismas condiciones que para una porción de prueba de leche. Las recuperaciones serán de al menos el 98%.

10.2 Cálculos

Calcular los resultados de la siguiente manera:

$$\text{Nitrógeno \%} = \frac{1.4007 \times (V_s - V_b) \times M}{W}$$

Donde V_s y V_b = ml de valorante de HCL utilizado para la porción de prueba y el blanco, respectivamente;

M = molaridad de la solución de HCL y W = peso de la porción de prueba, g.

Multiplique el porcentaje de N_2 por el factor 6.38 para calcular el porcentaje de proteína. Esta es proteína sobre una base de N_2 total.

La diferencia máxima recomendada entre duplicados es 0.03 % de proteína.

Bibliografía

- [1] NORDOM 57 Leche y productos lácteos. Determinación del contenido de proteínas
- [2] NORDOM 56 Leche y productos lácteos. Determinación del contenido de grasa por el método de Gerber
- [3] INEN 16 Norma Ecuatoriana (1ra Edición), Leche. Determinación de proteínas
- [4] ISO FDIS 8968-1, IDF 20-1 Leche y productos lácteos. Determinación del contenido de nitrógeno- Parte 1, Principio Kjeldahl y cálculo de proteína cruda
- [5] INEN 301 (1977-06) Leche en polvo. Determinación de proteína
- [6] Método Oficial AOAC 991.20. Nitrógeno (total) en la leche. Métodos Kjeldahl / Primera edición 1991/ Edición final 1994
- [7] Método Oficial AOAC 925.21. Preparación de la muestra de prueba de leche. Procedimiento