

16 300627  
2ej



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA

Incorporada a la U. N. A. M.

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

**ESTUDIO COMPARATIVO DE METODOS  
ANALITICOS PARA LA DETERMINACION  
DEL GRADO DE HIDROLISIS EN LECHE**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de:

**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

P r e s e n t a:

*Maria Teresa Meyran Camacho*

México, D. F.

1988



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE.

	Pag.
CAPITULO I. INTRODUCCION	1
OBJETIVO	7
CAPITULO II. GENERALIDADES	9
2.1 Leche. Beneficio y Limitaciones	10
2.2 Alimentación de infantes	26
2.3 Carbohidratos de la leche	28
2.4 Digestión de oligosacáridos	32
2.5 Lactasa. Intolerancia a la lactosa	36
2.6 Hidrólisis de la leche	42
CAPITULO III. METODOLOGIA	47
Métodos	48
Diseño Experimental	66
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSION	69
Exactitud y Precisión	76
Diseño Experimental	77
Análisis Económico	82
CAPITULO V. CONCLUSIONES.	83
ANEXOS	86
BIBLIOGRAFIA	92

# I N T R O D U C C I O N

La leche constituye un material único al ser un alimento casi - completo desde el punto de vista de la nutrición. Esta característica es determinante en su utilización por personas de todas las edades y en la - producción a partir de la misma de importantes derivados en la alimenta- ción, tales como queso, mantequilla, etc.

La leche contiene proteínas, lípidos, glúcidos, minerales, vita- minas, etc. Las deficiencias que presenta las constituyen el bajo conteni- do relativo de hierro y cobre, así como en las vitaminas C y D.

Aunque la composición general de la leche es muy semejante en - todos los mamíferos, la concentración de algunos componentes puede variar considerablemente con las distintas especies. ( 3 )

Dentro de los principales carbohidratos que presenta la leche, está la lactosa, siendo un disacárido compuesto por glucosa y galactosa. Desde el punto de vista biológico, la lactosa se distingue de los azúca- res comunes por su estabilidad en el tracto digestivo y por el hecho de - no ser simplemente un glúcido energético. ( 1 )

En general, ningún disacárido puede ser absorbido como tal en - el intestino para poder pasar a la corriente sanguínea, por lo que es -- esencial que la lactosa sea previamente hidrolizada en sus azúcares sim- ples.

La enzima encargada de realizar esta hidrólisis es la "lactasa", beta-galactosidasa, la cual es una glicoproteína que se encuentra en la membrana del borde de cepillo del intestino humano. Una disminución en la actividad de esta enzima conducirá a una hidrólisis ineficiente del carbohidrato, lo cual, en algunas personas produce síntomas de intolerancia como flatulencia, dolor abdominal o diarrea, cuando se consume leche o productos lácteos.

Para poder entender términos, se explicarán a continuación:

**Intolerancia a la lactosa.**

Es el conjunto de síntomas gastrointestinales (flatulencia, meteorismo, dolor abdominal y diarrea), que se derivan de la presencia de carbohidratos no absorbibles en el intestino delgado. Esto es que una dosis determinada de lactosa no ha sido completamente hidrolizada y absorbida en su paso por el intestino.

**Deficiencia de lactasa.**

Es una reducción en la actividad de la beta-galactosidasa intestinal; ésta no involucra una ausencia total de la actividad enzimática y por lo tanto, aún puede persistir la capacidad de digerir dosis pequeñas de lactosa, en proporción a la cantidad residual de lactasa existente. ( 7 )

Cuando no se hidroliza la lactosa, no es absorbida, llegando a la última porción del intestino delgado y del colon, donde los microorganismos presentes al utilizar la lactosa, producen cambios en la microflora intestinal, acompañados muy a menudo de una producción excesiva de gas y ácido, ocasionando desórdenes intestinales como los antes mencionados.

La intolerancia a la lactosa de la leche es un problema de gran importancia, ya que un gran número de niños carecen de la enzima capaz de hidrolizar el carbohidrato.

Estudios realizados en México han determinado que aproximadamente un 70% de la población adulta presentan una mala absorción de lactosa.

Estos estudios han utilizado como índice de absorción de lactosa la prueba de tolerancia a la glucosa, la cual, por su propia naturaleza, requiere del uso de dosis farmacológicas del carbohidrato ( 2 g por kg de peso, hasta 50 g) equivalente a la ingesta de un litro de leche. ( 7)

Aproximadamente un 50% de los pacientes con deficiencia de lactasa, presentan intolerancia a dosis fisiológicas de leche y generalmente este grupo de población disminuye su ingesta de leche y productos lácteos sin presentar cambios de importancia en su estado nutricional, más aún en algunos casos la intolerancia se puede evitar reduciendo la cantidad de leche ingerida.

Con el fin de evitar los problemas que presenta la intolerancia a la leche, diversos grupos de investigadores han realizado estudios comparativos de absorción entre la leche común y la leche hidrolizada, demostrando que con ésta última se logra un consumo adecuado, sin presentar sintomatología y con un buen aprovechamiento de todos los nutrientes de la leche.

Es por ésto que se ha dado énfasis a la hidrólisis enzimática de la lactosa previa al consumo de leche. Se ha demostrado que llevando a cabo una hidrólisis del 70% de la lactosa contenida en la leche, hay una buena aceptación de ésta y no se presentan problemas de intolerancia.

En la actualidad, entre las empresas e instituciones públicas como Liconsa y el Instituto Nacional de la Nutrición, se ha fomentado la investigación en este tema y se han establecido convenios para la producción, primero a nivel piloto y posteriormente en gran escala de leches y fórmulas de leche lactosuero hidrolizadas para ser utilizadas en pacientes con problemas hepático-renales o cardiovasculares o digestivos, así como en personas intolerantes a la lactosa - sin padecimientos adicionales.

A partir de la producción preliminar de leches y fórmulas de leche lactosuero ya hidrolizadas, se ha generado en Liconsa la necesidad de contar con varios métodos para la cuantificación del porcentaje de hidrólisis con la mayor exactitud y precisión posibles, - además de establecer un método, de preferencia el más rápido, fácil

y económico, para que se lleve a cabo en el futuro, y uno o varios de control para confirmación, quedando como referencia para utilizar se cada vez que sea necesario.

O B J E T I V O

Estudiar comparativamente cuatro métodos analíticos para la deter  
minación del porcentaje de hidrólisis de lactosa en una leche hidrolizada.

Seleccionar dentro de los métodos experimentados el más apropiado  
en cuanto a confiabilidad, rapidez y economía para un control industrial -  
en la producción de leche hidrolizada.

**GENERALIDADES**

## 2.1 Leche. Beneficios y limitaciones.

La leche es un líquido segregado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos, tras el nacimiento de la cría. Es un líquido de composición compleja, blanco y opaco, de sabor dulce y reacción iónica cercana a la neutralidad.

La función natural de la leche es la de ser el alimento exclusivo de los mamíferos jóvenes durante el período crítico de su existencia, -- tras el nacimiento, cuando el desarrollo es rápido y no puede ser sustituida por otros alimentos. ( 1 )

La leche de vaca es un alimento popular completo, casi equilibrado, de fácil adquisición en la mayor parte de las zonas de todos los países. Contiene los elementos nutritivos más valiosos para cubrir los requerimientos energéticos necesarios, como son las proteínas de origen animal, glúcidos, lípidos, sales minerales y vitaminas.

La leche no es completamente estéril y está sujeta, como todo producto biológico, a contaminaciones de importancia cuando no se maneja co---rrectamente. Es igualmente un medio de cultivo ideal para un gran número de gérmenes patógenos o saprófitos. También es un producto que se altera muy -fácilmente, especialmente bajo la acción del calor y numerosos microorganismos pueden proliferar en ella, en especial aquellos que degradan la lactosa con producción de ácido, ocasionando la floculación de una parte de las pro

teínas. ( 1, 33 )

La leche representa un alimento importante desde varios puntos de vista:

a. Calidad nutricional. La leche constituye una fuente importante de cuando menos ocho nutrimentos, posee proteínas de alta calidad, y un contenido y biodisponibilidad alta de calcio, riboflavina, niacina, vitamina B<sub>12</sub>, fosfatos y iodo.

b. El sabor de la leche es muy aceptable y sobrepasa, sin lugar a dudas, el sabor de dietas elementales o productos a base de otros alimentos.

c. En el desarrollo de una fórmula para alimentación líquida, un aspecto de vital importancia es la funcionalidad, siendo ésta la capacidad de un ingrediente para interactuar con otros para resultar en una fórmula final. La leche es altamente funcional, siendo estable al calor y capaz de permanecer en solución en presencia de grasa, minerales y agua. ( 7, 16 )

El papel que desempeña la leche en la dieta contemporánea, con la que se intenta proveer un número significativo de Calorías y nutrimentos esenciales, depende de una serie compleja de factores diversos de índole social, económico, cultural, geográfico, etc. ( 11, 27 )

### 2.1.1 La leche.

La leche es una mezcla compleja, tanto por la naturaleza de sus constituyentes como por su estado físico. Cuantitativamente, es el agua el componente más importante que actúa como medio en el cual se encuentran:

- a) Sustancias en estado de dispersión coloidal, tales como micelas de fosfocaseinato cálcico, citratos y fosfatos de Ca y Mg y seroproteínas.
- b) Sustancias en estado de emulsión: lípidos, esteroides y vitaminas liposolubles, en forma de glóbulos rodeados por una membrana de lipoproteínas.
- c) Sustancias en solución verdadera, de bajo peso molecular, unas no ionizables (azúcares, etc.) y otras ionizables (sales, vitaminas hidrosolubles, aminoácidos), que presentan diversos equilibrios de disociación, no sólo entre sí, si no en el sistema coloidal. ( 5, 37 )

De los constituyentes de la leche, algunos se sintetizan en la glándula mamaria, en tanto que otros provienen, directamente, del suero sanguíneo. Independientemente de las variaciones en composición debidas a la especie, y limitándose a la de vaca, la composición de la leche puede variar entre límites bastante amplios, por una serie de factores fisiológicos, genéticos y ambientales, así como la raza, la alimentación, la estación, la lactación y otros factores de menor importancia son la edad, ordeño, etc. ( 37 )

- a) Sustancias en estado de dispersión coloidal.

Dentro de este grupo, las sustancias nitrogenadas forman la parte más compleja de la leche y la peor conocida, tanto respecto a su constitución como a las transformaciones que pueden experimentar, sin embargo, las proteínas --

lúcteos representan una de las mayores contribuciones a la nutrición humana. La dispersión coloidal en la leche es muy estable, incluso a temperaturas y concentraciones extremas; en general, se recupera la dispersión normal después de una congelación o desecación, circunstancia que reviste gran importancia desde el punto de vista de su tecnología.

La caseína es la proteína más abundante de la leche, es un complejo de proteínas específicas que contienen grupos fosfóricos, esterificados en la serina o treonina. Tienen un carácter fuertemente ácido, debido a grupos carboxílicos libres y a los de ácido fosfórico. Se puede definir, de forma simple, como la proteína precipitada por acidificación de la leche desnatada a pH 4.6 y 20°C. Por su alto contenido en aminoácidos esenciales, las caseínas tienen un valor nutritivo de primer orden, para la síntesis de proteínas en el recién nacido, y además, asumen un papel importante en el transporte de minerales.

Las moléculas de caseína se asocian con iones  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , formando estructuras micelares. Por ello, las cantidades de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{PO}_4^{-3}$  que lleva la leche, exceden a las de una solución acuosa saturada.

La micela está formada por una mezcla de proteínas que pueden aislarse por electroforesis y cuya concentración relativa, en la leche de diferentes especies, varía considerablemente. La caseína ha sido separada en cuatro principales componentes:  $\alpha_s$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\kappa$  - caseína, que varían, principalmente en el contenido de fósforo ( 1.0, 0.6, 0.1, 0.2% respectivamente) y en la composición de aminoácidos. En la leche de vaca, la caseína total contiene aproximadamente 60% de la  $\alpha$ , 25% de la  $\beta$ , 5% de la  $\gamma$  y 10-15% de la  $\kappa$  caseína. ( 26, 36, 37 )

En la  $\alpha$  caseína se han identificado cuatro componentes  $\alpha_{s1}$  -

$\alpha_{s2}$ ,  $\alpha_{s3}$ ,  $\alpha_{s4}$  y variantes genéticas, que se designan por letras mayúsculas ( A, B, C, D ). La caseína  $\alpha$  y  $\beta$  son sensibles a la precipitación en presencia de pequeñas cantidades de calcio ionizado, en cambio, la  $K$  caseína, actúa como estabilizante frente al calcio, para las otras caseínas. Además, el contenido de nitrógeno de la  $K$  caseína (14.3%) es inferior al de las otras caseínas (15.6%), ya que es una glicoproteína con tres tipos de glúcidos: galactosa, galactosamina y el ácido siálico.

Cabe hacer mención de que la caseína  $\delta$  tiene una secuencia de aminoácidos muy similar a una parte de la molécula de la  $\beta$  caseína, y por tanto se considera que la caseína  $\delta$  es el resultado de una degradación o una síntesis incompleta de la fracción  $\beta$ . ( 4, 26, 30 )

Las proteínas del suero que permanecen en solución, después que la caseína ha sido separada de la leche, se conocen como proteínas de suero o seroproteínas. La concentración aproximada de las principales seroproteínas de la leche son:  $\beta$ -lactoglobulina 0.4% ;  $\alpha$ -lactoalbúmina 0.1% ; globulina e inmunoglobulina 0.07% y seroalbúmina 0.03%, siendo la  $\beta$ -lactoglobulina la proteína más abundante del suero de la leche. ( 5, 37 )

#### b) Sustancias en estado de emulsión.

Esta fase desempeña un papel muy importante en la estabilidad de los productos lácteos y es el origen de las reacciones de deterioro más comunes.

La grasa de la leche se encuentra dispersa en forma de glóbulos y está compuesta fundamentalmente de triglicéridos. Cada glóbulo de grasa está envuelto por una membrana lipoprotéica que estabiliza la emulsión. En la leche, esta membrana procede del plasmalema de las células secretoras y está formada por las capas típicas de las membranas biológicas. Sus lípidos son, principalmente,

fosfolípidos pero también contiene glicéridos, esteroides, etc.; ésta membrana es alterada por los tratamientos mecánicos.

En el cuadro 1, se muestra la composición de los lípidos en la leche.

Actualmente, se han detectado cerca de 400 ácidos grasos en la grasa de la leche, sin embargo, la mayoría de ellos están presentes en cantidades muy pequeñas. Los ácidos grasos presentes son saturados e insaturados (con uno a cuatro dobles enlaces); la mayor parte de los ácidos saturados contienen un número par de átomos de carbono, desde el butírico al araquídico. La presencia, en la leche, de los ácidos linoleico y linolénico puede ser particularmente interesante, puesto que el cuerpo es incapaz de sintetizarlos, al igual que muchos aminoácidos, y por tanto, son constituyentes esenciales de la dieta. ( 12, 19, 37 )

En cuanto al contenido de las vitaminas liposolubles, se encuentran todas ( A, D, E y K ), pero la cantidad de ellas depende de la alimentación en el caso de la A, de las radiaciones solares para la D, y la E y K sólo se encuentran en estado de trazas. ( 5, 37 )

### c) Sustancias en solución verdadera.

Esta fase puede considerarse como formada por el conjunto de sustancias disueltas en el agua, de bajo peso molecular, principalmente la lactosa y las sales.

La fase hídrica, reducida a la solución de moléculas pequeñas, tiene una propiedad importante: la constancia de su composición molecular, ésto es que la cantidad total de moléculas no disociadas y de iones en la unidad de volumen, varía muy poco. ( 1 )

La lactosa es el único azúcar que se encuentra en la leche en cantidad

## Cuadro 1.

## Composición de los lípidos de la leche.

Lípido	Peso ( % )
Triglicéridos	97 - 98
Diglicéridos	0.28 - 0.59
Monoglicéridos	0.016 - 0.038
Ácidos grasos libres	0.10 - 0.44
Esteroles libres	0.22 - 0.41
Fosfolípidos	0.1 - 1.0
Esteres de esteroles	trazas
Hidrocarburos	trazas
Vitaminas liposolubles	0.0007 - 0.0085

importante; otros azúcares presentes en baja concentración, son la glucosa y galactosa. También se encuentran en la leche diversos derivados fosforados de la glucosa, galactosa, fructuosa y lactosa, en concentraciones que oscilan de 1 a 65  $\mu\text{g/ml}$ , y oligosacáridos que, por hidrólisis, liberan galactosa, manosa, ácido neuramínico y acetilglucosamina. ( 5 )

El contenido de lactosa de la leche varía bastante con la especie, siendo el de más alto valor el de la mujer; por ésto, en la práctica, a la leche de vaca, se añaden azúcares cuando se usa en la alimentación infantil. La lactosa tiene un poder edulcorante de 1/5 de la sacarosa.

Dentro de este grupo, la leche contiene alrededor de 1% de sales, constituidas por cationes metálicos y aniones orgánicos e inorgánicos. El contenido en cenizas es del orden del 0.7% y los elementos más abundantes en ellas son: Na, K, Ca, Mg, P, Cl y S.

De los aniones orgánicos el más abundante es el citrato. De los constituyentes mayoritarios son particularmente importantes el Ca y P, tanto desde el punto de vista nutritivo como por su papel en el estado físico y estabilidad de las caseínas.

Además de los elementos citados están presentes otros metales en muy pequeñas cantidades. De ellos, algunos están unidos a fracciones proteicas o en la superficie de los glóbulos de grasa y en su contenido es bastante constante, en tanto que otros se encuentran en la fase acuosa y su nivel varía con la cantidad ingerida en la dieta. Los elementos que se encuentran en la leche son aluminio, boro, bromo, cobre, cromo, iodo, flúor, fierro, manganeso, zinc, trazas de arsénico, cobalto y plomo.

La leche es una fuente importante de vitaminas para el hombre. Las vita

minas hidrosolubles proceden, en parte, del forraje, pero en su mayoría, son sintetizadas por las bacterias del rumen y su cantidad varía poco. La leche contiene la mayoría de las vitaminas A, D, E, K, tiamina, riboflavina, ácido pantoténico, ácido nicotínico, biotina, vitamina B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, ácido fólico, colina y vitamina C. ( 5, 37 )

La leche normal contiene gran número de enzimas como aldosas, amilasas, catalasas, esterasas, fosfatasas, galactasas, lipasas, lactoperoxidasas, proteasas, ribonucleasas, xantina-oxidasa. La mayor parte de ellas se caracterizan por un elevado grado de especificidad. Aparentemente son constituyentes de la glándula mamaria que pasan a la leche, accidental o inevitablemente, durante el proceso de secreción.

Desde el punto de vista tecnológico, destacan las lipasas por la producción de alteraciones hidrolíticas y las proteasas que provocan la hidrólisis de la caseína. Hay una lipasa unida a la membrana de los glóbulos de grasa y otra dispersa en el suero. Cuando, por tratamientos mecánicos, se desintegran los glóbulos, se favorece la lipólisis.

Por otro lado, la labilidad al calor de ciertas enzimas proporciona la base para pruebas analíticas, que determinan si una muestra de leche ha sido o no sometida a un tratamiento térmico.

La leche contiene gases disueltos como el O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, y CO<sub>2</sub> en proporción que depende del tratamiento. El N<sub>2</sub> es un componente inerte en tanto que el O<sub>2</sub> tiene un efecto desfavorable, por producir enranciamiento oxidativo y pérdida de vitamina C. El CO<sub>2</sub> está en equilibrio carbónico-bicarbonato, en relación con el pH. ( 37 )

#### A. El agua de la leche.

El agua constituye la fase continua de la leche y es el medio de soporte para sus componentes sólidos y gaseosos, encontrándose en dos estados:

- a) Agua libre (intersticial). Representa la mayor parte del agua y en ésta se mantiene en solución la lactosa y las sales. Es ésta el agua que sale de la cuajada en forma de suero.
- b) Agua de enlace. Esta agua es el elemento de cohesión de los diversos componentes no solubles y es absorbida a la superficie de estos compuestos; no forma parte de la fase hídrica de la leche y es más difícil de eliminar que el agua libre. ( 22 )

#### B. Propiedades Físicas.

- Aspecto. La coloración de una leche fresca es blanca, ya que las grasas emulsionadas y las proteínas coloidales dispersan la luz incidente y dan a la leche este color característico. Cuando la leche es muy rica en grasa, presenta una coloración crema, debida en parte al caroteno contenido en la grasa.
- Olor La leche fresca casi no tiene un olor característico, pero debido a la presencia de la grasa, la leche conserva con mucha facilidad los olores del ambiente o de los recipientes en los que se le guarda.
- Sabor. La leche fresca y limpia tiene un sabor dulce y neutro por la lactosa que contiene, y adquiere, por contacto, fácilmente sabores a ensilaje, - establo, hierba, etc. ( 21, 22 )

## B. Propiedades Fisico-Químicas.

1. Densidad. Es la gravedad específica de la leche y es igual al peso en kilogramos de un litro de leche a una temperatura de 15°C. La gravedad específica generalmente se expresa en grados de densidad, fluctuando estos valores de 1.028 a 1.034, con un promedio de 1.031/32. Cuando se determina la densidad de la leche, el valor observado en el lactodensímetro debe corregirse con base a una temperatura de 15°C, agregándose o sustrayéndose el factor 0.0002 por cada grado centígrado registrado arriba o abajo de la temperatura mencionada.
2. pH. En general, la leche tiene una reacción iónica cercana a la neutralidad. Tiene una reacción débilmente ácida, con un pH comprendido entre 6.6 y 6.8 como consecuencia de la presencia de caseína y de los aniones fosfórico y cítrico principalmente. Además el pH no es un valor constante, sino que puede variar y depende, generalmente, del estado sanitario de la glándula mamaria, de la cantidad de CO<sub>2</sub> disuelto en la leche, del desarrollo de los microorganismos que promueven la producción de ácido láctico, etc. ( 1, 21 )
3. Acidez. La acidez presentada por la leche-cruda a la valoración empleada es la resultante de cuatro reacciones, de las cuales las tres primeras representan la acidez natural.
  - Acidez natural.
    - a) Acidez de la caseína anfotérica cerca de 2/5 de la acidez natural.
    - b) Acidez de las sustancias minerales, CO<sub>2</sub> y ácidos orgánicos originales, - cerca de 2/5 de la acidez natural.
    - c) Reacciones secundarias de los fosfatos, cerca de 1/5 de la acidez natural.

- Acidez desarrollada.

Esta es debida a la formación de ácido láctico a partir de lactosa por intervención de bacterias contaminantes; generalmente una leche fresca posee una acidez de 0.15% a 0.16%. Los valores menores de 0.15 pueden ser debidos a leches mastísticas, aguadas, o bien alteradas con algún producto químico alcalinizante. Los porcentajes mayores de 0.16 son indicadores de contaminantes bacterianos.

4. Viscosidad. La leche es un líquido más viscoso que el agua; ésta viscosidad es debida a la materia grasa en emulsión y a las proteínas de la fase coloidal. - Esta varía entre 1.7 y 2.2 centipoises.
5. Punto de congelación. Una de las características más constantes de la leche es el punto de congelación que, en general, tiene como valor promedio  $-0.539^{\circ}\text{C}$ . - Esta propiedad permite utilizarla para detectar la adición de agua, ya que ésta, al congelarse a  $0^{\circ}\text{C}$ , influye para que el valor del punto de congelación de la leche se aproxime al del agua. Las sales y la lactosa son los componentes de la leche que, por encontrarse en solución viscosa, influyen sobre esta propie--dad. El resto de componentes no influye. La acidez induce a una baja del punto de congelación.
6. Calor específico. El calor específico de la leche es el número de calorías necesarias para elevar  $1^{\circ}\text{C}$  la temperatura de la unidad de peso de la leche. Este valor es más elevado que el del agua.
7. Punto de ebullición. La temperatura de ebullición se inicia a los  $100.17^{\circ}\text{C}$  al - nivel del mar, sin embargo, puede inducirse este fenómeno a menor temperatura - con sólo disminuir la presión del líquido, práctica que se aplica en la elaboración de leches concentradas al evaporar.

8. Índice de refracción. Es el valor que expresa el ángulo de desviación de la luz al pasar del aire a la leche. Este valor fluctúa entre 1.3440 y 1.3485, y es el resultante de la combinación de los índices de refracción de todos los componentes de la fase discontinua (solutos) y continúa (agua) de la leche. - Cuando la proporción normal entre solutos y solvente se altera, por la adición de agua o sólidos extraños, el índice de refracción disminuye o aumenta respectivamente. ( 1, 21, 22 )

#### D. Valor Nutritivo de la Leche.

En el aspecto nutritivo, la leche se define, frecuentemente, como el alimento más completo, en efecto, suministra más nutrientes esenciales que cualquier otro. Es una buena fuente de Ca, P, vitamina B<sub>12</sub> y de proteínas de alta calidad, y contribuye, en gran medida a las necesidades de vitamina A y B<sub>1</sub>; sin embargo, es pobre en Fe, Cu, vitamina C y ácido nicotínico.

La leche es un alimento básico que proporciona la naturaleza para satisfacer las necesidades y requerimientos alimenticios del recién nacido y con un importante papel en la dieta del adolescente y del adulto, hasta el punto de que puede servir como casi única fuente de alimentación.

La grasa de la leche sirve como fuente de energía, pero además, como portador de vitaminas liposolubles. El valor alimenticio de las proteínas depende de su composición en aminoácidos y de su digestibilidad. La leche contiene todos los aminoácidos esenciales para el hombre, cubriendo todas sus necesidades, es por ésto, que debido a su alta calidad de la proteína, que se considera como una proteína patrón. Quadro A.

Cuadro A. Composición de aminoácidos en la leche.

Aminoácido (g/100 g de proteína)	leche de vaca cruda	leche en polvo
Leucina	9.53	9.90
Valina	5.79	6.43
Isoleucina	4.72	5.28
Alanina	3.47	3.42
Glicina	1.96	1.98
Serina	5.79	5.71
Treonina	4.44	4.20
Fenilalanina	5.37	4.84
Tirosina	4.75	4.97
Triptofano	1.4	1.2
Total aminoácidos aromáticos	10.12	9.82
Metionina	2.51	2.57
Cistina	0.81	0.94
Total aminoácidos azufrados	3.32	3.52
Acido glutámico	22.24	20.89
Acido aspártico	7.69	7.82
Lisina	7.79	7.24
Arginina	3.28	3.40
Histidina	2.67	2.86
Prólina	9.13	11.76
Total aminoácidos esenciales	47.15	47.84
Total de aminoácidos	103.40	105.71

La calidad de su proteína, unida al contenido en grasa, vitaminas y otras sustancias, equilibradas para su asimilación, hacen que la leche se considere generalmente, como un alimento completo. ( 27, 37 )

Esto se puede apreciar en el cuadro B.

Quadro B. Composición media de la leche de algunas especies, dedicadas al consumo humano.

Especie	Sólidos totales	Grasa	Lactosa	Proteínas	Caseína	Cenizas
Vaca	11 - 13	3.4-3.6	4.6-4.7	3.4-3.6	2.50	0.7-0.8
Búfala	16 - 22	6-9	4.7-4.9	4.4-4.8	3.90	0.8-0.85
Oveja	18 - 21	5-7	4.5-5.0	5.6-6.0	4.50	0.9-1.0
Cabra	11 - 17	4.3-4.4	4.3-4.7	4.0-4.2	3.00	0.8
Mujer	12 - 13	3.3	6.6	1.4	0.85	0.23

( 37 )

## 2.2 Alimentación de Infantes.

El grupo más vulnerable de la desnutrición es el de los niños y desde hace algunos años en el campo de la nutrición se ha considerado que la mortalidad de los niños es el mejor indicador de los problemas nutricionales de un grupo humano. En una población subdesarrollada, los niños mueren principalmente por enfermedades diarréicas, bronconeumonía, sarampión y tosferina que son padecimientos que se agravan y causan la muerte, sobre to do cuando previamente existe una mala nutrición, además de que la desnutrición misma causa muchas muertes. ( 6 )

La leche constituye generalmente el principal o el único alimento durante la infancia. La utilización eficiente de los nutrimentos de la leche depende en gran parte de la habilidad para digerir y absorber el carbohidrato lactosa en la leche. La deficiencia secundaria de lactasa debido a la presencia de diarrea infecciosa, desnutrición energético-proteica u otra enfermedad tóxica o inflamatoria que afecta la membrana intestinal, -- constituye un fenómeno temporal que puede ocurrir a cualquier edad y en -- cualquier grupo de población en los que la enfermedad se presenta.

La causa más frecuente de intolerancia secundaria del carbohidrato es aquella adquirida durante episodios de diarrea en la infancia. El mecanismo de la mala absorción puede estar directamente relacionado a la patógenesis de la diarrea o a las complicaciones de ésta como deshidratación o shock. Al mismo tiempo la severidad y frecuencia de estos problemas están -

directamente asociados con el grado de mala absorción del carbohidrato y con la dosis del mismo. La duración de la diarrea puede estar más bien relacionada con la intolerancia al carbohidrato que con el agente primario - que produjo la enfermedad inicial, por ejemplo, la diarrea en gastroenteritis aguda puede permanecer mientras la lactosa está presente en la dieta, cuando este carbohidrato se elimina de la dieta ocurre, en la mayoría de los casos una recuperación rápida. De hecho, una dieta libre de lactosa -- comparada con una dieta basada en leche de vaca, puede disminuir la duración y severidad de la diarrea.

El estado nutricional, en general del infante, puede estar profundamente afectado por la intolerancia al carbohidrato. Aún cuando la dieta es ligera, la presencia de intolerancia a la lactosa está asociada con una pérdida de peso marcada. El 50% de las calorías totales de un infante son obtenidas en forma de carbohidratos. Por lo tanto, pérdidas de carbohidratos pueden producir un déficit importante en la dieta.

La presencia de carbohidratos en el lumen intestinal, producen pérdidas de nitrógeno y grasas, además de que puede producir una dilución en la concentración de ácidos biliares por debajo del nivel micelar crítico, requerido para una absorción eficiente de grasas. Por mucho tiempo se ha reconocido una asociación entre deficiencia de disacáridos, intolerancia a los carbohidratos y estorrea. ( 7 ,31 )

### 2.3 Carbohidratos de la leche.

La leche contiene glúcidos libres, dializables y glúcidos combinados con las glicoproteínas no dializables. Desde el punto de vista químico se dividen en :

- a. Glúcidos neutros: lactosa y polióxidos que contienen lactosa y fucosa, pueden encontrarse libres o combinados.
- b. Glúcidos nitrogenados: glucosamina N-acetilada y galactosamina N-acetilada, se encuentran siempre ligados a glúcidos neutros.
- c. Glúcidos ácidos: ácido siálico, ligados siempre a glúcidos neutros o nitrogenados.

#### Lactosa.

La lactosa es el único glúcido neutro libre que existe en cantidad importante en todas las leches, es el componente más abundante, el más simple y el más constante en proporción. Se sintetiza en la mama a partir de la glucosa sanguínea, y en los rumiantes, a partir de ácidos volátiles. En la leche de vaca, el contenido de lactosa varía poco, entre 48 y 50 g/l.

Para los seres humanos y para numerosos animales, la lactosa es, prácticamente, la única fuente de galactosa.

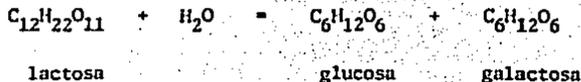
La lactosa es el factor que limita la producción de leche, es decir, que la cantidad de leche producida depende de las posibilidades de sin

tesis de la lactosa en la mama (es el elemento soluble más abundante y su actividad osmótica es mucho más elevada que la de los otros componentes).

La lactosa es una hexobiosa y está constituido por una molécula de glucosa y una de galactosa (fig. 3.1), unidas por un enlace glucosídico beta-(1-4) . El carbono anomérico de la glucosa está libre, lo cual hace a la lactosa un azúcar reductor. Existe en forma alfa y beta, y por lo tanto presenta el fenómeno de mutarrotación. ( 1 , 38)

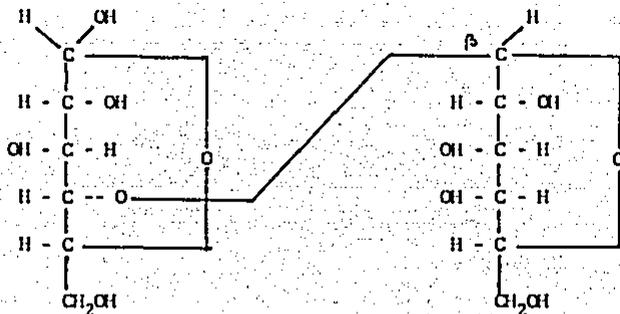
Al ser un azúcar reductor, forma osazonas, una cianhidrina y una oxina, y se descompone por los álcalis. Reduce especialmente al licor cupro-alcalino de Fehling. El poder reductor de la lactosa es considerablemente más débil que el de la glucosa. Si se hidroliza la lactosa, el poder reductor aumenta considerablemente. ( x 1.37). (34 )

Su hidrólisis es bastante difícil, es un azúcar que presenta una cierta estabilidad frente a los agentes químicos; se precisa la acción de los ácidos en caliente para desdoblarla:



Esta hidrólisis es la primera fase de la fermentación láctica, pero no todas las bacterias son aptas para realizarla a partir de la lactosa.

Fig. 3.1 Configuración de la lactosa.

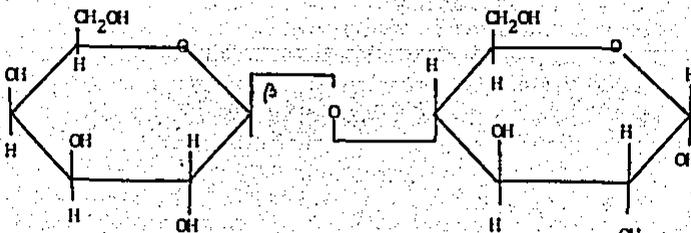


grupo D-glucopiranososa

grupo beta-D-galactopiranosil

4-O-beta-D-galactopiranosil-D-glucopiranososa

lactosa (forma alfa)



( 34 )

La lactosa es el componente soluble más abundante de la leche y constituye la parte esencial del extracto seco de los sueros. En las transformaciones experimentadas por la leche, la lactosa se encuentra siempre - en la parte acuosa: leche desnatada (tras la separación de la crema), maza da o "babeurre" (tras la separación de la materia grasa de la crema), suero (tras la separación de la cuajada de caseína y materia grasa de queso-ría). ( 1 )

Aislada la leche, la lactosa tiene varias aplicaciones, ya sea formando parte de productos dietéticos, como soporte y diluyente de diversas drogas en farmacia, y como componente de los medios de cultivo de --- mohos y actinomicos en la industria de los antibióticos.

Los jarabes de lactosa hidrolizada tienen aún poca demanda, pero ofrecen posibilidades para una mejor utilización de este azúcar.

También la lactosa se utiliza en la industria de los alimentos - por su poder adsorbente como agente base para retener sabores artificiales, aromas y colores, y al igual que la maltosa se emplea en la panificación - ya que puede fácilmente interaccionar con proteínas y producir pigmentos a través de las reacciones de Maillard. ( 5 , 38)

## 2.4 Digestión de Oligosacáridos.

Sólo una pequeña parte del alimento que ingerimos se halla en forma adecuada para su absorción en la sangre o en el sistema linfático. Así, sustancias como el agua, sales minerales no combinadas, y vitaminas no combinadas, tal vez no necesiten acción digestiva antes de su absorción, pero el mayor volumen de nuestro alimento ha de experimentar profundos cambios químicos para que las moléculas resultantes de estos cambios puedan ser absorbidos.

Las proteínas y los productos de su desdoblamiento han de ser hidrolizados a aminoácidos; los oligosacáridos y polisacáridos a azúcares hexosos, y las grasas a ácidos grasos y glicerol, al menos en parte. Otros lípidos son también hidrolizados a moléculas de productos más pequeños.

Aunque en el alimento se ingiere diversos carbohidratos, como almidón o fécula, dextrinas, sacarosa y lactosa o azúcar de leche, todas estas sustancias se convierten finalmente en el azúcar simple, glucosa, que es el carbohidrato primario utilizado por los tejidos corporales. La glucosa es el azúcar de la sangre y de otros líquidos del cuerpo.

Por digestión, se entiende el conjunto de las muchas reacciones y los muchos procesos enzimáticos causantes de estos cambios.

El factor más importante para la digestión de los alimentos es la acción de las enzimas y otros componentes específicos de los jugos digestivos. Las enzimas y otros compuestos importantes en la digestión son segregados por diversas glándulas. ( 34 )

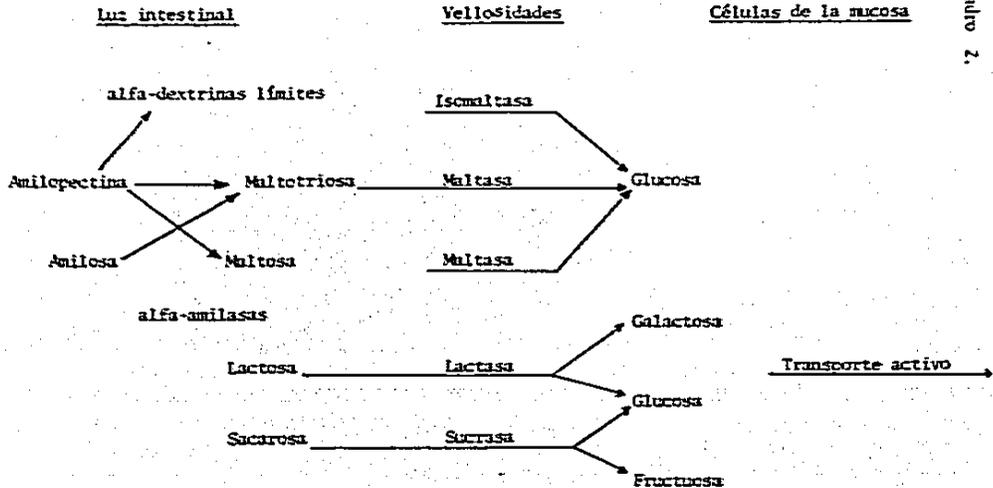
La mucosa del tracto gastrointestinal actúa como una auténtica barrera que impide la entrada en el cuerpo de grandes moléculas que si se absorbieran no podrían ser bien utilizadas. La digestión es la suma de la hidrólisis enzimática de las macromoléculas a compuestos más pequeños que pueden ser absorbidos y posteriormente metabolizados.

En el intestino delgado se completa la digestión de los disacáridos ingeridos con los alimentos y la de los formados por la acción de la alfa-amilasa. Esta actividad se hace patente a final del duodeno llegando a ser máxima en el yeyuno y continuando en el principio del ileon. Sin embargo, la hidrólisis de los disacáridos no se produce en el lumen intestinal, sino en las células de la mucosa. Cuadro 2.

El epitelio contiene tres enzimas con actividad beta-galactosidasa:

- beta-galactosidasa con pH óptimo de 4.5
- heterogalactosidasa que digiere oligosacáridos de composición diversa con enlaces beta-galactósido
- y una verdadera lactasa

Esquema de la digestión y absorción de los glúcidos.



Cuadro 2.

En la mayoría de los mamíferos, la actividad de la lactasa se limita durante el período de lactancia, y desaparece durante el destete. - En el máximo, la actividad de la lactasa humana, corresponde a un 10 a 15% de la actividad de la maltasa (100%). Una actividad lactásica insuficiente puede ocasionar, en niños lactantes, problemas graves. Si a un niño se le mantiene el pecho por un período prolongado, la lactosa ingerida puede alcanzar niveles de 30 a 40 g/día, lo que excede su capacidad lactásica.

La lactosa no digerida es infructuosa para el niño y puede, - en lugar de mantener el crecimiento, producir efectos perjudiciales sobre la flora intestinal. ( 35)

## 2.5 Lactasa e Intolerancia a la lactosa.

Una enzima es una proteína de origen natural que cataliza reacciones biológicas con un cierto grado de especificidad; en su ausencia, la mayoría de las reacciones químicas en las células biológicamente activas - tardarían mucho tiempo o simplemente no se efectuarían.

Al hablar de enzimas relacionadas con alimentos es necesario hacer una distinción entre las enzimas naturales y las que son añadidas - para lograr una modificación en el producto final; ambos grupos desempeñan un papel muy importante en las propiedades de cada alimento.

La lactasa pertenece al grupo de las Hidrolasas, y como su nombre lo indica, su acción consiste en hidrolizar diferentes enlaces químicos con la introducción de una molécula de agua. Dentro de este grupo es tán las lipasas, las proteasas, carbohidrasas, fosfatasas, etc., lo que in dica que hidrolizan enlaces en lípidos, proteínas, carbohidratos y fosfatos respectivamente. ( 5 )

En el hombre la lactasa aparece en el intestino delgado al fi nal del primer semestre de gestación y alcanza su actividad máxima al momento del nacimiento. Este nivel de actividad permanece durante la niñez y en aproximadamente un 70% de la población mundial disminuye hasta un 5 a 10% antes de los 6 o 7 años de edad y en algunos casos hasta los 14 o 15 años. ( 5 , 7 )

La lactasa hidroliza a la lactosa en los monosacáridos, glucosa y galactosa, lo que trae como consecuencia algunas ventajas en la elaboración de productos lácteos: se hace accesible la leche a la población con problemas de intolerancia a la lactosa; los productos de la hidrólisis presentan mayor solubilidad que la lactosa, evitándose así los problemas asociados con la cristalización. Dichos productos tienen además un poder endulzante mayor que el de la lactosa, con lo cual se aceleran los procesos fermentativos. Mediante este proceso se amplían las posibilidades de aprovechar el suero de la leche.

En los adultos existe una marcada deficiencia para la asimilación de la lactosa por carencias de lactasa en su aparato digestivo, lo que generalmente ocasiona trastornos gastrointestinales como la intolerancia.

La intolerancia a la lactosa es muy común y en una proporción alta en algunas poblaciones y tribus negras del África; de igual manera presentan este mismo problema, las poblaciones de Japón, China, Grecia, etc.

( 8 , 15 , 29 , 38 )

En México, el 75% de la población mayor de seis años es intolerante a la lactosa. En general, la actividad de la lactasa intestinal en humanos se pierde entre los dos y cuatro años de edad, sin embargo, la desnutrición, las enfermedades gastrointestinales y algunos otros factores, pueden ser causas de pérdidas prematuras de lactasa intestinal. Por estas razones en algunos países se fabrican productos lácteos con lactosa hidrolizada. ( 7 )

Esta forma de deficiencia de lactasa es heredada en forma autosómica recesiva y por lo tanto es de etiología primaria. Existen situaciones especiales que derivan a una deficiencia de lactasa secundaria a algún padecimiento.

- Deficiencia de lactasa.

La intolerancia a la lactosa, el azúcar de la leche, puede ser atribuido a una deficiencia de lactasa. El síndrome no se debe confundir con la intolerancia a la leche resultante de una sensibilización a las proteínas lácteas, por lo general a la beta-lactoglobulina de la leche.

Hay tres tipos de deficiencia a la lactasa:

1. Deficiencia hereditaria a la lactasa.

En este síndrome, relativamente raro, los síntomas de intolerancia a la leche como la diarrea y la emaciación, concomitantes a trastornos en los líquidos y electrolitos así como a una nutrición inadecuada, aparecen muy pronto después del nacimiento. La exclusión de la leche y la alimentación con dieta exenta de lactosa, da por resultado la desaparición de los síntomas y el niño afectado comienza a crecer. Ocasionalmente se reporta que algunos lactantes que parecían ser capaces de digerir y absorber la lactosa, de todas maneras presentaron síntomas muy graves después de la ingestión de la leche o lactosa. La aparición de lactosa en la orina era un carácter prominente de este síndrome extraño, que parecía ser atribuible a un efecto tóxico directo de la lactosa sobre el intestino. La exclusión inmediata de la leche es esencial. ( 7, 17 )

## 2. Actividad baja primaria de la lactasa.

Esto es un síndrome relativamente común, en particular entre las poblaciones no blancas de Estados Unidos, Australia, así como de otras partes del mundo. Puesto que la intolerancia a la lactosa no es un carácter de la primera etapa de la vida de los adultos con este padecimiento, se presume que representa un decaimiento gradual de la actividad de la lactasa en los individuos susceptibles a medida que van entrando en edad.

Los signos y síntomas de la intolerancia a la lactosa son los mismos in dependientemente de la causa. Estos incluyen calambres abdominales, diarrea y flatulencia o eructos. Son atribuidos a los resultados del acumulo de -- lactosa dentro de la luz intestinal. El azúcar es osmóticamente activo, de manera que retiene agua dentro de la luz y la acción fermentativa de las - bacterias intestinales sobre el carbohidrato, producen gases y otros productos que sirven como irritantes intestinales. Cuando se suprimen los ali mentos que contienen lactosa, se produce un pronto alivio, así como preven ción de la recurrencia de los síntomas; en la mayor parte de los pacientes con actividad baja primaria de la lactasa, no es necesario eliminar la leche totalmente. Puede suceder que después de un período de tiempo aparezca la tolerancia. En vista de las excelentes cualidades de la leche como nu- trimento, particularmente en las poblaciones en las que pueden prevalecer los bájos niveles de lactasa, parece deseable intentar establecer qué nive les de ingestión de leche pueden ser tolerados administrándola en cantida- des gradualmente crecientes. ( 7 , 31)

### 3. Actividad baja secundaria de la lactasa.

Debido a que la ingestión de la lactosa está limitada aún en los individuos normales, la intolerancia a la leche no es infrecuente como consecuencia de las enfermedades intestinales. Estas incluyen muchos padecimientos gastrointestinales que predominan en países tropicales, así como en los no tropicales. Ejemplos son, el "esprue tropical" y no tropical (deficiencia del ácido fólico, que trae como consecuencia una mala absorción a nivel intestinal); el kwashiorkor (síndrome producido por una dieta deficiente en proteínas animales); la colitis y la gastroenteritis. El trastorno también se puede observar después de las intervenciones quirúrgicas para eliminar la úlcera péptica, en cirugía de "bypass" o en "resección" del intestino delgado. ( 7 ,17 )

Mala absorción de lactosa es una determinación objetiva, mediante pruebas de laboratorio, de que una dosis determinada de lactosa no ha sido completamente hidrolizada y absorbida en su paso por el intestino delgado.

La eficiencia en la digestión de lactosa va a depender principalmente de la cantidad que llega al intestino y la magnitud de los síntomas debido a su digestión incompleta, dependerá de la cantidad que escapa al colon.

De esta manera la respuesta biológica y sintomática a dosis pequeñas (fisiológicas) de lactosa, puede ser muy variable, resultando en que no todos los individuos deficientes de lactasa presentan mala absorción y no todos los casos de mala absorción resultan en intolerancia a la lactosa. ( 7 )

## 2.6 Hidrólisis de la leche.

La hidrólisis es la descomposición de un producto por adición de agua. El producto de la hidrólisis, por ejemplo, el hidrolizado de proteínas es una mezcla de los aminoácidos constituyentes, formados al romperse la molécula de proteína por reacción de ácidos, álcalis o enzimas.

( 5 )

Así, los materiales proteícos se hidrolizan hasta aminoácidos; los polisacáridos se escinden hidrolíticamente hasta monosacáridos; los ésteres, en especial las grasas y los aceites, pueden saponificarse obteniendo el ácido graso y el alcohol de cuya condensación derivan. (27)

La industria utiliza diferentes enzimas comerciales para la manufactura o el procesamiento de un gran número de alimentos y la tendencia actual en la producción, tanto de alimentos como de materias primas para su elaboración, es de emplearlas en forma más continua. Las ventajas son las siguientes:

- a. Son de origen natural y por lo tanto no son tóxicas.
- b. Son muy específicas en su forma de acción, por lo que efectúan reacciones que de otra manera serían difíciles.
- c. Funcionan en condiciones moderadas de temperatura y pH, por lo que no se requieren condiciones drásticas que puedan alterar la naturaleza del alimento, ni equipo muy costoso.
- d. Actúan a bajas concentraciones y su velocidad de reacción puede ser

controlada al ajustar el pH, la temperatura y la concentración de la enzima.

- c. Son fácilmente inactivadas después de haber alcanzado el cambio deseado.

Las limitaciones para usarlas son su alto costo y su disponibilidad a nivel industrial; sin embargo, continuamente hay innovaciones en este campo y cada día son más accesibles.

Puesto que el control microbiológico del alimento es muy importante, la enzima se usa normalmente fuera de su intervalo óptimo de temperatura; la concentración del sustrato es la existente y no se puede modificar de manera sencilla. En general, el alimento no se ajusta a las condiciones óptimas de actividad de su enzima; lo más importante en una empresa es determinar si la enzima modifica el alimento favorablemente a un costo razonable en las condiciones que prevalecen.

La fuente más común de enzimas comerciales son los microorganismos, cuadro 3. , aunque también hay enzimas que provienen de tejidos vegetales y animales que se extraen con diferentes solventes. Las enzimas microbianas presentan más ventajas ya que los microorganismos pueden crecer rápidamente en diferentes condiciones, de manera que es posible la producción de muchas enzimas en grandes cantidades.

## Cuadro 3.

## Fuentes comerciales de preparaciones enzimáticas.

Fuente	Enzima
HONGO	
<u>Aspergillus oryzae</u>	alfa-amilasa, proteasa
<u>Aspergillus niger</u>	alfa-amilasa, celulasa, pectinasa, glucosa oxidasa, catalasa, lipasa, proteasa, antocianasa, hemicelulasa, glucoamilasa
<u>Mucor michei</u>	sustituto de renina
BACTERIA	
<u>Bacillus subtilis</u>	alfa-amilasa, proteasa
<u>Micrococcus lysodeikticus</u>	catalasa
LEVADURA	
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	invertasa
<u>Saccharomyces fragilis</u>	lactasa
<u>Saccharomyces carisbergensis</u>	invertasa
VEGETAL	
Cebada	alfa y beta-amilasa
Papa	beta-amilasa
Papaya	papaína
Piña	bromelina
ANIMAL	
Páncreas bovino	tripsina, quimotripsina, lipasa
Mucosa intestinal porcina	pepsina
Quarto estómago de becerros	renina
Hígado de res	catalasa

En el cuadro 4 se muestran algunos usos de las enzimas más comerciales.

La hidrólisis de la lactosa produce una mezcla equimolecular de glucosa y galactosa, más dulce que el propio disacárido; la beta-galactosidasa del Saccharomyces fragilis se ha usado *ampliamente* para hidrolizar la lactosa de la leche y el suero, de manera que el suero hidrolizado se utiliza en la manufactura de varios productos alimenticios, puesto que las proteínas que contiene son de muy buena calidad. Es también utilizado en leches hidrolizadas para niños y adultos con problemas de intolerancia a la lactosa, así como para la elaboración de yogurt, helados o leche en polvo para ser incorporada a otros alimentos. La lactasa se usa para controlar la cristalización de la lactosa en helados y así evitar su arenosidad. ( 5, 32 )

Por otra parte, se ha demostrado que el yogurt (sin leche hidrolizada) ayuda a mejorar la digestión de la lactosa en personas con intolerancia, disminuyendo los síntomas o sin presentarlos; ésto se debe a que este producto posee una actividad lactásica propia por la adición de microorganismos para su fermentación, ya que estos microorganismos -- pueden autodigerir la lactosa. ( 28 )

Quadro 4.

Usos de enzimas comerciales en la industria alimentaria.

Enzima	Alimento	Forma de acción
Alfa-amilasa	Pan	Produce hidrólisis del almidón. Aumenta el contenido de azúcares para la fermentación microbiana.
	Cereales	Conversión de almidón a dextrinas y azúcares.
	Cerveza	Conversión de almidón a maltosa para una fermentación subsecuente.
Celulasa	Café	Hidrólisis de celulosa a glucosa durante el secado del café.
Invertasa	Azúcar	Conversión de sacarosa a glucosa y fructuosa en confitería.
Lactasa	Leche	Conversión de lactosa a galactosa y glucosa en productos lácteos.
Lipasa	Queso	Maduración y desarrollo de sabor en quesos.
Proteasa	Queso	Coagulación de la caseína y producción de sabor.
	Carnes	Ablandador de carnes.
Catalasa	Leche	Destrucción de $H_2O_2$ en leche pasteurizada en frío.
Glucosa oxidasa	Huevos	Elimina glucosa en la deshidratación de huevos.
Glucosa isomerasa	Jarabes	Producción de fructuosa a partir de glucosa.
Pectinasa	Frutos y vinos	Clarifican jugos de frutas y vinos. Degradan la pulpa y facilitan la extracción del jugo de las frutas.



M E T O D O L O G I A

## MÉTODOS.

Para este estudio se utilizaron leches hidrolizadas en polvo elaboradas por Leche Industrializada Conasupo (LICONSA), las cuales son:

1. Leche descremada en polvo al 50% de hidrólisis. (LDP 50% H)
2. Leche descremada en polvo al 75% de hidrólisis. (LDP 75% H)
3. Leche entera en polvo al 50% de hidrólisis. (LEP 50% H)
4. Leche entera en polvo al 80% de hidrólisis. (LEP 80% H)

El proceso por el que pasan estas leches en Liconsa es:

a) Para leche descremada.

La leche se hidroliza a cualquier temperatura entre 4 y 40°C, a una cantidad de enzima dada, a mayor temperatura, menor es el tiempo de hidrólisis; así mismo, a un período dado de tiempo, a mayor temperatura, menor es la cantidad de enzima requerida para obtener el grado de hidrólisis deseado.

En vista de que debe evitarse en lo posible la contaminación microbiana, es muy práctico hidrolizar la leche a menos de 10°C, o bien entre 30 y 40°C en donde el tiempo de hidrólisis debe limitarse a algunas horas únicamente.

La cantidad de enzima en la leche debe ajustarse dependiendo del contenido de lactosa que contenga.

Antes de añadir la enzima, se debe tomar el pH, que debe encontrarse entre 6.6 y 6.8, y si no es así, se deberá ajustar con hidróxido de amonio o de potasio, ya que se ha demostrado que aceleran la actividad enzimática.

Ya agregada la enzima a la leche, se debe tener una agitación controlada por todo el tiempo que dure la hidrólisis, esto es importante - ya que produce un incremento en la eficacia de la actividad enzimática.

( 32 )

Cuando se alcanza el grado de hidrólisis deseado, la leche se somete a un tratamiento térmico con el fin de destruir la enzima y de reducir la cuenta microbiana. (Fig. 1)

b) Para leche entera.

Se requiere hidrolizar primordialmente la lactosa de la leche descremada; se reconstituye posteriormente con grasa butírica. Esta mezcla se homogeniza, pasteuriza y deshidrata. (Fig. 2) (25)

El proceso de hidrólisis comprende la introducción de una lactasa de levadura líquida producida por una cepa especial de Saccharomyces lactis, en leche o suero. Durante la reacción, se consume una molécula de agua y reacciona con la molécula de azúcar. Las condiciones de reacción, como son temperatura, acidez, concentración de lactosa, tiempo y concentración de enzima, determinan la velocidad del proceso de hidrólisis.

Se han adaptado algunos métodos analíticos en la cuantificación de lactosa en leche, a pesar de que dichos procedimientos no son específicos para éste producto, son los utilizados en la determinación de glucosa.

Fig. 1 PROCESO PARA LA LECHE DESCREMADA HIDROLIZADA.

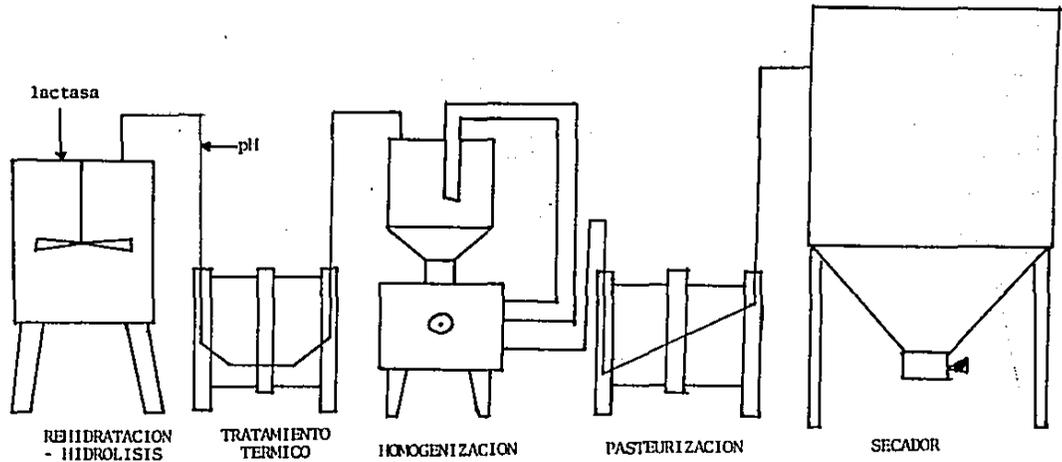
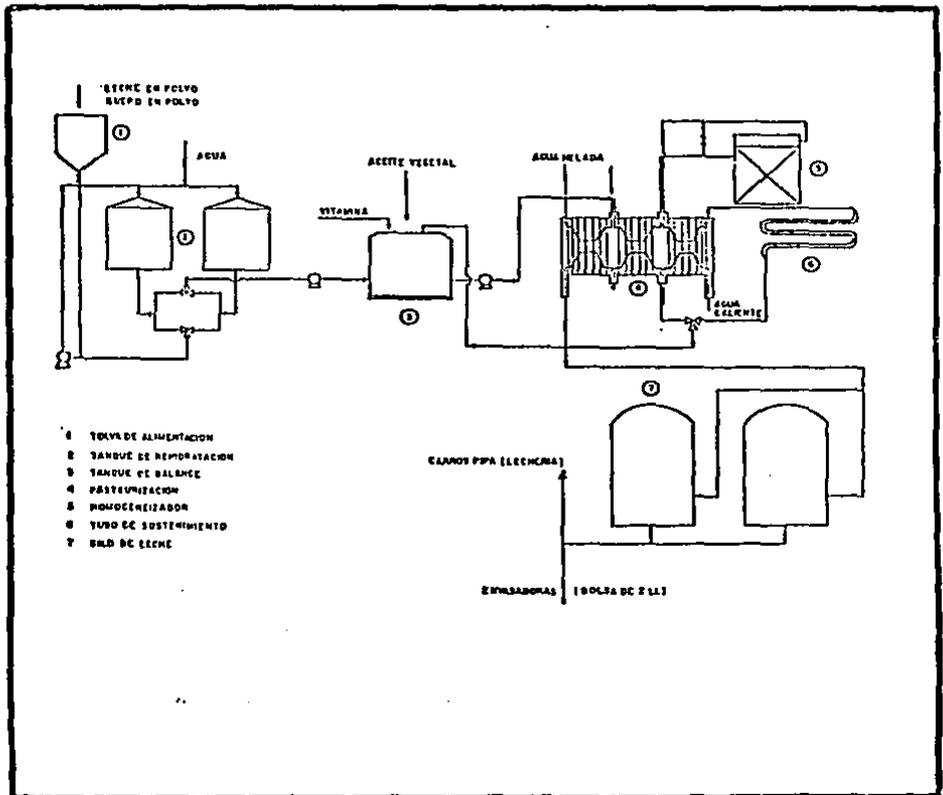


Fig. 2

PROCESO PARA LA LECHE RECONSTITUIDA



Por tanto se hace necesario llevar a cabo una comparación sistemática en la aplicabilidad y eficiencia de dichos métodos para el caso de glucosa en leche.

Los métodos utilizados serán los siguientes:

1. Glucosa Deshidrogenasa.      GDI
2. Glucosa Oxidasa.              GOX
3. Somogyi-Nelson
4. Punto Crioscópico.

## EQUIPO.

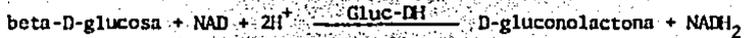
1. Micropipeta de 50 a 200  $\mu$ l  
Micropipette 821. Socorex, Swiss.
2. Espectrofotómetro. Spectronic 2000. Bauch & Lomb.
3. Centrífuga. IEC Centra - 7  
Internacional Equipment Company.
4. Crioscopio. Fiske Milk Cryoscope. Model MS  
Fiske Associates.
5. Baño de María

## METODO 1.

### GLUCOSA DESHIDROGENASA

#### 1. Fundamento.

La glucosa deshidrogenasa (beta-D-glucosa: NAD oxidorreductasa) (Gluc-DH), cataliza la oxidación de glucosa según la siguiente reacción:



La adición de mutarrotasa (aldosa-1-epimerasa), acelera la reacción. La cantidad de  $\text{NADH}_2$  formado es proporcional a la concentración de glucosa, y se lee en el espectrofotómetro a 340 nm. ( 13, 23 )

#### 2. Reactivos.

- a) Solución desproteinizante 0.33 M de  $\text{ClO}_4^-$
- b) Solución reactiva. 0.12 M de amortiguador de fosfatos con un pH 7.6; 0.15 M de cloruro sódico; 10 kU/l Gluc-DH; 0.21 kU/l de mutarrotasa; 0.22 mM de NAD.
- c) Solución patrón de glucosa-lactosa. (Anexo 1)

#### 3. Procedimiento.

- a. Pesar aproximadamente 1 g de muestra (leche hidrolizada) y aforar a 100 ml.

- b. Tomar 0.1 ml con micropipeta y agregar 1 ml de la solución desproteinizante.
- c. Centrifugar a 2500 rpm durante 10 min.
- d. Tomar 0.2 ml con micropipeta del sobrenadante y agregar 2 ml de la solución reactiva.
- e. Incubar de 15° a 25° durante 7 a 17 min.
- f. Leer a 340 nm, ajustando con un blanco preparado con 0.4 ml de la solución desproteinizante más 4 ml de la solución reactiva.
- g. Previamente se construye una curva de calibración (absorbancia vs. concentración) por medio de las soluciones patrón glucosa-lactosa, -elaboradas al 40%, 50% y 60% de glucosa, esto es una concentración de glucosa de 0.015782, 0.019723 y 0.023670 mg de glucosa/2.2 ml que es la solución final, respectivamente.

#### 4. Cálculos.

Calcular la pendiente de la curva anterior y utilizarla para obtener la concentración de glucosa en 2.2 ml de muestra llevada a leer en el espectrofotómetro. A partir del resultado de mg de glucosa/2.2 ml obtenido para la muestra, se multiplica por 5500 (factor de dilución de muestra llevada hasta 2.2 ml) para obtener la concentración de glucosa en los 100 ml de muestra original.

$$\% \text{ glucosa base húmeda} = \frac{\text{mg glucosa}/2.2 \text{ ml} (5500) (100)}{\text{mg muestra}}$$

$$\% \text{ glucosa base seca} = \frac{\% \text{ glucosa b.h. (100)}}{100 - \text{humedad}}$$

$$\% \text{ hidrólisis} = \frac{\% \text{ glucosa b.s. (100) (342)}}{180 (\% \text{ de lactosa en muestra})}$$

2.2 ml = solución final

342 = peso molecular de la lactosa

180 = peso molecular de la glucosa

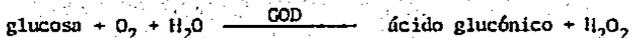
5500 = factor de dilución =  $\frac{100 \text{ ml (1.1 ml)}}{1 \text{ g (0.1 ml) (0.2 ml)}}$

## METODO 2.

### GLUCOSA OXIDASA

#### 1. Fundamento.

La glucosaoxidasa (beta-D-glucosa: oxígeno-1-oxidoreductasa) (GOD), cataliza la oxidación de glucosa según la ecuación siguiente:



El peróxido de hidrógeno formado en esta reacción, reacciona en presencia de peroxidasa (donador: hidrógeno-peróxido oxidoreductasa) (POD) con 4-aminoantipirina y 2,4-diclorofenol. Por copulación oxidante se forma antipirilquinonimina roja. La cantidad del colorante formado es proporcional a la concentración de glucosa, y se lee en el espectrofotómetro a 510 nm.

#### 2. Reactivos.

- a) Solución desproteinizante. Solución de tricloroacético 0.3 M
- b) Reactivo de color. 0.1 M de amortiguador de fosfatos y 0.1 M de amortiguador tris, pH 8; 6 kU/l de GOD; 38 kU/l de POD; 0.25 mM de 4-aminoantipirina (4-aminofenazona); 0.3 mM de 2,4-diclorofenol.

Estos reactivos son de Merck no. 3393 de Merckotest.

c) Solución patrón de glucosa-lactosa. (Anexo 1)

3. Procedimiento.

- a. Pesar aproximadamente 1 g de muestra (leche hidrolizada) y aforar a 100 ml.
- b. Tomar 0.1 ml con micropipeta y agregar 1 ml de la solución desproteinizante.
- c. Centrifugar a 2500 rpm durante 10 min.
- d. Tomar 0.2 ml con micropipeta del sobrenadante y agregar 2 ml de la solución del reactivo de color.
- e. Incubar de 15° a 25° durante 15 a 30 min.
- f. Leer a 510 nm, ajustando con un blanco preparado con 0.4 ml de la solución desproteinizante más 4 ml del reactivo de color.
- g. Previamente se construye una curva de calibración (absorbancia vs. concentración) por medio de las soluciones patrón glucosa-lactosa, --elaboradas al 40%, 50% y 60% de glucosa, esto es una concentración de glucosa de 0.015782, 0.019723 y 0.023670 mg de glucosa/2.2 ml que es la solución final, respectivamente.

4. Cálculos.

Calcular la pendiente de la curva anterior y utilizarla para obtener la concentración de glucosa en 2.2 ml de muestra llevada a leer en el espectrofotómetro. A partir del resultado de mg de glucosa/2.2 ml obtenido para la muestra, se multiplica por 5500 (factor de dilución de muestra llevada

hasta 2.2 ml) para obtener la concentración de glucosa en los 100 ml de muestra original.

$$\% \text{ glucosa base húmeda} = \frac{\text{mg glucosa}/2.2 \text{ ml} (5500) (100)}{\text{mg muestra}}$$

$$\% \text{ glucosa base seca} = \frac{\% \text{ glucosa b.h.} (100)}{100 - \text{humedad}}$$

$$\% \text{ hidrólisis} = \frac{\% \text{ glucosa b.s.} (342) (100)}{180 (\% \text{ de lactosa en muestra})}$$

2.2 ml = solución final

342 = peso molecular de la lactosa

180 = peso molecular de la glucosa

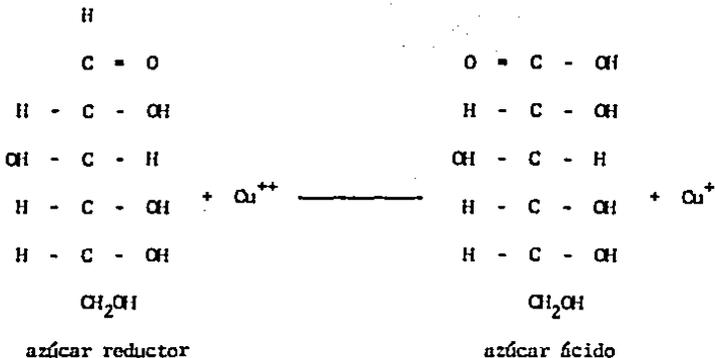
5500 = factor de dilución =  $\frac{100\text{ml} (1.1 \text{ ml})}{1 \text{ g} (0.1 \text{ ml}) (0.2 \text{ ml})}$

METODO 3.

SOMOGYI-NELSON

1. Fundamento.

Al hacer reaccionar un azúcar reductor, en este caso la glucosa, con hidróxido cúprico (sulfato de cobre más hidróxido de potasio) se forma óxido cuproso de color rojo. La base es la donación de electrones del reductante (que se oxida simultáneamente) al óxido de ión  $\text{Cu}^{++}$  que se transforma en ión  $\text{Cu}^+$  :



La reacción no es estequiométrica pero es reproducible si se conservan constantes los reactivos y el tiempo de calentamiento. El óxido cuproso - precipitado insoluble, no puede valorarse fotométricamente, por lo que se trata con reactivo arsenomolibdico que es reducido a un ión verdoso que se mide en el espectrofotómetro. En este método el factor limitante es el

agente reductor (glucosa) estando los reactivos en exceso, por lo que puede usarse para medir la cantidad de  $\text{Cu}_2\text{O}$  que es proporcional a la cantidad de glucosa originalmente presente. ( 3 )

## 2. Reactivos.

a) Hidróxido de sodio 0.5 N

b) Sulfato de Zinc 0.5 N

c) Reactivo de cobre alcalino

d) Reactivo de color. Arsenomolibdato

Equipo de reactivos para la determinación de glucosa por el método de Somogyi-Nelson modificado. Sigma de México.  
no. 135

e) Soluciones patrón de glucosa-lactosa. (Anexo 1)

## 3. Procedimiento.

a. Pesar aproximadamente 1 g de muestra (leche hidrolizada) y aforar a 100 ml.

b. Tomar 1 ml con pipeta volumétrica y ponerlo en un tubo para centrífuga de 50 ml.

c. Agregar 10 ml de NaOH 0.5 N y 10 ml de sulfato de zinc 0.5 N

d. Centrifugar a 900 rpm durante 10 min.

e. Tomar 1 ml del sobrenadante a un tubo de Folin y agregar 2 ml del -- reactivo de cobre alcalino a cada tubo.

- f. Dejar incubar en agua hirviendo durante 20 min, tapar los tubos con canicas.
- g. Enfriar en agua corriente por 1 min.
- h. Agregar 2 ml del reactivo de color (arsenomolibdato) y no mezclar.
- i. Agitar hasta que el color esté bien homogéneo.
- j. Añadir agua destilada hasta la marca del tubo de Folin y mezclar por inversión.
- k. Dejar reposar por 15 min.
- l. Leer a 540 nm, ajustando con un blanco preparado con 1 ml de agua -- destilada y seguir desde el punto e).
- m. Elaborar una curva de calibración (absorbancia vs. concentración) por medio de las soluciones patrón glucosa-lactosa, elaboradas al 40% , 50% y 60% de glucosa.

#### 4. Cálculos.

Calcular la pendiente de la curva anterior y utilizarla para obtener la concentración de glucosa en la muestra.

$$\% \text{ glucosa base húmeda} = \frac{\text{mg glucosa}/35 \text{ ml} (2100) (100)}{\text{mg muestra}}$$

$$\% \text{ glucosa base seca} = \frac{\% \text{ glucosa b.h.} (100)}{100 - \text{humedad}}$$

$$\% \text{ hidrólisis} = \frac{\% \text{ glucosa b.s. (342) (100)}}{180 (\% \text{ de lactosa en muestra})}$$

35 ml = solución final

342 = peso molecular de la lactosa

180 = peso molecular de la glucosa

2100 = factor de dilución =  $\frac{100 \text{ ml (21 ml)}}{1 \text{ g (1 ml) (1 ml)}}$

## METODO 4.

### PUNTO CRIOSCOPICO

#### 1. Fundamento.

La leche o el suero presentan un punto de congelación más bajo que el del agua destilada, debido principalmente a sus minerales disueltos y su contenido de lactosa. Por medio del punto de congelación se determinará la concentración de las soluciones, ésto es, medirá la cantidad de disolvente en una solución, en este caso la leche. Durante la hidrólisis de la lactosa, la molécula de lactosa se hidroliza en otras dos moléculas, una D-glucosa y una D-galactosa, ésta hidrólisis va acompañada por el descenso correspondiente del punto de congelación de esta solución. ( 10, 20 )

#### 2. Reactivos.

- a) Solución para calibración  $-0.027^{\circ}\text{H}$  o  $\text{m}^{\circ}\text{C}$
- b) Solución para calibración  $-0.525^{\circ}\text{H}$  o  $\text{m}^{\circ}\text{C}$
- c) Solución para calibración  $-0.621^{\circ}\text{H}$  o  $\text{m}^{\circ}\text{C}$  (3)

#### 3. Procedimiento.

- a. Pesar lo necesario para tener 10% de sólidos no grasos en leche descremada, y 7% de sólidos no grasos para leche entera, y aforar a 100 ml.

- b. Prender y dejar estabilizar el crioscopio por 1 hr.
- c. Mediante las solución de calibración de  $-0.027^{\circ}$ ,  $-0.525^{\circ}$  y  $-0.621^{\circ}\text{H}$  calibrar el crioscopio.
- d. Ya calibrado el aparato, leer las muestras.
- e. Previamente se construye una curva de calibración, graficando grado de hidrólisis contra punto de congelación, empleando ya sea leche descremada en polvo o leche entera en polvo, según sea el caso y cuyo grado de hidrólisis sea 50%, 75% y 100%
- f. Interpolar el punto crioscópico de las muestras en la curva patrón.

#### 4. Cálculos.

1) Para leche descremada.

$$\% \text{ hidrólisis} = \frac{\% \text{ hidrólisis (sólidos no grasos de la muestra)}}{10}$$

2) Para leche entera.

$$\% \text{ hidrólisis} = \frac{\% \text{ hidrólisis (sólidos no grasos de la muestra)}}{7}$$

$^{\circ}\text{H}$  = grados Horvert

$\text{m}^{\circ}\text{C}$  = mili grados centígrados

10 = 10% de sólidos no grasos

7 = 7% de sólidos no grasos

## DISEÑO EXPERIMENTAL.

En primer lugar se realizó la determinación de la precisión y la exactitud de cada uno de los métodos mediante la utilización de un valor que se considerara como real (valor analizado) de las muestras utilizadas en este estudio, de acuerdo al método de Glucosa deshidrogenasa, ya que éste era el que se usaba generalmente para estas mediciones.

Dado que se tienen 4 métodos para comparar y 4 muestras para analizar, se eligió el diseño experimental denominado "Cuadrado Latino" con la finalidad de evaluar los métodos a diferentes niveles de grado de hidrólisis y obtener la equivalencia entre sí, desde el punto de vista estadístico. Cuadro 5. ( 9 )

El cuadrado latino es factible evaluarlo mediante la prueba de Fisher o prueba F, conocida como un método de análisis de varianza. (Anexo 2)

El método consiste en separar, de la variación total observada, las diferentes causas o factores de variación que influyen en cualquier experimento y que afectan en distinto grado el efecto de los tratamientos. A fin de separar las diversas causas de variación se sigue el siguiente orden:

- a) Separar los grados de libertad ( GL ) para cada factor o causa de variación.

Cuadro 5.

CUADRO LATINO. (4 por 4)

METODO (bloque)	1 GLUCOSA DH	2 GLUCOSA OX	3 SONOGYI NELSON	4 CRUOSCOPO	TOTALES
1. LDP = 50%	X 111 X 112 X 113	X 221 X 222 X 223	X 331 X 332 X 333	X 441 X 442 X 443	Σr 11 Σr 12 Σr 13
2. LDP = 75%	X 211 X 212 X 213	X 221 X 222 X 223	X 231 X 232 X 233	X 241 X 242 X 243	Σr 21 Σr 22 Σr 23
3. LEP = 50%	X 311 X 312 X 313	X 321 X 322 X 323	X 331 X 332 X 333	X 341 X 342 X 343	Σr 31 Σr 32 Σr 33
4. LEP = 80%	X 411 X 412 X 413	X 421 X 422 X 423	X 431 X 432 X 433	X 441 X 442 X 443	Σr 41 Σr 42 Σr 43
	SUBTOTALES				
1. LDP (50%)	ΣT 11	Σ 21	Σ 31	Σ 41	ΣT b 1
2. LDP (75%)	ΣT 12	Σ 22	Σ 32	Σ 42	ΣT b 2
3. LEP (50%)	ΣT 13	Σ 23	Σ 33	Σ 43	ΣT b 3
4. LEP (80%)	ΣT 14	Σ 24	Σ 34	Σ 44	ΣT b 4
TOTALES	ΣT a 1	ΣT a 2	ΣT a 3	ΣT a 4	ΣT X

- b) Calcular la suma de los cuadrados de las desviaciones de las observaciones con respecto a la media, para cada causa de variación.
  - c) Calcular las varianzas o cuadrados medios para cada factor de variación.
  - d) Probar hipótesis por medio de la prueba de F o relación de varianzas.
- ( 9 )

Además se realizó la prueba de T student como método complementario de la prueba de F y confirmativo a los niveles de confianza del 95 y 99%. (Anezo 4)

## R E S U L T A D O S

Era necesario tener un valor que se considerara como real del grado de hidrólisis de las muestras incluidas en este estudio, para lo -- cual se analizaron las mismas por quintuplicado con el método de Glucosa deshidrogenasa, ya que de acuerdo a la experiencia obtenida, éste era el método que arrojaba resultados más repetitivos. Cuadro 6.

Para el diseño experimental, las muestras se analizaron por - triplicado con cada uno de los cuatro métodos antes mencionados.

Los resultados se presentan en los cuadros 7, 8, 9 y 10.

Quadro 6.

MUESTRA	GLUCOSA DESHIDROGENASA ( VALOR REAL )		
LDP = 50% H	1.	53.0746	$\bar{x}$ = 51.3661 S = 1.317 CV = 2.56
	2.	51.4559	
	3.	51.8990	
	4.	50.9101	
	5.	49.4909	
LDP = 75% H	1.	75.6668	$\bar{x}$ = 74.860 S = 2.0219 CV = 2.70
	2.	78.0517	
	3.	72.3188	
	4.	73.9300	
	5.	73.3516	
LEP = 50% H	1.	49.5950	$\bar{x}$ = 48.8103 S = 0.9944 CV = 2.0372
	2.	47.3749	
	3.	48.9373	
	4.	49.3342	
	5.		
LEP = 80% H	1.	82.4390	$\bar{x}$ = 81.2933 S = 1.1632 CV = 1.4308
	2.	80.3107	
	3.	80.9647	
	4.	82.6035	
	5.	80.1490	

LDP = leche descremada en polvo al 50 y 75% de hidrólisis.

LEP = leche entera en polvo al 50 y 80% de hidrólisis.

$\bar{x}$  = promedio

S = desviación estándar

CV = coeficiente de variación

Cuadro 7.

## METODO DE GLUCOSA DESHIDROGENASA

MUESTRA	GLUCOSA DESHIDROGENASA	
LDP = 50% H	1. 50.1787	$\bar{x}$ = 49.8383
	2. 49.6928	S = 0.2957
	3. 49.6436	CV = 0.5933
		%R = 97.04
LDP = 75% H	1. 74.6798	$\bar{x}$ = 74.3475
	2. 74.2513	S = 0.2960
	3. 74.1116	CV = 0.3981
		%R = 99.31
LEP = 50% H	1. 48.9787	$\bar{x}$ = 48.7718
	2. 48.5991	S = 0.1920
	3. 48.7377	CV = 0.3936
		%R = 99.92
LEP = 80% H	1. 82.9900	$\bar{x}$ = 80.9001
	2. 80.2548	S = 1.8534
	3. 79.4556	CV = 2.2909
		%R = 99.52

LDP = leche descremada en polvo al 50 y 75% de hidrólisis

LEP = leche entera en polvo al 50 y 80% de hidrólisis

$\bar{x}$  = promedio

S = desviación estándar

CV = coeficiente de variación (relación de S con el promedio)

%R = porcentaje de recuperación (relación del valor real con el valor obtenido en los triplicados)

Cuadro 8.

## METODO DE GLUCOSA OXIDASA

MUESTRA	GLUCOSA OXIDASA	
LDP = 50% H	1. 52.9271	$\bar{x}$ = 52.5736
	2. 52.0308	S = 0.4772
	3. 52.7631	CV = 0.9076
		%R = 97.64
LDP = 75% H	1. 72.2937	$\bar{x}$ = 72.5989
	2. 73.2019	S = 0.5222
	3. 72.3010	CV = 0.72
		%R = 96.97
LEP = 50% H	1. 44.9792	$\bar{x}$ = 47.2267
	2. 47.5064	S = 2.1216
	3. 49.1947	CV = 4.4923
		%R = 96.75
LEP = 80% H	1. 78.3709	$\bar{x}$ = 78.6822
	2. 78.5837	S = 0.3705
	3. 79.0920	CV = 0.47
		%R = 96.79

LDP = leche descremada en polvo al 50 y 75% de hidrólisis

LEP = leche entera en polvo al 50 y 80% de hidrólisis

$\bar{x}$  = promedio

S = desviación estándar

CV = coeficiente de variación

%R = porcentaje de recuperación

MUESTRA	SOMOGYI-NELSON	
LDP = 50% H	1. 35.2098	$\bar{x}$ = 33.6190
	2. 35.8998	S = 3.4424
	3. 29.6593	CV = 10.2394
		$\%R$ = 65.45
LDP = 75% H	1. 30.4534	$\bar{x}$ = 29.1961
	2. 26.9039	S = 1.9882
	3. 30.2312	CV = 6.8098
		$\%R$ = 39.00
LEP = 50% H	1. 21.7351	$\bar{x}$ = 21.4451
	2. 21.1765	S = 0.2799
	3. 21.4239	CV = 1.3051
		$\%R$ = 43.94
LEP = 80% H	1. 49.8368	$\bar{x}$ = 47.6807
	2. 47.8622	S = 2.2522
	3. 45.3432	CV = 4.7235
		$\%R$ = 58.65

LDP = leche descremada en polvo al 50 y 75% de hidrólisis

LEP = leche entera en polvo al 50 y 80% de hidrólisis

$\bar{x}$  = promedio

S = desviación estándar

CV = coeficiente de variación

$\%R$  = porcentaje de recuperación

Cuadro 10.

## METODO DEL PUNTO CRIOSCOPICO

MUESTRA	PUNTO CRIOSCOPICO	
LDP = 50% H	1. 48.10	$\bar{x}$ = 48.21
	2. 48.26	S = 0.092
	3. 48.26	CV = 0.1916
		%R = 93.87
LDP = 75% H	1. 70.85	$\bar{x}$ = 71.44
	2. 71.65	S = 0.514
	3. 71.81	CV = 0.720
		%R = 95.42
LEP = 50% H	1. 47.03	$\bar{x}$ = 47.10
	2. 47.24	S = 0.1212
	3. 47.03	CV = 0.257
		%R = 96.50
LEP = 80% H	1. 79.07	$\bar{x}$ = 78.49
	2. 77.77	S = 0.66
	3. 78.63	CV = 0.84
		%R = 96.55

LDP = leche descremada en polvo al 50 y 75% de hidrólisis

LEP = leche entera en polvo al 50 y 80% de hidrólisis

$\bar{x}$  = promedio

S = desviación estándar

CV = coeficiente de variación

%R = porcentaje de recuperación

Con respecto a la exactitud determinada, se puede decir que los métodos Glucosa deshidrogenasa, Glucosa oxidasa y Crioscópico tienen buena exactitud, sobresaliendo el Glucosa deshidrogenasa, mientras que el método del Somogyi-Nelson mostró pobre exactitud, esto fué al comparar los porcentajes de recuperación obtenidos con el valor considerado como real.

( 2 4 ) El orden de exactitud sería el siguiente:

<u>Método</u>	<u>Exactitud</u>
Glucosa deshidrogenasa	98.95%
Glucosa oxidasa	97.03%
Somogyi-Nelson	51.76%
Punto Crioscópico	95.98%

La precisión de los métodos se obtuvo por medio de los coeficientes de variación (CV). El método que obtuvo menor coeficiente de variación, lo que indica mayor precisión, fué el Crioscópico seguido en orden descendente por Glucosa deshidrogenasa, oxidasa y el Somogyi-Nelson. Este coeficiente se determina relacionando la desviación estándar con el promedio de los triplicados. Quedando nuevamente en el siguiente orden:

<u>Método</u>	<u>Precisión</u>
Glucosa deshidrogenasa	0.919%
Glucosa oxidasa	1.647%
Somogyi-Nelson	5.769%
Punto Crioscópico	0.501%

Para la comparación de los métodos se utilizó el cuadrado latino, en donde para aprovechar las ventajas de esta distribución, es indispensable lo siguiente:

- a. Dividir el lote, o lugar de la experiencia en un número de unidades experimentales igual al cuadrado del número de tratamientos.
- b. Formar hileras y columnas de unidades experimentales.
- c. Distribuir los tratamientos en tal forma que ningún tratamiento se repita en fila ni en columna.

Para lograr lo anterior, se arreglan los tratamientos haciendo permutaciones horizontales a verticales, como se puede ver en el cuadro 11.

La distribución del cuadrado latino es muy eficaz cuando el número de tratamientos está entre 4 y 10. Se conoce la variabilidad en dos sentidos perpendiculares, por lo cual es muy deseable reducir o controlar el efecto de dicha variabilidad para disminuir el valor del error experimental. Por otra parte, tiene la desventaja de que es rígido en el número de repeticiones y en agrupar los tratamientos en hileras y columnas en tal forma que no se repita ningún tratamiento en fila ni en columna; además, se reducen los grados de libertad para el error experimental. ( 9, 14, 18)

Una vez realizado el cuadrado latino, se procede a la comparación estadística de los métodos, muestras y triplicados mediante la prueba de F a los niveles de confianza del 95 y 99% que se da en el cuadro 12.

(Anexos 2 y 3)

Cuadro 11.

## DISEÑO EXPERIMENTAL.

MUESTRA (%) \ METODO (B)	1. GLUCOSA DH	2 GLUCOSA OX	3 SOMOGYI NELSON	4 CRIOSCOPTICO	TOTALES
1. LDP	50.1787	52.9271	35.2098	48.1000	186.4156
= 50% H	49.6928	52.0308	35.8998	48.2600	185.8834
	49.6436	52.7631	29.6593	48.2600	180.3260
2. LDP	74.6798	72.2937	30.4534	78.8500	248.2769
= 75% H	74.2513	73.2019	26.9039	71.6500	246.0071
	74.1116	72.3010	30.2312	71.8100	248.4538
3. LEP	48.9787	44.9792	21.7351	47.0300	162.7230
= 50% H	48.5991	47.5064	21.1765	47.2400	164.5220
	48.7377	49.1947	21.4239	47.0300	166.3863
4. LEP	82.9900	78.3709	49.8368	79.0700	290.2677
= 80% H	80.2548	78.5837	47.8622	77.7700	284.4707
	79.4556	79.0920	45.3432	76.6300	280.5208
1. LDP (50% H)	149.5151	157.7210	100.7689	144.6200	552.6250
2. LDP (75% H)	223.0427	217.7966	87.5885	214.3100	742.7378
3. LEP (50% H)	146.3155	141.6803	64.3355	141.3000	493.6313
4. LEP (80% H)	242.7004	236.0466	143.0422	233.4700	855.2592
TOTALES	761.5737	753.2445	395.7351	733.700	2644.2533

$$\chi^2 = 161,483,0784$$

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Cuadro 12. RESULTADOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

(4 métodos)

FUENTE DE VARIACION	GL	F <sub>cal</sub>	F tablas	
			F <sub>0.05</sub>	F <sub>0.01</sub>
Bloques o métodos	3	108.71	2.84	4.31
Tratamientos o muestras	3	97.06	2.84	4.31
Replicaciones o duplicados	2	0.094	3.23	5.18
Error	39			
Total	47			

B y T [3/39] grados de libertad

R [2/39] grados de libertad

GL = grados de libertad

F<sub>cal</sub> = F calculada

F<sub>0.05</sub> y F<sub>0.01</sub> = F al 95 y 99% de confianza

Hipótesis. F<sub>cal</sub> ≤ F tablas al 95 y 99% de confianza, no existe diferencia significativa entre la variable dada.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Como se puede observar, la prueba de F realizada muestra que:

- existe diferencia significativa entre bloques o métodos, es decir, los resultados obtenidos con cada método no son equivalentes.
- existe diferencia significativa entre tratamientos o muestras, es decir, los resultados obtenidos en cada una de las muestras no son equivalentes, ésto se esperaba debido a la inclusión en este diseño de cuatro muestras con grados de hidrólisis diferentes.
- no existe diferencia significativa entre replicaciones o triplicados, ésto demuestra buena calidad en la ejecución de los análisis.

Para establecer una equivalencia entre los métodos, se procedió a realizar una de las pruebas para la significancia de las diferencias o las comparaciones entre los datos obtenidos por el análisis de varianza, que es la prueba T de student, con la cual se compararon los promedios y desviaciones estándares que se dan en el cuadro 14. (Anexo 4)

En el cálculo de esta prueba se consideró el método de Glucosa deshidrogenasa como método de referencia; los resultados de la prueba y la equivalencia de los métodos a los niveles de confianza del 95 y 99%.

Con esta prueba se estableció la equivalencia entre los métodos observándose lo siguiente:

- el método glucosa oxidasa es equivalente al glucosa deshidrogenasa en un 50% de las determinaciones realizadas.

Quadro 13. COMPARACION DE LOS METODOS MEDIANTE LA PRUEBA T.

RELACION DE METODOS						
MUESTRAS	GDH - GOX			GDH - CRIOSCOPO		
(1)	$T_{0.95}^5$ 2.57	$T_{calc.}$ 8.43	$T_{0.99}^5$ 4.03	$T_{0.95}^3$ 3.18	$T_{calc.}$ 9.11	$T_{0.99}^3$ 5.84
	DIFERENTES		DIFERENTES	DIFERENTES		DIFERENTES
(2)	$T_{0.95}^4$ 2.78	$T_{calc.}$ 5.04	$T_{0.99}^4$ 4.60	$T_{0.95}^4$ 2.78	$T_{calc.}$ 8.49	$T_{0.99}^4$ 4.60
	DIFERENTES		DIFERENTES	DIFERENTES		DIFERENTES
(3)	$T_{0.95}^2$ 4.30	$T_{calc.}$ 1.26	$T_{0.99}^2$ 9.92	$T_{0.95}^5$ 2.57	$T_{calc.}$ 12.75	$T_{0.99}^5$ 4.03
	EQUIVALENTES		EQUIVALENTES	DIFERENTES		DIFERENTES
(4)	$T_{0.95}^2$ 4.30	$T_{calc.}$ 2.03	$T_{0.99}^2$ 9.92	$T_{0.95}^3$ 3.18	$T_{calc.}$ 2.12	$T_{0.99}^3$ 5.84
	EQUIVALENTES		EQUIVALENTES	EQUIVALENTES		EQUIVALENTES

- (1) LDP = 50% hidrólisis
- (2) LDP = 75% hidrólisis
- (3) LEP = 50% hidrólisis
- (4) LEP = 80% hidrólisis

Hipotesis.  $T_{cal} \leq T_{tablas}$  al 95 y 99% de confianza, no existe diferencia significativa entre promedios comparados.

- el método del punto crioscópico es equivalente al glucosa deshidrogenasa en un 25%.

#### Análisis Económico.

Para el cálculo de este análisis, se tomó como base el costo necesario para efectuar 10 determinaciones, por concepto de reactivos requeridos por cada método y sin considerar el costo ya sea de un espectrofotómetro o de un crioscopio.

Encontrándose la economía siguiente:

1. Glucosa deshidrogenasa	\$ 3434.20 / 10 determinaciones
2. Glucosa oxidasa	\$ 1413.40 / 10 determinaciones
3. Somogyi-Nelson	\$ 515.40 / 10 determinaciones
4. Punto Crioscópico	\$ 600.00 / 10 determinaciones

Cabe mencionar que el método crioscópico es el método más rápido y fácil en su ejecución, mientras que los métodos de glucosa deshidrogenasa y oxidasa son relativamente rápidos y fáciles. El método del Somogyi-Nelson se puede considerar bastante laborioso.

En cuanto al análisis económico, el glucosa deshidrogenasa resultó ser el método más caro, seguido del glucosa oxidasa, siendo el más barato el Somogyi-Nelson. Y en cuanto a rapidez y facilidad, el mejor fué el método del punto crioscópico.

## C O N C L U S I O N E S

1. Experimentalmente se demostró que los métodos incluidos en el estudio, son aplicables para la cuantificación del grado de hidrólisis en leche, pero que la precisión y exactitud de los mismos, en términos generales, no son equivalentes.

2. El mejor método para la determinación del grado de hidrólisis es el Glucosa deshidrogenasa de acuerdo a las pruebas realizadas, sobre todo por su exactitud, precisión y repetibilidad, y pueden ser utilizados como métodos confirmativos o de referencia el Glucosa oxidasa y el Punto Crioscópico.

Aunque el método de Glucosa deshidrogenasa es el método más caro, es el más confiable y seguro, ésto es importante para conocer exactamente el grado de hidrólisis que contiene una leche, puesto que será utilizada para pacientes con problemas de intolerancia o digestivos.

3. Se demostró que el método del Somogyi-Nelson fué el método con menor precisión y exactitud, además de que presentó una mala repetibilidad, y por lo tanto no se recomienda para ser utilizado en la determinación del grado de hidrólisis.

4. El método de Glucosa deshidrogenasa ya se ha adoptado como método oficial en LICONSA, y se recomienda efectuar un estudio comparativo

vo interlaboratorios con los métodos de Glucosa deshidrogenasa, oxidasa y Punto Crioscópico, con la finalidad de unificar criterios para el empleo de un mismo método por todos los laboratorios de la empresa interesada.

A N E X O S

## ANEXO 1.

### 1. Preparación de la solución patrón de glucosa-lactosa.

Pesar 4.13 g de lactosa anhidra y 2.17 g de glucosa anhidra aforando cada uno a 100 ml con agua destilada. Tomar de cada solución alícuotas a fin de preparar soluciones patrón con cantidades diferentes de glucosa y lactosa que correspondan a grados de hidrólisis diversos.

<u>% Hidrólisis</u>	<u>ml sol. glucosa</u>	<u>ml sol. lactosa</u>	
20	0.2	0.8	+ 9 ml H <sub>2</sub> O
40	0.4	0.6	+ 9 ml H <sub>2</sub> O
60	0.6	0.4	+ 9 ml H <sub>2</sub> O
80	0.8	0.2	+ 9 ml H <sub>2</sub> O
100	1.0	0.0	+ 9 ml H <sub>2</sub> O

El contenido de glucosa en cada mezcla de glucosa-lactosa se calcula multiplicando los mililitros de glucosa tomados por 21.7 mg/10 ml.

### 2. Procedimiento.

- Tomar 0.1 ml con micropipeta de cada uno de los patrones que se desee elaborar y agregar 1 ml de la solución desproteinizante.
- Tomar 0.2 ml con micropipeta y agregar 2 ml de la solución reactiva. Elaborarlo por duplicado.
- Mezclar e incubar a 15° a 25° durante 7 a 17 min.

d. Leer en el espectrofotómetro a la longitud de onda especificada anteriormente para cada método. Se leen ajustando con un blanco.

### 3. Cálculos.

Se calculan las concentraciones de glucosa en 2.2 ml de solución final, de la que se llevó a la lectura en el espectrofotómetro.

$$\text{Factor. mg glucosa/2.2 ml} = \frac{\text{ml. sol. glucosa (21.7) (0.2)}}{100 (1.1)}$$

21.7 = mg glucosa/10 ml

0.2 = alicuota

1.1 = dilución

De aquí se determinan las concentraciones de cada uno de los patrones que fueron utilizados.

<u>Patrón</u> % de glucosa	<u>Concentración</u> mg glucosa/2.2 ml
40	0.015782
50	0.019723
60	0.023670

## ANEXO 2.

## ANALISIS DE VARIANZA DEL CUADRADO LATINO.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	PRUEBA F
Bloques o métodos (b)	( b-1 )	$F_b = \frac{S^2_B}{S^2_E}$
Tratamientos o muestras (t)	( t-1 )	$F_t = \frac{S^2_T}{S^2_E}$
Replicaciones o duplicaciones (r)	( r-1 )	$F_r = \frac{S^2_R}{S^2_E}$
Error	( b-1 ) ( bt + r - 2 )	
Total	( btr - 1 )	

ANEXO 3. FORMULAS DE CALCULO DE ANALISIS DE VARIANZA Y PRUEBA F.

1. Factor de corrección (C).

$$C = \frac{(\sum T)^2}{(b) (T) (r)}$$

2. Suma de cuadrados totales (SC tot)

$$SC \text{ tot} = \sum x^2 - C$$

3. Suma de cuadrados de bloques (SCB)

$$SCB = \frac{(\sum Ta1)^2 + (\sum Ta2)^2 + (\sum Ta3)^2 + (\sum Ta4)^2}{(T) \cdot (r)} - C$$

4. Suma de cuadrados de tratamientos (SCT)

$$SCT = \frac{(\sum Tb1)^2 + (\sum Tb2)^2 + (\sum Tb3)^2 + (\sum Tb4)^2}{(b) (r)} - C$$

5. Suma de cuadrados de replicaciones (SCR)

$$SCR = \frac{(\sum r11 + \sum r21 + \sum r31 + \sum r41)^2 + (\sum r12 + \sum r22 + \sum r32 + \sum r42)^2 + (\sum r13 + \sum r23 + \sum r33 + \sum r43)^2}{(b) (T)} - C$$

6. Suma de cuadrados del error (SCE)

$$SCE = SC \text{ tot} - (SCB + SCT + SCR)$$

7. Cálculo de las varianzas ( $S^2$ )

$$S^2_B = \frac{SCB}{b - 1} \qquad S^2_T = \frac{SCT}{t - 1}$$

$$S^2_R = \frac{SCR}{r - 1} \qquad S^2_E = \frac{SCE}{(b-1) (bt + r - 2)}$$

8. Cálculo de la razón (F)

$$FB = \frac{S^2_B}{S^2_E}$$

bloques o métodos

$$FR = \frac{S^2_R}{S^2_E}$$

replicaciones o duplicados

$$FT = \frac{S^2_T}{S^2_E}$$

tratamientos o muestras

9. Hipótesis prueba F

Fenit.  $\leq$  F tablas 95% y 99% significancia.

No existe diferencia significativa entre la variable dada.

1. Hipótesis: promedios iguales y desviaciones estándar diferentes.

$$\bar{x}_1 = \bar{x}_2 \quad \text{y} \quad S_1 \neq S_2$$

2. Fórmula prueba T student.

$$T = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

3. Cálculo de los grados de libertad. GL

$$GL = (n + 1) \left[ 1 + \frac{2}{\frac{S_1^2}{S_2^2} + \frac{S_2^2}{S_1^2}} \right] - 2$$

4. Interpretación de resultados.

T calc.  $\leq$  T tablas 95% y 99% significancia

No existe diferencia significativa entre promedios comparados.

## B I B L I O G R A F I A

1. Alais, C. CIENCIA DE LA LECHE. PRINCIPIOS DE TECNICA LECHERA.  
Ed. C.E.C.S.A. México pp. 16-17, 40-46 (1980)
2. Alfa Laval. DAIRY HANDBOOK. Dairy and Food Engineering.  
División P.O. Box 1008 S-22103 (1981)
3. A. O. A. C. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. William Horwitz, editor. 12th ed.  
Washington, D. C. (1975)
4. Atherton, H. V., Newlander, J. A. Chemistry and Testing of Dairy Products. 4a. ed. Avi Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut  
pp. 13-20 (1981)
5. Endri, S. QUIMICA DE LOS ALIMENTOS. Ed. Alhambra.  
México pp. 55, 207-239, 373, 386 (1982)
6. Balam, G., Chávez, A., Fajardo, J. L. Las zonas del país con mayores problemas nutricionales. La desnutrición y la salud en México.  
División de Nutrición, INN (1976)
7. Bourges, H., Rosado, J. L. Bases fisiológicas y nutricionales para la aplicación de fórmulas basadas en leche con bajo contenido de lactosa en diferentes grupos de población. INN. División de Nutrición experimental y ciencia de los alimentos. (1984)
8. Brand, J. C., Gracey, M. S. Lactose malabsorption in Australian Aborigines. Am J. Clin. Nutr. 37 : 449-452 (1983)
9. Castañeda Reyes, P. DISEÑO DE EXPERIMENTOS APLICADOS.  
Ed. Trillas. México pp. 54-55, 96, 104-105 (1982)
10. Chen, Shin-Ling Yeh, Frank, J. F., Loewenstein, M. Estimation of Lactose hydrolysis by Freezing point measurement in milk and whey substrates treated with lactases from various microorganisms. A.O.A.C. 64 (6)  
1414-1419 (1981)

11. Cole, H. H. PRODUCCION ANIMAL 2a.ed. Ed. Acribia Zaragoza, España pp. 482 (1973)
12. Encyclopedia of Chemical Technology Vol. 15 3a. ed. Wiley Interscience Publication. John Wiley&sons. U.S.A pp. 522-525, 550-567 (1981)
13. Essing, A. M. Kleyn, D. H. Determination of Lactose in Milk: Comparison of methods. A.O.A.C 66 (6) 1514-1516 (1980)
14. Fabila Carrera, G. PLANEACION Y ANALISIS DE EXPERIMENTOS INDUSTRIALES Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial. México pp. 24-25, 36-38 (1980)
15. Ganong, W. F. MANUAL DE FISILOGIA MEDICA. 4a. ed. Ed. El Manual Moderno, México pp. 376 (1974)
16. Guy, A. G. Nutritional considerations in Developing low lactose products in bayless and paige lactose digestion. The John Hopkins Univ. Press. Baltimore, U.S.A. (1981)
17. Harper, H. H. MANUAL DE QUIMICA FISILOGICA. Ed. El Manual Moderno. México pp. 267 (1976)
18. Hoel, P.G. ESTADISTICA ELEMENTAL. C.E.C.S.A. 2a. ed. México pp. 26-34, 163-166 (1974)
19. Jenness, R., Patton, J. PRINCIPLES OF DAIRY CHEMISTRY. John Wiley & sons, Inc. U.S.A. pp. 101-115 (1959)
20. Jeon, I. J., Saunders, S. R. Effect of Oligosaccharide formation on the Cryoscopic measurements on enzymatic Hydrolysis of Lactose in DAIRY PRODUCTS. J. Food Sci. 51 (1) 245-246 (1986)
21. Judkins, H. F., Keener, H. A. LA LECHE. SU PRODUCCION Y PROCESOS INDUSTRIALES. 10a. ed. Cía Editorial Continental, S. A. México pp. 45-54 (1983)

22. Keating, P. F., Gaona, H. INTRODUCCION A LA LACTOLOGIA.  
Ed. Limusa México pp. 15-20 (1986)
23. Kleyn, D. H., Trout, J. R. Enzymatic Ultraviolet Method for measuring Lactose in Milk: Collaborative Study. A.O.A.C 67 (3) 637-640 (1984)
24. Maisel, L. PROBABILIDAD Y ESTADISTICA.  
Fondo Educativo Interamericano, S. A. México pp. 272-274 (1973)
25. Manual de Control de Calidad. Libro de Fórmulas.  
Leche Reconstituida. LICONSA. México (1983)
26. Pérez Gavilán, J., Pérez Gavilán, J. P. BIOQUIMICA Y MICROBIOLOGIA DE LA LECHE. Ed. Limusa. México pp. 24-76 (1984)
27. Robinson, C. H. FUNDAMENTOS DE NUTRICION.  
C.E.C.S.A. México pp. 582 (1979)
28. Savaiano, D. A., Agou El Anour, A. Lactose malabsorption from yogurt pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk and cultured milk in lactose deficient individuals. Am. J. Clin. Nutr. 40 : 1219-1223 (1984)
29. Segal, I., Gagjee, P. P. Lactase deficiency in the South Africa Black Population. Am. J. Clin. Nutr. 38 : 901-905 (1983)
30. Swaisgood, H. Primary Sequence of Kappa-casein.  
J! Dairy Sci. 58 : 583 (1975)
31. Taylor, S. L. Food Allergies. Food Technology 39 : 98-105 (1985)
32. Turner, S. J., Daly, T., James, B. S. Utilization of a low-lactose milk. Am. J. Clin. Nutr. 29 : 739-744 (1976)
33. Valenzuela, T. MANUAL DE PEDIATRIA. 9a. ed.  
Ed. Interamericana. México pp. 138 (1975)
34. West, E. S. Todd, W. R., Mason, H. S. BIOQUIMICA MEDICA.  
Ed. Interamericana. México pp. 173, 375 (1969)

35. White, A., Handler, P., Smith, E. PRINCIPIOS DE BIOQUIMICA.  
ED. McGraw Hill. España pp. 525, 1116 (1983)
36. Whitney, R., Brunner, J. R. Nomenclature of Proteins of cow's milk .  
J. Dairy Sci. 59 : 795 (1976)
37. Yúfera, E. P. QUIMICA AGRICOLA. Vol. III Alimentos.  
Ed. Alhambra. España pp. 443-469 (1983)
38. Zadow, J. G. Lactose: Properties and Uses.  
J. Dairy Sci. 67 : 2654-2679 (1984)
39. Food and Agriculture Organization of the United Nations.  
Rome, (1970)