



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

“FOSFORILACIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA
DEL LACTOSUERO BOVINO Y EFECTO SOBRE
SU COMPOSICIÓN MINERAL”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA
EN CIENCIAS

P R E S E N T A

FERNANDA HERNÁNDEZ GIL

TUTOR
RENE ROSILES MARTINEZ

COMITÉ TUTORAL
AURORA HILDA RAMÍREZ PEREZ
ELVIRA SANTOS SANTOS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dedicatorias

A mis papás Fernando Hernández Jiménez y Margarita Gil Padilla.

A mis queridos hermanos Triny y Fernando.

A mis Abuelos Mariano Gil, Ma. Trinidad Padilla de Gil y Yolanda Jiménez.

Al Doctor René Rosiles Martínez.

Agradecimientos

De manera especial y atenta al Doctor Rene Rosiles Martínez quien en todo momento me brindó su apoyo.

Al CONACYT por el apoyo a través del programa de becas para alumnos de posgrado.

A los académicos que colaboraron conmigo: Dra Elvira Santos y Dra Hilda Ramírez, gracias.

Al M. en C. Daniel Díaz Espinosa de los Monteros por el análisis estadístico y la revisión crítica del documento.

A la Dra. Margarita Gil Maya y al Dr. Mariano Hernández Gil por su gran apoyo.

Resumen

El lactosuero bovino es el líquido resultante de la coagulación de la leche en la elaboración del queso. La proteína es el componente de mayor valor nutritivo del lactosuero bovino debido a su alta digestibilidad y su contenido en aminoácidos esenciales. La fosforilación de esta proteína permite incrementar su valor nutricional. En México, la producción de lactosuero bovino cada año asciende a un millón de toneladas; en Acatlán y Tulancingo, Hidalgo, diariamente se producen 800 mil litros, de los cuales el 40 % es utilizado como alimento para el ganado bovino y la elaboración de requesón mientras el resto es enviado al drenaje. Bajo estas condiciones y como una alternativa para reducir el desperdicio de lactosuero se encuentra la fabricación de derivados alimenticios para humanos y animales. El objetivo de este estudio fue fosforilar la fracción proteica del lactosuero con pirofosfato de sodio para incrementar su valor nutritivo y analizar cómo afectaba en su composición mineral. También se analizaron algunos componentes del lactosuero entero como proteína, lactosa y elementos minerales mediante un analizador de leche. Además se analizó el contenido de sodio, potasio, calcio, magnesio y fósforo en las porciones proteica e hidrosoluble del lactosuero bovino mediante espectrometría de emisión y absorción atómicas y por técnicas colorimétricas. En las seis muestras analizadas se obtuvieron en promedio los siguientes datos: proteína 2.60 %, lactosa 3.70 % y sales minerales 0.53 %. El contenido de proteína, lactosa y sales minerales fue mayor, similar e inferior respectivamente a los valores reportados en la literatura. El sodio, potasio, calcio, magnesio y fósforo se encontraron en concentraciones mayores en la porción proteica que en la porción hidrosoluble del lactosuero. La mayor fosforilación de la proteína del lactosuero se llevó a cabo a una molaridad del pirofosfato de sodio de 0.4 y pH de la proteína de 2.5.

Palabras clave: lactosuero bovino, proteína de lactosuero, fosforilación, porción proteica, porción hidrosoluble.

Abstract

Bovine whey is the liquid obtained after milk coagulation of cheese production. Protein is the major nutritive component of whey because its high digestibility and content of essential amino acids. Phosphorylation of this protein will increase its nutritional value. Whey produced annually at Mexico is one million metric tons, daily whey production at Acatlan and Tulancingo, Hidalgo, is 800 thousands liters; of this production only 40 % is used for feed and quark production, the rest is disposed of as waste effluent. Under these circumstances and as an alternative to reducing whey waste, will be the uses of whey for food and feed derivatives production. The aim of this study was to phosphorylate the whey protein fraction with sodium pyrophosphate for increasing its nutritional value and analyze how this affects its mineral content. Some bovine whey components were also analyzed, such as protein, lactose and mineral element content with a milk analyzer. Sodium, Potassium, Calcium, Magnesium and Phosphorus content was analyzed in proteic and hydrosoluble whey portions by atomic absorption and emission spectrometry and colorimetry. In six bovine whey samples analyzed the following data were obtained: protein 2.60 %, lactose 3.70 % and mineral salts 0.53 %. The protein, lactose and mineral salts content were higher, similar and lower respectively to those reported in literature. Sodium, Potassium, Calcium, Magnesium and Phosphorus were found in higher concentrations in the proteic portion compared with the hydrosoluble portion of whey. The best phosphorylation level of whey protein was achieved with a sodium pyrophosphate molarity of 0.4 and protein pH of 2.5.

Key words: bovine whey, whey protein, phosphorylation, proteic portion, hydrosoluble portion.

Contenido

	Página
1. Introducción.	1
2. Revisión de la Literatura.	
2.1 Definición y tipos de lactosuero bovino.	3
2.2 Composición promedio del lactosuero bovino.	3
2.3 Calidad nutrimental de las proteínas del lactosuero bovino.	5
2.4 Vitaminas en el lactosuero bovino.	6
2.5 Producción de lactosuero bovino en el mundo y en México.	6
2.6 Valorización del lactosuero bovino: de residuo contaminante a producto de alto valor agregado.	7
2.7 Derivados del lactosuero bovino.	8
2.8 Proteínas del lactosuero bovino: propiedades nutrimentales y funcionales.	10
2.9 Comparativa de las propiedades funcionales de los caseinatos y las proteínas del lactosuero bovino.	11
2.10 Modificación química de las proteínas para mejorar sus propiedades nutrimentales y funcionales.	12
2.11 Fosforilación de las proteínas del lactosuero bovino.	12
3. Justificación.	16
4. Hipótesis.	17
5. Objetivos.	18

6. Material y métodos.	19
7. Resultados.	24
8. Discusión.	41
9. Conclusiones.	45
10. Referencias.	46
11. Anexos.	50

Lista de Cuadros

	Página
Cuadro 1. Composición promedio del lactosuero bovino dulce y ácido, base seca	4
Cuadro 2. Contenido de aminoácidos esenciales en las proteínas del lactosuero bovino.	4
Cuadro 3. Calidad proteica en alimentos para humanos.	5
Cuadro 4. Concentración de vitaminas en lactosuero bovino.	6
Cuadro 7.1 Valores de pH del lactosuero bovino entero.	28
Cuadro 7.2 Coeficientes de correlación lineal entre minerales de la fracción proteica del lactosuero bovino antes de la fosforilación.	39
Cuadro 7.3 Coeficientes de correlación lineal entre minerales de la fracción proteica del lactosuero bovino después de la fosforilación.	40

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Densidad y sólidos no grasos (SNG) en lactosuero bovino entero.	27
Figura 2. Porcentaje de sólidos no grasos (SNG) por muestra.	27
Figura 3. Contenido mineral en las porciones proteica e hidrosoluble del lactosuero bovino.	29
Figura 4. Contenido de cada mineral en las porciones proteica e hidrosoluble del lactosuero bovino.	30
Figura 5. Cambio en el contenido mineral en la porción proteica del lactosuero bovino en respuesta a la aplicación de cada tratamiento de fosforilación.	31
Figura 6. Contenido de fósforo en la proteína de lactosuero bovino después de cada tratamiento de fosforilación.	32
Figura 7. Contenido de sodio en la proteína de lactosuero bovino después de cada tratamiento de fosforilación.	33
Figura 8. Contenido de potasio en la proteína de lactosuero bovino después de cada tratamiento de fosforilación.	34

Figura 9. Contenido de calcio en la proteína de lactosuero bovino después de cada tratamiento de fosforilación.	35
Figura 10. Contenido de magnesio en la proteína de lactosuero bovino después de cada tratamiento de fosforilación.	36
Figura 11. Contenido de fósforo en la proteína de lactosuero bovino fosforilada a diferentes valores de pH y molaridad.	37
Figura 12. Contenido de fósforo en la proteína de lactosuero bovino fosforilada a diferentes valores de pH y molaridad.	38

1. Introducción

El lactosuero bovino es un producto derivado de la elaboración del queso, después de la coagulación de la caseína de la leche de vaca.

El agua es el principal componente del lactosuero bovino, la lactosa, proteínas y sales minerales forman el resto de los componentes, los cuales tienen un elevado valor nutritivo y por tal motivo no deben desecharse sino aprovecharse para la alimentación humana y del ganado.

La utilización industrial del lactosuero plantea numerosos problemas por lo que un volumen considerable de este derivado va a parar a los ríos y desagües.

Algunas posibilidades de la utilización del lactosuero bovino han sido propuestas, pero las estadísticas indican que casi el 50 % del lactosuero producido es descartado como efluente el cual crea un serio problema ambiental, además que representa una pérdida significativa de nutrientes.

Del lactosuero aprovechado se han obtenido concentrados proteicos, lactosa, bebidas fermentadas, bebidas alcohólicas, ácidos orgánicos, entre otros. Las proteínas del lactosuero no constituyen la fracción más abundante del lactosuero, pero es la más interesante en los terrenos económico y nutricional. Son una rica y balanceada fuente de aminoácidos y tienen un alto valor biológico. Además son utilizadas en gran variedad de alimentos debido a sus propiedades nutrimentales y funcionales.

Por medio de modificaciones químicas, como la fosforilación, se puede incrementar o mejorar las propiedades nutrimentales y/o funcionales de las proteínas. La mejora de la calidad nutrimental puede considerarse incrementar la digestibilidad o enlazar nutrientes a la proteína, en este caso, el fósforo es un mineral esencial para el metabolismo del organismo humano y animal donde juega un papel muy importante en el desarrollo y mantenimiento de las estructuras óseas.

El fósforo al estar enlazado a un componente orgánico, en este caso a una proteína, tiene una mayor biodisponibilidad.

2. Revisión de la Literatura

2.1 Definición y tipos de lactosuero bovino

El lactosuero bovino es el líquido resultante de la coagulación de la leche de vaca en la elaboración del queso, tras la separación de la mayor parte de la caseína y de la grasa. La composición y tipo de lactosuero depende de la leche utilizada y el tipo de queso a fabricar, así como de los métodos empleados para la coagulación de la caseína; de acuerdo a lo anterior, existen dos tipos de lactosuero bovino: el dulce y el ácido.

El lactosuero bovino dulce resulta de la coagulación enzimática de la leche, en la elaboración de queso tipo Suizo, Cheddar, Mozzarella, Manchego, entre otros. Este tipo de lactosuero casi no contiene calcio, ya que se produce un desdoblamiento del complejo caseína-calcio y se separa el paracaseinato de calcio que es la cuajada de la fracción hidrosoluble que es el lactosuero.

El lactosuero bovino ácido resulta de la coagulación ácida de la leche cuando se emplean ácidos como el acético, láctico y cítrico en la elaboración de queso Cottage, queso fresco, queso Oaxaca, entre otros. En la coagulación ácida el calcio no forma parte del complejo paracaseinato y pasa al lactosuero en donde se combina con la lactosa formando lactato cálcico, de aquí que el lactosuero de la coagulación ácida contenga lactato cálcico.

2.2 Composición promedio del lactosuero bovino

En el Cuadro 1 se muestra la composición promedio, en base seca, de ambos tipos de lactosuero bovino.¹

Cuadro 1		
COMPOSICIÓN PROMEDIO DEL LACTOSUERO BOVINO DULCE Y ÁCIDO, BASE SECA.		
	Lactosuero dulce g/L	Lactosuero ácido g/L
Sólidos totales	63.0 – 70.0	63.0 – 70.0
Lactosa	46.0 – 52.0	44.0 – 46.0
Proteína	6.0 – 10.0	6.0 – 8.0
Calcio	0.4 – 0.6	1.2 – 1.6
Fosfatos	1.0 – 3.0	2.0 – 4.5
Lactato	2.0	6.4
Cloruros	1.1	1.1
Grasa*	3.0 – 5.0	3.0 – 6.0

* Depende del contenido inicial en la leche

La proteína es el componente de mayor valor nutritivo del lactosuero bovino ya que tiene un elevado valor biológico y un rico perfil de aminoácidos esenciales, ² como se observa en el Cuadro 2.

Cuadro 2	
CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES EN LAS PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO BOVINO	
	Contenido g / 100 g de proteína
Treonina	6.2
Cisteína	1.0
Metionina	2.0
Valina	6.0
Leucina	9.5
Isoleucina	5.9
Fenilalanina	3.6
Lisina	9.0
Histidina	1.8
Triptófano	1.5

2.3 Calidad nutrimental de las proteínas del lactosuero bovino

La calidad nutrimental de una proteína puede ser expresada de varias formas: el índice de eficiencia de proteína, la digestibilidad y el valor biológico son frecuentemente utilizados para indicar el potencial de una proteína alimenticia como fuente de aminoácidos.³

En el Cuadro 3 se compara la calidad de la proteína del lactosuero bovino con la de otras proteínas de referencia.^{3,4}

Cuadro 3					
CALIDAD PROTEICA EN ALIMENTOS PARA HUMANOS					
	Digestibilidad proteica Corregida por el Score de aminoácidos	Score de aminoácidos esenciales	Índice de Eficiencia de proteína	Valor biológico	Digestibilidad proteica %
Proteína de lactosuero bovino	1.0	1.14	3.2	104	99
Proteína de huevo	1.0	1.21	3.8	100	98
Caseína	1.0	1.19	2.9	77	99
Proteína de soya	0.99	1.04	2.2	74	95
Proteína de carne bovina	0.92	0.94	2.9	80	98
Gluten de trigo	0.25	0.47	0.34	54	91

2.4 Vitaminas en el lactosuero bovino

Además el lactosuero tiene vitaminas del complejo B (Cuadro 4) como: tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, piridoxina, cobalamina y ácido ascórbico.²

Cuadro 4	
CONCENTRACIÓN DE VITAMINAS EN LACTOSUERO BOVINO	
	Concentración µg/ml
Tiamina (B1)	0.38
Riboflavina (B2)	1.20
Ácido nicotínico (B3)	0.85
Ácido pantoténico (B5)	3.40
Piridoxina (B6)	0.42
Cobalamina (B12)	0.03
Ácido ascórbico (C)	2.20

2.5 Producción de lactosuero bovino en el mundo y en México

La distribución de la producción de lactosuero en el mundo en el año 2005 fue ⁵: Europa 53 %, América del Norte y central 28 % , Asia 6 %, África 5 %, Oceanía 4 %, América del Sur 4 %. Anualmente estos porcentajes representan 110-115 millones de toneladas métricas de lactosuero provenientes de la elaboración de queso.^{6,7,8} De este valor, el 45 % se desecha en ríos, lagos o en el suelo, lo que representa una pérdida significativa de nutrientes ocasionando serios problemas de contaminación ambiental .⁸

En México, el lactosuero producido cada año es aproximadamente un millón de toneladas,⁹ proveniente de la elaboración de queso en algunas de las principales cuencas lecheras especializadas del país: La Laguna (Coahuila y Durango), los

Altos de Jalisco, Tizayuca (Hidalgo) y Valle de México y zonas aledañas al Distrito Federal (Puebla Estado de México), así como el norte de Veracruz.¹⁰

También hay que considerar los lugares que tienen una gran producción de queso a nivel familiar, como Tulancingo y Acatlán (Hidalgo), donde la producción diaria de lactosuero es de aproximadamente 800 mil litros, de los cuales son utilizados alrededor del 40 % como alimento para el ganado bovino o para la elaboración de requesón, el resto es vertido a las lagunas de la región o a campo abierto.

La cantidad de lactosuero disponible en el mundo, incluyendo a nuestro país, es muy considerable, como ya se mencionó, ya que representa más del 80 % de la leche utilizada en quesería.¹¹ Es un producto voluminoso y su utilización constituye uno de los mayores problemas de la industria láctea. Sus componentes poseen un elevado valor nutritivo y presentan propiedades nutrimentales y funcionales muy interesantes a nivel de las industrias de alimentos.

2.6 Valorización del lactosuero bovino: de residuo contaminante a producto de alto valor agregado

Las estadísticas indican que una importante porción de este residuo es descartada como efluente el cual crea un serio problema ambiental,^{12,13} debido a que afecta física y químicamente la estructura del suelo, lo anterior resulta en una disminución en el rendimiento de cultivos agrícolas y cuando se desecha en el agua, reduce la vida acuática al agotar el oxígeno disuelto.¹²

De acuerdo a un trabajo de la FAO,¹⁴ el lactosuero es una de las mayores reservas de proteínas alimentarias que quedan todavía fuera de los canales de consumo humano. Tradicionalmente se consideraba al lactosuero como un elemento no deseable, de escaso interés y de alto costo de eliminación. La práctica más comúnmente utilizada para su eliminación ha sido verterlo en los

cursos de agua, lo que es muy perjudicial desde el punto de vista ambiental. Una práctica menos perjudicial y de uso muy frecuente es el suministro a los terneros y/o cerdos para complementar su alimentación.

Al desarrollarse la industria quesera, resultó evidente que estas soluciones tradicionales no eran suficientes para afrontar el problema de la eliminación del lactosuero. Si bien es cierto que el vertido del lactosuero en los cursos de agua continúa siendo un grave problema ambiental, esta práctica se ha reducido mucho sobre todo en los países industrializados gracias a la aplicación estricta de medidas contra la contaminación. Paralelamente, estas medidas han contribuido también a intensificar la investigación sobre los usos alternativos del lactosuero, constituyendo así un ejemplo del modo en que la reglamentación puede inducir a que las mismas industrias transformen los residuos contaminantes que generan en productos de alto valor agregado para su propio beneficio.¹⁵

Se han realizado considerables esfuerzos para explorar nuevas alternativas para la utilización del lactosuero bovino y reducción de la contaminación ambiental.¹⁶

Anteriormente era utilizado principalmente para elaborar requesón ó como alimento para animales (cerdos y terneros), pero fueron agregándose innumerables alternativas de utilización de complejidad tecnológica creciente, como el uso de membranas de ultrafiltración para obtener concentrados proteicos y membranas de microfiltración para obtener aislados proteicos, de elevado valor agregado que son utilizados en la industria alimentaria humana y animal. Además mediante la fosforilación de las proteínas se logra incrementar su valor nutritivo y mejorar sus propiedades funcionales.¹⁷

2.7 Derivados del lactosuero bovino

Existe una gran diversidad en cuanto a los posibles usos del lactosuero bovino, como se denota a continuación:

2.7.1 Concentrados proteicos. Son elaborados por medio de equipos de ultrafiltración que consisten de una membrana semipermeable, la cual selectivamente permite pasar materiales de bajo peso molecular como agua, iones y lactosa, mientras retiene materiales de peso molecular alto como la proteína. Estos concentrados se utilizan tanto por las propiedades nutrimentales, fabricación de suplementos proteicos, como por las propiedades funcionales, para la elaboración de helados y budín, carne y salchichas, margarina y mayonesa. También se utilizan para la elaboración de bebidas, salsas, fideos, galletas, pasteles y productos de formulaciones infantiles debido a las propiedades funcionales excelentes de sus proteínas y sus beneficios nutrimentales.

2.7.2 Bebidas refrescantes. Para la preparación de estas bebidas, el sabor ácido del lactosuero bovino es más compatible con las bebidas de frutas cítricas, sin embargo su utilización como bebida refrescante era obstaculizada por la presencia de proteínas y grasa. Después de la Segunda Guerra Mundial, este problema se solucionó al utilizar lactosuero sin proteína ni grasa. Un ejemplo de bebida refrescante, Rivella ®, es producida en Suiza desde 1950 y es consumida en Canadá y Holanda.¹⁸

2.7.3 Bebidas fermentadas. Se producen a partir de la fermentación de lactosuero bovino desproteinado o completo para producir una gama de bebidas. La principal ventaja ofrecida por el lactosuero como sustrato para la producción es menos ácido que los jugos de frutas y tiene un gran valor nutritivo, especialmente si las bebidas aún contienen las proteínas del lactosuero.^{16,19}

2.7.4 Bebidas alcohólicas. La producción de este tipo de bebidas por conversión del lactosuero bovino es una alternativa de gran interés para la utilización de este subproducto industrial. En Estados Unidos, Irlanda y Nueva Zelanda se encuentran destilerías de lactosuero que obtienen etanol.^{16,19}

2.7.5 Ácidos orgánicos. Pueden ser obtenidos a través de la fermentación del lactosuero bovino, entre estos se tienen: ácido acético y ácido propiónico.^{16,19}

2.7.6 Lactosa. Una vez deshidratado el lactosuero, la lactosa es el componente que se encuentra en mayor proporción, y también tiene una gran aplicación en la industria alimentaria, como ingrediente en la fabricación de bizcochos, galletas, productos dietéticos y en confitería, para la fabricación de caramelos, chocolates, entre otros³.

2.8 Proteínas del lactosuero bovino: propiedades nutrimentales y funcionales

Las propiedades nutrimentales de las proteínas son aquellas determinadas por la composición en aminoácidos; como ya se mencionó las proteínas del lactosuero son altamente nutritivas y digeribles. Además, son una excelente fuente de calcio altamente biodisponible, ideal para la elaboración de bebidas para niños, mujeres embarazadas y adultos mayores.

Las propiedades funcionales son las que confieren a los alimentos que las utilizan como ingredientes, algunas características distintivas de apariencia, textura, sabor, solubilidad, entre otras.³

En general los productos del lactosuero bovino son utilizados en la elaboración de diversos productos, donde mejoran muchas de sus características funcionales y nutrimentales, como se describe a continuación: en los productos de panadería se mejora la textura, proporciona vitaminas y minerales;²⁰ en las bebidas es una fuente de aminoácidos esenciales, vitaminas, calcio, y componentes bioactivos y nutracéuticos, como lactoferrina y probióticos;²⁰ en los productos lácteos se proporciona cuerpo y textura en quesos procesados y tiene un efecto probiótico en yogures;²⁰ en confitería se mejora el sabor, y puede utilizarse como sustituto de

grasa; en carne procesada y productos del mar se desarrolla la textura deseada, se mejora el color y el sabor;²⁰ en la producción de alimentos para animales se incrementa el valor nutricional, suministra proteínas, vitaminas y minerales.²⁰

2.9 Comparativa de las propiedades funcionales de los caseinatos y las proteínas del lactosuero bovino

Las proteínas del lactosuero y los caseinatos de sodio se utilizan en la industria charcutera como ligantes y emulsificantes, en la fabricación de helados por favorecer el batido y en la preparación de harinas de cereales enriquecidos con proteínas.²¹

Las proteínas del lactosuero y los caseinatos de calcio encuentran un amplio campo de utilización en dietética. La intolerancia a la lactosa de algunos individuos y la búsqueda de alimentos hipocalóricos han hecho que exista una amplia clientela para estos productos preparados a partir de la leche pero desprovisto de lactosa y grasa cuya presencia se juzga indeseable.²¹

Las disoluciones de las proteínas del lactosuero y de los caseinatos de sodio son utilizadas como sustitutos de leche, pero las primeras tienen mayor blancura, aunque también su solubilidad es menor.²¹

Las proteínas de lactosuero presentan una mayor estabilidad espumante que los caseinatos.²²

2.10 Modificación química de las proteínas para mejorar sus propiedades nutrimentales y funcionales

La funcionalidad de las proteínas está determinada por sus características fisicoquímicas, las interacciones con componentes proteicos y no proteicos y las condiciones de proceso como: pH, concentración de sales, concentración del ion calcio y tratamientos térmicos previos.³

La modificación de las proteínas para mejorar o cambiar sus propiedades funcionales implica la alteración de una o más de sus características fisicoquímicas, que pueden ser: peso molecular, composición en aminoácidos, secuencia, conformación, carga neta de superficie e hidrofobicidad efectiva. Además de lograr la funcionalidad deseada, otro objetivo de la modificación de proteínas es el mejorar su valor nutritivo.^{23,24} La modificación de las proteínas puede llevarse a cabo mediante técnicas químicas, enzimáticas o físicas.

La modificación química implica la derivatización de las cadenas laterales de los aminoácidos. El objetivo de esta derivatización es modificar las interacciones no covalentes para lograr la conformación de la proteína con la estructura y función deseadas. Las interacciones no covalentes importantes en términos de modificar la conformación de la proteína incluyen las interacciones de Van der Waals, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno.²⁵

2.11 Fosforilación de las proteínas para mejorar sus propiedades funcionales

Los grupos fosfato pueden ser unidos de manera covalente a las proteínas mediante una variedad de agentes fosforilantes, algunos de éstos se mencionan a continuación:

El oxiclورو de fósforo (POCl_3) para fosforilar albúmina de huevo,²⁶ β -lactoglobulina, caseína y lisozima;²⁷ el trimetafosfato de sodio ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$) para

proteína de soya; ²⁸ el pentóxido de fósforo (P_2O_5) disuelto en ácido fosfórico (H_3PO_4) para caseína ²⁹ y albúmina de huevo; ³⁰ el ácido fosfórico (H_3PO_4) combinado con tricloroacetnitrilo (CCl_3CN) para fosforilar caseína; ³¹ el fosfato de sodio (Na_2HPO_4) para proteína de la clara de huevo ³² y pirofosfato de sodio ($Na_4P_2O_7$) para proteína de lactosuero bovino. ¹⁷

La fosforilación química de las proteínas puede incluir la derivatización del oxígeno del hidroxilo de los residuos de serina y treonina ^{27,28,30} o del nitrógeno del amino de la lisina o histidina. ²⁷

Para la caseína fosforilada con oxicloruro de fósforo ($POCl_3$), el fosfato se unió al oxígeno del hidroxilo de serina y treonina, como mono y difosfato; mientras que para la lisozima fosforilada, el fosfato se unió al nitrógeno mediante enlaces tipo éster de los di y polifosfatos. ²⁷

Al utilizar pentóxido de fósforo disuelto en ácido fosfórico (P_2O_5 / H_3PO_4) para fosforilar caseína, las uniones fosfato se encontraron como ésteres de los ácidos ortho- y meta-fosfórico en los grupos hidroxilo de los residuos de serina, treonina e hidroxiprolina. ³⁰

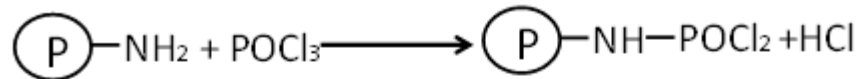
Al fosforilar β -lactoglobulina con oxicloruro de fósforo ($POCl_3$), el nitrógeno de los residuos de lisina e histidina fueron los principales sitios de enlace del fosfato. ³³

Cuando la caseína fue fosforilada con ácido sulfúrico (H_3PO_4), el fosfato formó en enlaces tipo éster con el oxígeno del hidroxilo de los residuos de serina y treonina.

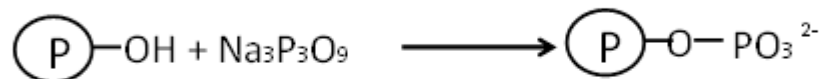
³⁰

Reacciones de fosforilación de proteínas

1.- Con oxiclóruo de fósforo²⁷ (POCl₃):



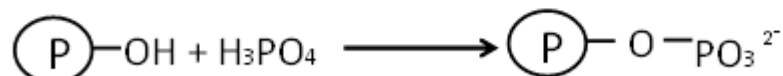
2.- Con trimetafosfato de sodio²⁸ (Na₃P₃O₉):



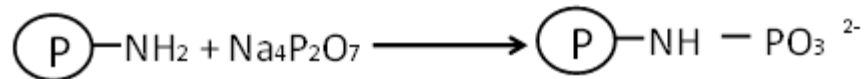
3.- Con pentóxido de fósforo (P₂O₅):



4.- Con ácido fosfórico (H₃PO₄):



5.- Con pirofosfato de sodio (Na₄P₂O₇):



La fosforilación ha sido probada como un método eficiente de mejorar las propiedades funcionales de las proteínas de los alimentos, como: solubilidad en agua, hidratación, emulsificación, formación de espuma, gelificación y estabilidad térmica.³⁴

Al fosforilar proteína de soya con trimetafosfato de sodio incrementó la solubilidad en agua, la capacidad de retención de agua, las propiedades de emulsificación, batido y formación de espuma.²⁸

En el caso de la β-lactoglobulina fosforilada con oxiclóruo de fósforo, mejoraron las propiedades de emulsificación y gelificación.³³

Cuando se utilizó fosfato de sodio para fosforilar proteína de clara de huevo, mejoraron sus propiedades de estabilidad térmica, gelificación y emulsificación.³² Además se fosforiló aislado proteico de lactosuero bovino, pero tuvo un nivel de fosforilación más bajo que la proteína de clara de huevo, posiblemente por su bajo nivel de azúcar³², ya que las cadenas de sacáridos en las proteínas también son sitios de fosforilación.³⁵ Dado lo anterior, en otro estudio de fosforilación se preparó un aislado de proteína de lactosuero bovino fosforilado, pero primero se glucosiló con maltopentosa a través de la reacción de Maillard y después se llevó a cabo la fosforilación en presencia de pirofosfato de sodio, dando como resultado que algunas propiedades funcionales mejoraran como la estabilidad térmica, emulsificación y gelificación.¹⁷

Además de mejorar las propiedades funcionales mediante la fosforilación de las proteínas de lactosuero bovino, se puede aumentar su valor nutricional ya que el fósforo que es unido a las proteínas es altamente asimilable y se pueden obtener concentrados proteicos enriquecidos tanto para consumo humano como animal.

El fósforo es un mineral esencial para el metabolismo del organismo humano y animal donde juega un papel muy importante en el desarrollo y mantenimiento de las estructuras óseas. Es un componente del adenosin trifosfato (ATP) y los ácidos nucleicos y forma parte de los fosfolípidos que integran y dan flexibilidad a las membranas celulares.³⁶ Además, tiene importantes funciones fisiológicas.

3. Justificación

Un gran porcentaje del lactosuero proveniente de la industria quesera es eliminado al drenaje porque no se le da algún uso positivo y genera un serio problema ambiental. En Tulancingo y Acatlán, Hidalgo, debido a la gran producción de lactosuero bovino, este problema es importante. Por medio de la presente investigación se pretende contribuir a la reducción de la eliminación del lactosuero, al darle un uso positivo, cuando se fabrique un complemento alimenticio enriquecido, además de su caracterización fisicoquímica para su uso eficiente.

4. Hipótesis

El contenido de fósforo aumentará en la fracción proteica del lactosuero bovino, después de la fosforilación efectuada a diferentes molaridades y pH, y afectará su composición mineral.

5. Objetivos

Fosforilar la fracción proteica del lactosuero bovino con pirofosfato de sodio para aumentar su contenido en fósforo e identificar los cambios en el contenido mineral después de la fosforilación.

Identificar la interacción del fósforo con los minerales sodio, potasio, calcio y magnesio.

Analizar algunos componentes del lactosuero bovino entero como: proteínas, lactosa, sales minerales, sólidos grasos y algunas características fisicoquímicas como: temperatura, densidad, punto de congelación y pH mediante espectrofotometría y potenciometría, con el fin de conocer su caracterización y composición.

Cuantificar el sodio, potasio, calcio, magnesio en las porciones proteica e hidrosoluble del lactosuero por espectrometría de emisión y absorción atómicas, y el fósforo mediante colorimetría, para conocer el contenido mineral en ambas porciones.

6. Material y métodos

6.1 Localización

La recolección de las muestras de lactosuero bovino obtenido de la fabricación de queso Oaxaca, tuvo lugar en seis queserías de Tulancingo Hgo, seleccionadas al azar y por la disponibilidad de los dueños de dichas queserías para apoyar con la toma de muestras.

Los análisis fisicoquímicos del lactosuero entero, la fosforilación de la fracción proteica y el análisis de elementos minerales (sodio, potasio, calcio, magnesio y fósforo) se realizaron en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de Ciudad Universitaria.

6.2 Materiales para la toma de muestras

Para la toma de muestras se utilizaron seis botellas de plástico de 600 mL sin esterilizar, únicamente se lavaron con agua y jabón y se enjuagaron dos veces con agua desmineralizada.

Se ocupó una hielera para conservar las muestras mientras eran transportadas al Laboratorio de Toxicología de la FMVZ, ahí se mantuvieron en congelación a una temperatura de -20°C .

6.3 Equipo para los análisis fisicoquímicos y de elementos minerales

Mediante un espectrofotómetro [®] Milk Scope Electric Julie C5 se analizaron algunos componentes y características fisicoquímicas del lactosuero bovino entero.

Los análisis de los elementos minerales se realizaron con un espectrómetro de emisión y absorción atómicas [®] Perkin Elmer AAnalyst 100 y un colorímetro [®] Perkin Elmer Lamda 2S.

El pH se midió con un potenciómetro [®] Conductronic pH 20.

6.4 Métodos para los análisis fisicoquímicos y de elementos minerales

6.4.1 Análisis de los componentes y características fisicoquímicas del lactosuero bovino entero. Las botellas de plástico que contenían las muestras se colocaron en un recipiente con agua a temperatura ambiente para ser descongeladas, y una vez descongeladas, se vaciaron en tubos de fondo cónico de 50 mL para realizar el análisis de algunos componentes y características fisicoquímicas del lactosuero bovino entero (densidad, lactosa, proteínas, sales minerales, temperatura, sólidos no grasos, sólidos grasos y punto de congelación) con el analizador de leche ® Milk Scope Electric Julie C5. El pH se midió con un potenciómetro ® Conductronic pH 20.

6.4.2 Obtención de las fracciones proteica e hidrosoluble del lactosuero bovino entero. De cada muestra se colocó 1 mL de muestra en un tubo de ensayo de 10 mL, se agregaron 2 mL de metanol y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min. Se observaron 2 fases, el precipitado fue la fracción proteica y el sobrenadante fue la fracción hidrosoluble, éste último se colocó en otro tubo de ensayo.

6.4.3 Procesamiento de la fracción proteica del lactosuero bovino. El precipitado proteico se puso a secar en la estufa durante un día aproximadamente a 70 ° C, se le agregó 0.5 mL de agua desmineralizada y 2 mL de ácido nítrico (HNO₃) al 20 %, se mezcló con el vórtex, se dejó digerir a temperatura ambiente durante la noche y al día siguiente se calentó a baño maría a temperatura no mayor de 80 ° C durante 5 hr para eliminar la materia orgánica. Una vez digerida la muestra, se aforó a 5 mL con agua desmineralizada y se colocó en otro tubo.

6.4.4 Análisis de los elementos minerales (Na, K, Ca, Mg, y P) en las fracciones proteica e hidrosoluble del lactosuero bovino. El análisis de calcio, magnesio, sodio y potasio se realizó por espectrometría de absorción y emisión atómicas bajo las condiciones de operación señaladas en el manual de operación del fabricante del equipo,³⁷ se midió la absorbancia de las muestras. Para conocer

la concentración se hizo un estimado al usar la regresión lineal de los estándares de los elementos minerales. Para el cálculo de la concentración final se consideró además el peso de la muestra, el aforo, y la dilución (en caso de que haya sido necesario realizarla).

La determinación de fósforo se realizó por colorimetría con el uso del reactivo de molibdovanadato de amonio.³⁸

6.5 Ajuste del pH de la fracción proteica del lactosuero bovino. De cada una de las muestras de lactosuero bovino entero se tomó 1 mL, se obtuvo la fracción proteica y ésta se colocó en un tubo de ensayo al que se le agregaron 10 mL de agua desmineralizada. Se midió el pH y se ajustó a un valor de 2.5¹⁷ con una solución de HCl 0.1 N. Se repitió el procedimiento anterior pero se ajustó el pH a un valor de 3.5, y a 4.5. Hasta el momento se tenían 18 muestras en total, las primeras 6 estaban a un pH de 2.5, las otras 6 a un pH de 3.5 y las 6 últimas un pH de 4.5.

Soluciones para fosforilar. Se prepararon 3 soluciones de pirofosfato de sodio: 0.1 M, 0.2 M y 0.4 M y se les ajustó el pH a 4.0 con ácido fosfórico (H₃PO₄) concentrado.¹⁷

6.6 Fosforilación de la fracción proteica del lactosuero bovino

Del primer bloque de las 6 muestras a pH de 2.5, se tomaron 3 mL y se colocaron en 3 tubos de ensayo, y a cada uno se le agregó 1 mL del agente fosforilante pirofosfato de sodio (1 mL de la solución 0.1 M al primero; 1 mL de la solución 0.2 M al segundo y 1 mL de la solución 0.4 M al tercero.) Al segundo bloque de las 6 muestras a un pH de 3.5 y al tercer bloque de las 6 muestras a un pH de 4.5 se les agregó la solución fosforilante como se menciona en el párrafo anterior.

En total se tuvieron nueve tratamientos, por los 3 valores de pH de la proteína y las 3 molaridades de pirofosfato de sodio (Na₄P₂O₇). El arreglo de los tratamientos se presenta en el Anexo 1.

Las muestras fosforiladas tuvieron un tiempo de incubación de 5 días a temperatura ambiente, después se separó la proteína del resto de la solución (agua + el pirofosfato que no reaccionó) mediante una filtración por medio de acrodiscos de nylon® Waters con un diámetro de poro de 0.45 µm, luego se lavó el filtrado con agua desmineralizada dos veces y se puso a digerir con 0.5 mL de agua desmineralizada y 1 mL de ácido nítrico (HNO₃) al 20% en las condiciones previamente mencionadas de digestión (procesamiento) de la fracción proteica. Una vez digerida la proteína fosforilada, se analizaron el sodio, potasio, calcio, magnesio y fósforo.

6.7 Análisis estadístico

Los datos generados en este experimento se sujetaron a los siguientes análisis estadísticos. Primero se transformaron ($Y = \text{Log}_{10}[Y+1]$) de acuerdo a los resultados de las pruebas de distribución normal (Shapiro Wilk) y de homogeneidad de varianzas (Bartlett) contenidas en el programa JMP 8.³⁹ En todos los casos se presentaron los datos originales. Para identificar la dispersión de los valores de densidad y sólidos no grasos (SNG) se construyó una gráfica de caja y bigotes. La comparación de la proporción de sólidos no grasos contenidos en las muestras de lactosuero bovino entero se realizó mediante una prueba χ^2 de dos colas.

Las diferencias entre el contenido mineral de la fracción proteica e hidrosoluble se determinaron mediante una prueba t de Student de dos colas. Cada tratamiento se refiere a la combinación de pH de la proteína y molaridad del agente fosforilante para el desarrollo de la fosforilación (nueve tratamientos en total). Para la comparación de los tratamientos con respecto a la condición previa (antes=control) se utilizó un análisis de varianza de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunnett, mientras que el efecto del cambio del pH sobre la fosforilación a cada molaridad del pirofosfato de sodio se realizó a través de un análisis de varianza de una vía, seguida de una prueba para detectar tendencias lineales.

La comparación entre tratamientos de fosforilación se realizó mediante un análisis de varianza de dos vías en la cual se consideraron como factores al pH de la proteína y a la molaridad del pirofosfato de sodio. El modelo incluyó el efecto de los factores principales (pH y molaridad) y de la interacción de ambos (pH*molaridad). Debido a que la interacción no resultó significativa, se procedió al análisis individual de los factores y se removió del modelo la interacción.

Se realizó un análisis de correlación lineal de Pearson a dos colas entre el contenido de los diferentes minerales del lactosuero (sodio, potasio calcio, magnesio y fósforo) tanto al inicio del experimento (antes = control) como después de cada tratamiento. El análisis estadístico se realizó con el programa Prism 5.⁴⁰ En todos los casos se consideró como significativo un nivel de $p < 0.05$.

7. Resultados

En la Figura 1 se observa la dispersión de los valores de densidad y sólidos no grasos (SNG) de las seis muestras de lactosuero bovino entero analizadas. En estos resultados se identificó que la lactosa fue el componente principal de los SNG, seguido de las proteínas y las sales minerales. El contenido de sólidos no grasos fue similar en las 6 muestras de lactosuero (Fig. 2; $p > 0.05$). De estos sólidos no grasos, la proteína representa alrededor del 36, la lactosa 54 y las sales minerales 7 %. Los datos obtenidos en este análisis se muestran de manera completa en el Anexo 2.

Los valores de pH de las muestras de lactosuero se observan en el Cuadro 7.1 Las muestras 1, 2, 3, 5 y 6 corresponden a lactosuero ácido ya que estos valores de pH están cercanos a los descritos en la literatura ² ($\text{pH} \simeq 4$); mientras que la muestra 4 corresponde a un lactosuero dulce ($\text{pH} \simeq 6.2$).

En la Figura 3 se presenta el contenido mineral en las fracciones proteica e hidrosoluble del lactosuero bovino. Los valores promedio en la fracción proteica fueron: Na, 14,242 ; K, 12,567; Ca, 16,245; Mg, 60,833 y P, 6,730 ppm. Y en la fracción hidrosoluble fueron: Na, 500; K, 823 ; Ca, 63; Mg, 57 y P, 651 ppm.

Es interesante anotar que las concentraciones de los elementos minerales de la fracción proteica van de 5 a 40 miles (ppm), mientras que en la fracción hidrosoluble van de 0.2 a 1.5 miles (ppm).

La comparación de la concentración de cada mineral (Na, K, Ca, Mg y P) en ambas fracciones indicó que el contenido mineral en la fracción proteica fue mayor (Figura 4; $p < 0.01$).

Los datos completos obtenidos en el análisis de minerales en las fracciones proteica e hidrosoluble se anotan en los Anexos 3 y 4, respectivamente.

En la Figura 5 se observa el cambio en el contenido mineral después de la fosforilación realizada a distintas condiciones experimentales de pH y molaridad. En el caso de P y Na se registró un incremento en su concentración entre antes y después de la fosforilación. En contraste, K, Ca y Mg presentaron un decremento.

La comparación de cada tratamiento de fosforilación con respecto a la concentración inicial de fósforo indicó, de acuerdo al análisis de Dunnett, que todos los tratamientos presentaron un aumento significativo de fósforo en la proteína (Figura 6; $p < 0.01$) cuando se comparó con la concentración de fósforo inicial (antes de la fosforilación).

El mismo análisis de comparación múltiple de Dunnett se realizó para el resto de los minerales (sodio, potasio, calcio y magnesio) donde se encontró que el aumento en la concentración de sodio y la disminución en las concentraciones de calcio y magnesio resultaron significativos respecto a los valores encontrados antes (control) de realizar la fosforilación de la proteína. La concentración de potasio resultó similar entre los tratamientos y los valores control (Figuras 7, 8, 9 y 10; $p < 0.001$)

En los Anexos 5, 6, 7 y 8 se presentan los datos completos obtenidos en el análisis de minerales (fósforo, sodio, potasio, calcio y magnesio) después de la fosforilación realizada a las distintas condiciones de pH y molaridad.

Como se menciona anteriormente, todos los tratamientos de fosforilación presentaron un aumento significativo en el contenido de fósforo en la proteína fosforilada, lo cual se hizo evidente en la Figura 6 cuando se observa un cambio de escala. Con base en el resultado anterior se comparó el efecto entre los tratamientos.

Los resultados indicaron que a valores de pH de 2.5 y 3.5 la cantidad de fósforo resultó similar ($p > 0.05$) cuando se utilizó una molaridad de 0.2 y 0.4. A diferencia de un pH de 4.5, en el cual la molaridad de 0.4 produce un aumento significativo

($p < 0.05$) en la cantidad de fósforo, con respecto a 0.1 y 0.2 M., como se observa en la Figura 11.

El efecto del cambio de pH sobre la cantidad de fósforo en la proteína fosforilada se presenta en la Figura 12. El análisis indicó que a 0.1 y 0.4 M, el cambio en el pH no afectó la cantidad de fósforo ($p > 0.05$), mientras que a 0.2 M se presentó una reducción lineal en la cantidad cuando el pH es menos ácido ($p < 0.05$).

El cálculo de los coeficientes de correlación entre los elementos minerales contenidos en la porción proteica, antes de la fosforilación se presenta en el Cuadro 7.2. Antes de la fosforilación, sólo se presentó una correlación significativa entre el fósforo y el magnesio ($r^2 = 0.90$; $p < 0.05$).

Después de la fosforilación, los coeficientes de correlación significativos ($p < 0.05$, 0.01 y 0.001) entre los elementos minerales (Na, K, Ca, Mg y P) estuvieron condicionados por la molaridad del pirofosfato de sodio y el pH de la proteína, como se pueden observar en el Cuadro 7.3 .

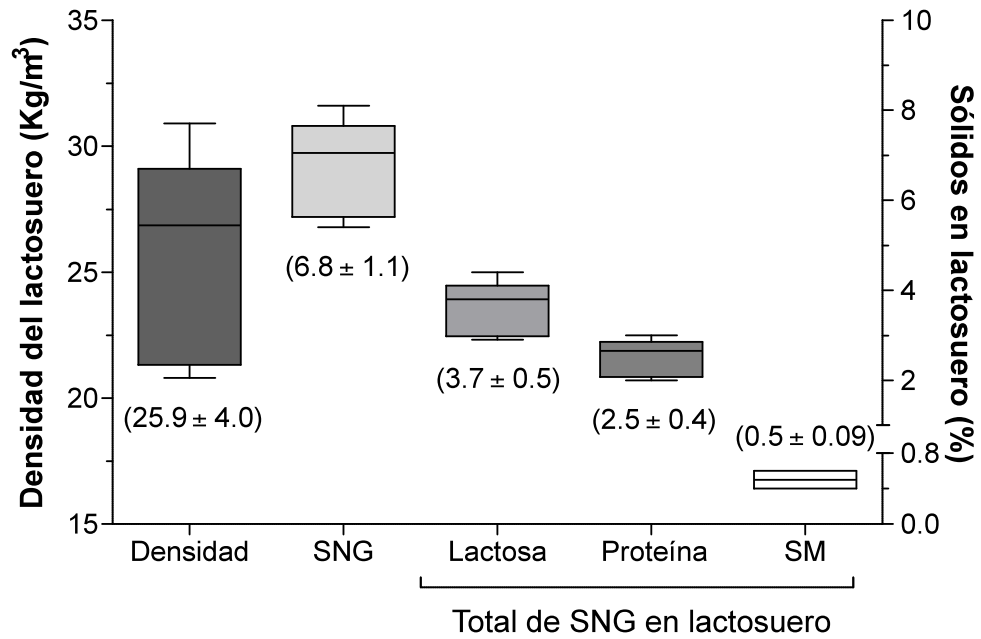


Figura 1. Densidad y sólidos no grasos (SNG) en lactosuero bovino entero. En paréntesis se presenta la media ± DE.

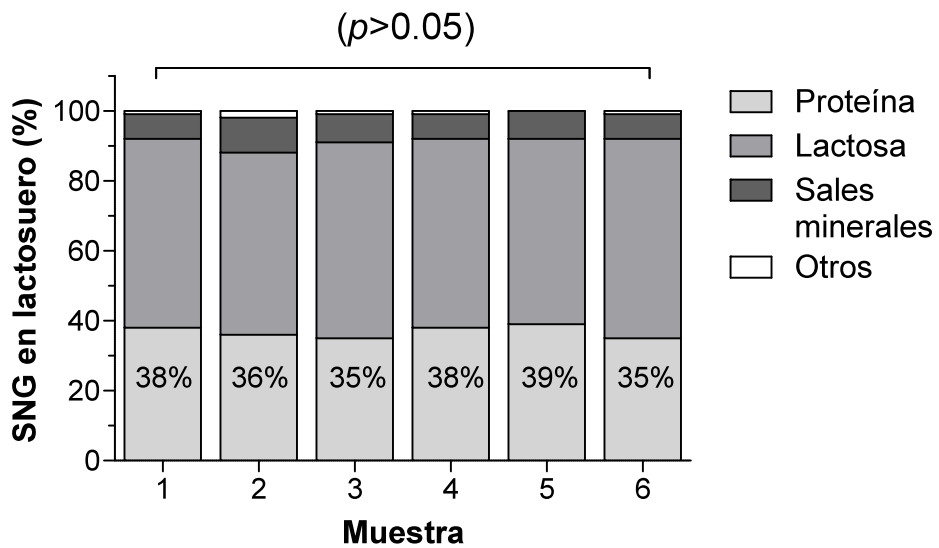


Figura 2. Porcentaje de sólidos no grasos (SNG) por muestra.

Cuadro 7.1
VALORES DE pH DEL LACTOSUERO
BOVINO ENTERO

Muestra	pH
1	4.03
2	3.82
3	4.08
4	6.37
5	3.99
6	4.86

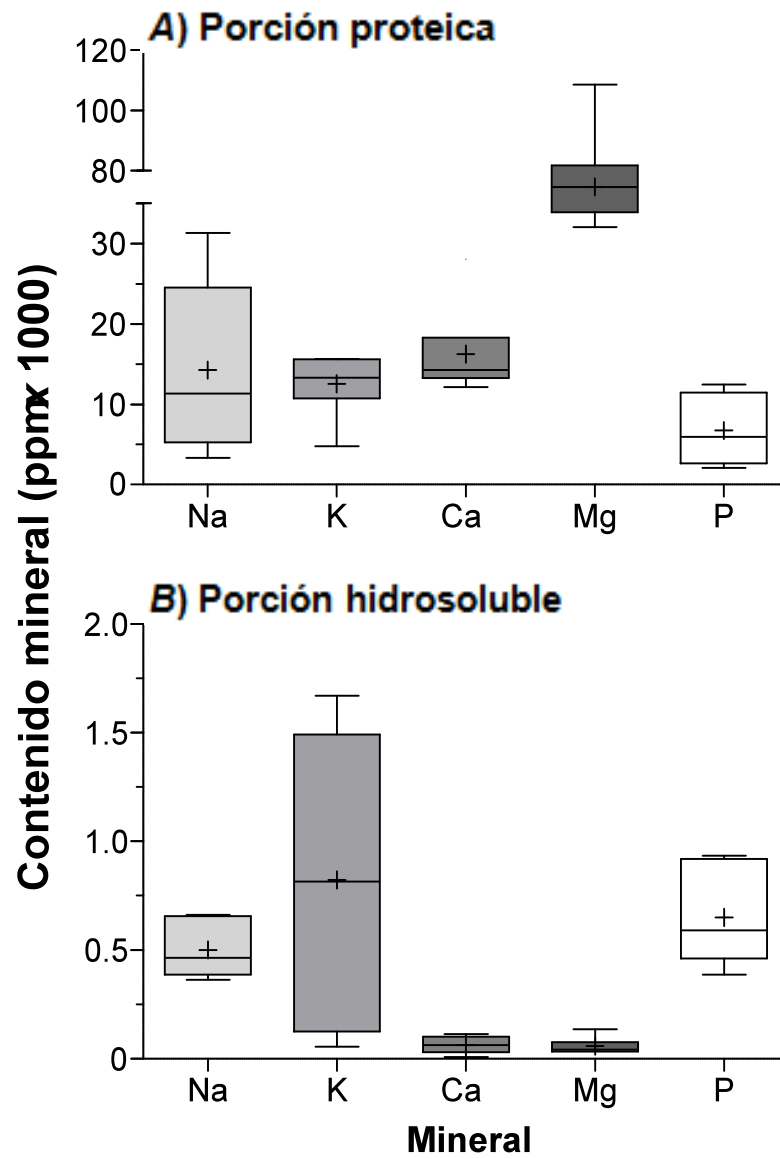


Figura 3. Contenido mineral en la porción proteica (panel A) e hidrosoluble (panel B) del lactosuero bovino. El símbolo + indica la media del contenido de cada mineral.

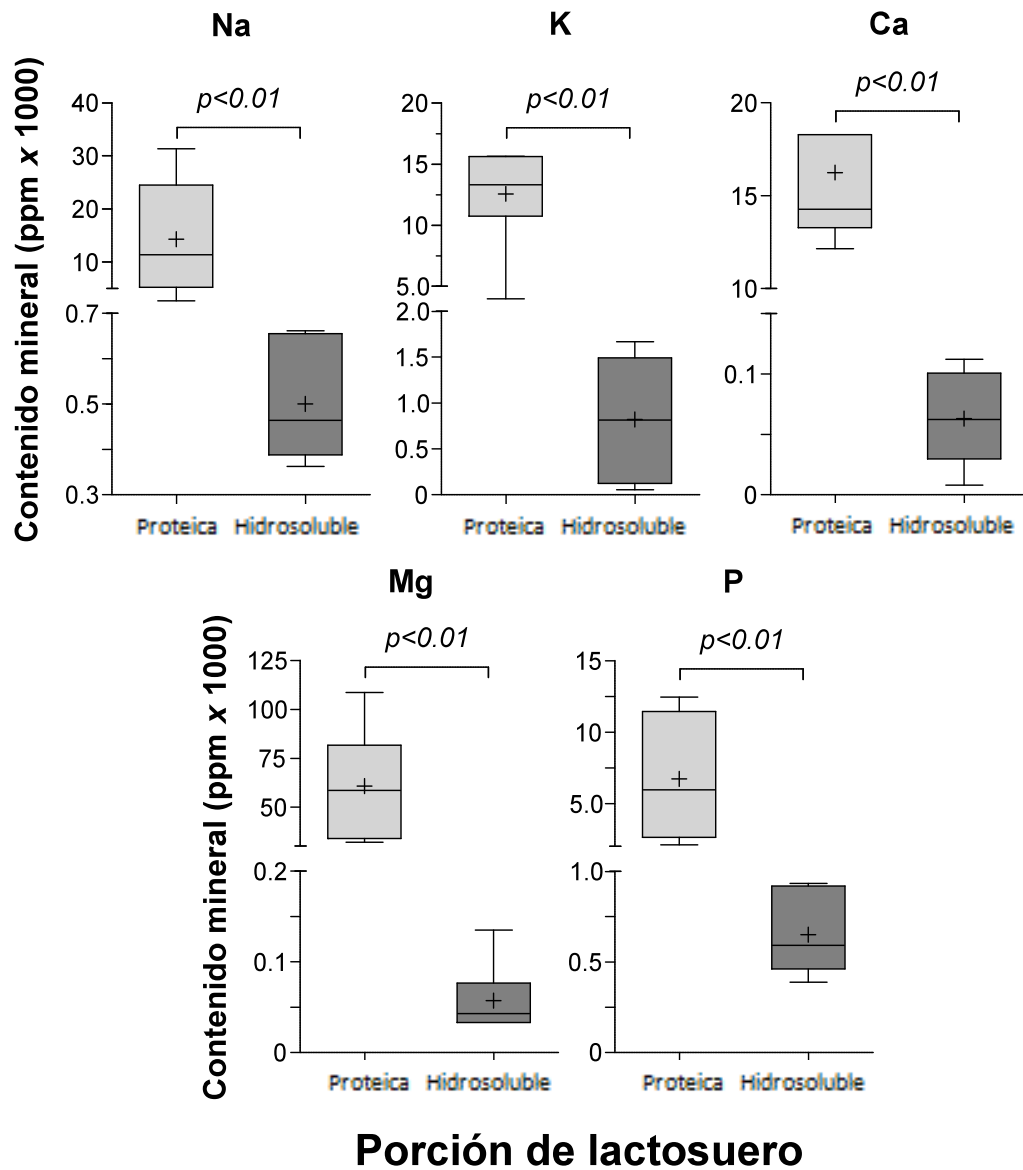


Figura 4. Contenido de cada mineral en las porciones proteica (panel izquierdo) e hidrosoluble (panel derecho) del lactosuero bovino. El símbolo + indica la media de la concentración de cada mineral.

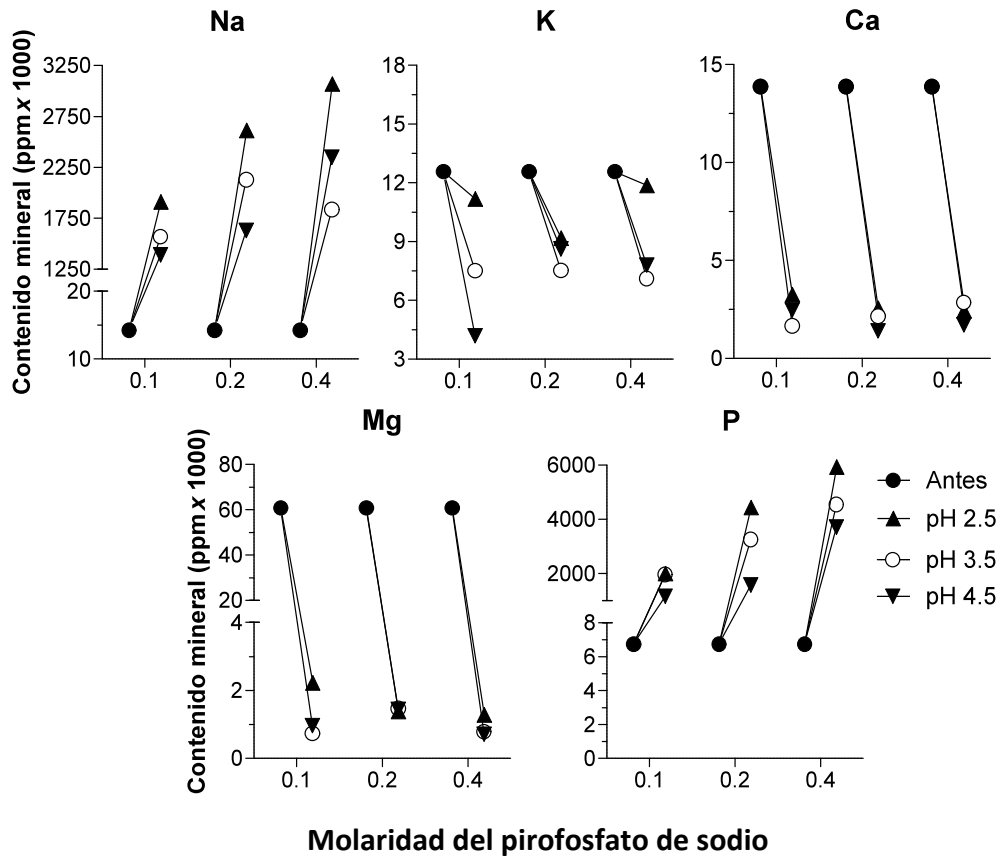


Figura 5. Cambio en el contenido mineral en la proteína de lactosuero bovino en respuesta a la aplicación de cada tratamiento de fosforilación.

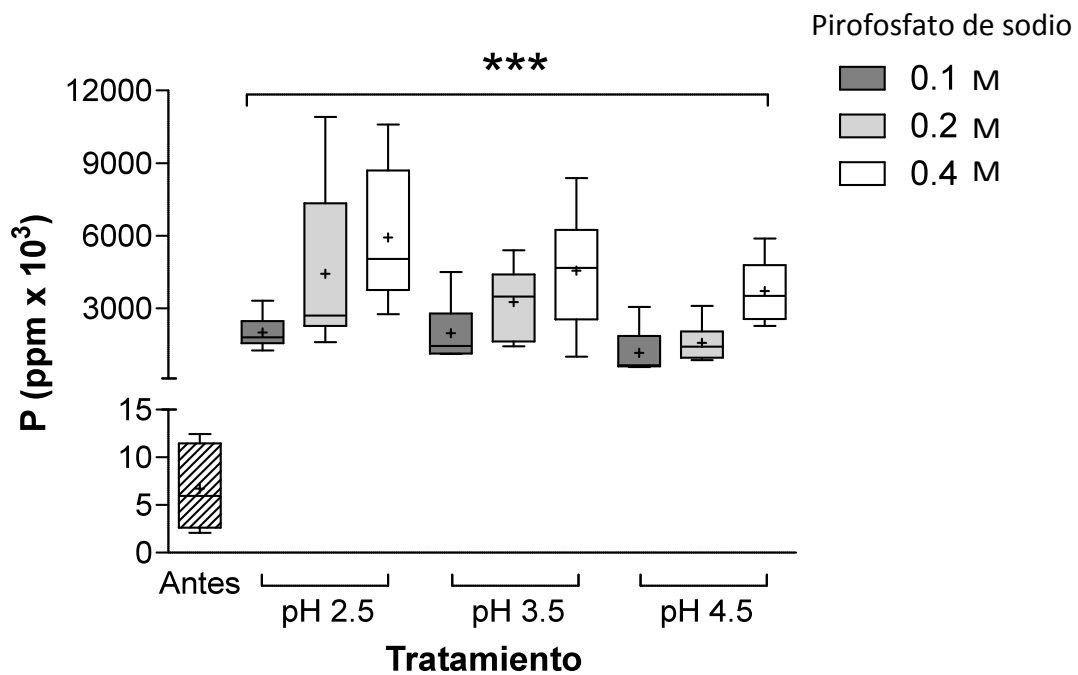


Figura 6. Contenido de fósforo en la proteína de lactosuero bovino después de cada tratamiento de fosforilación. El símbolo + indica la media de cada tratamiento. *** indican diferencias significativas entre cada tratamiento y el control (denotado como “Antes”), ($p < 0.001$).

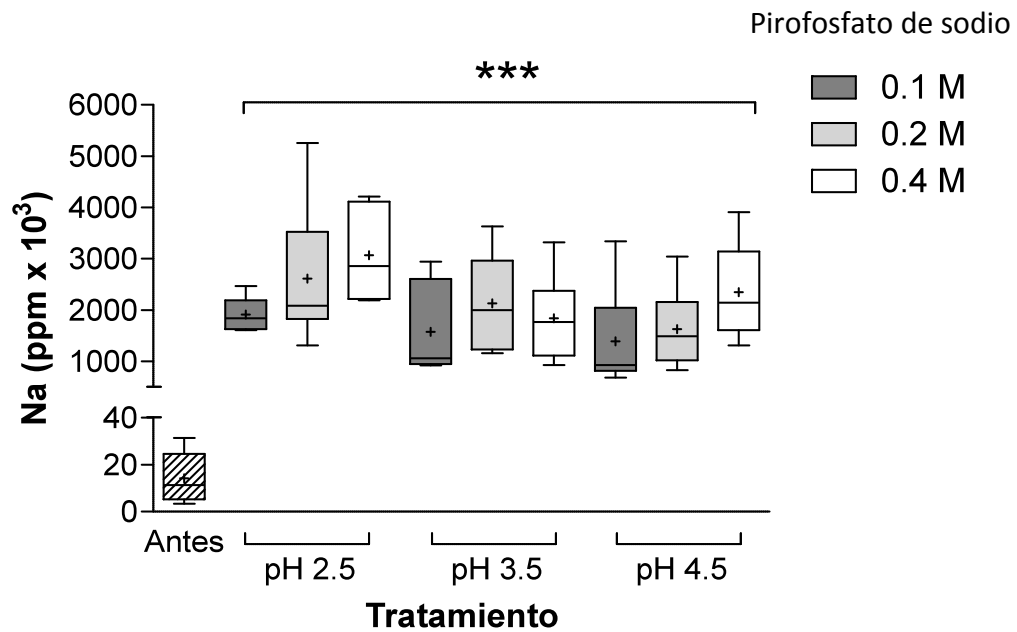


Figura 7. Contenido de sodio en la proteína de lactosuero bovino después de cada tratamiento de fosforilación. El símbolo + indica la media de cada tratamiento.*** indican diferencias significativas al nivel de $p < 0.001$ entre cada tratamiento y el control (denotado como “Antes”).

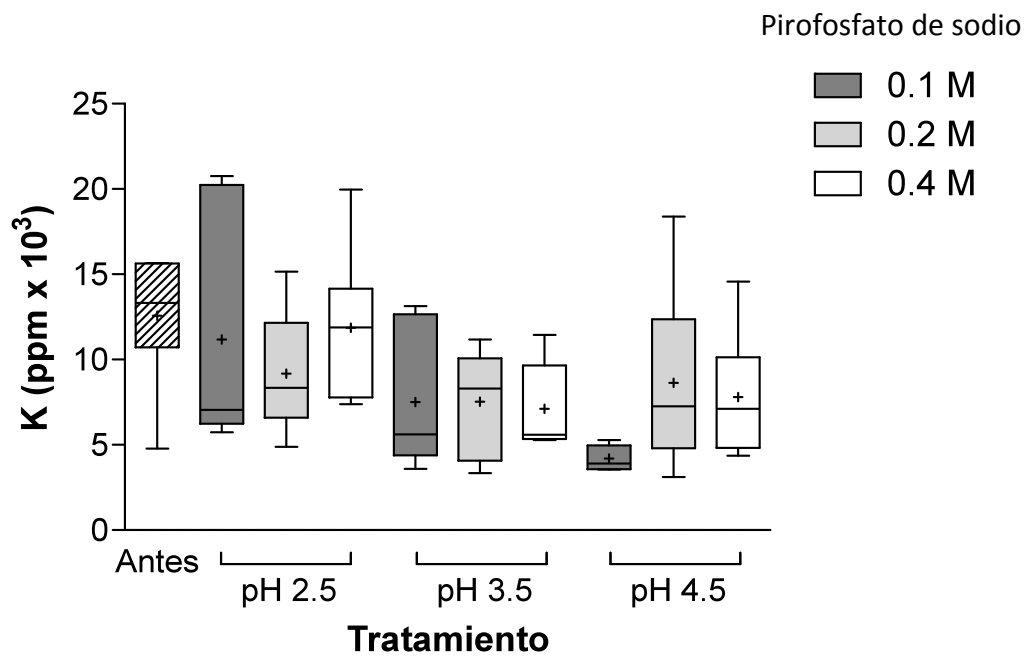


Figura 8. Contenido de potasio en la proteína de lactosuero bovino después de cada tratamiento de fosforilación. El símbolo + indica la media de cada tratamiento. No se encontraron diferencias entre cada tratamiento y el control (denotado como “Antes”).

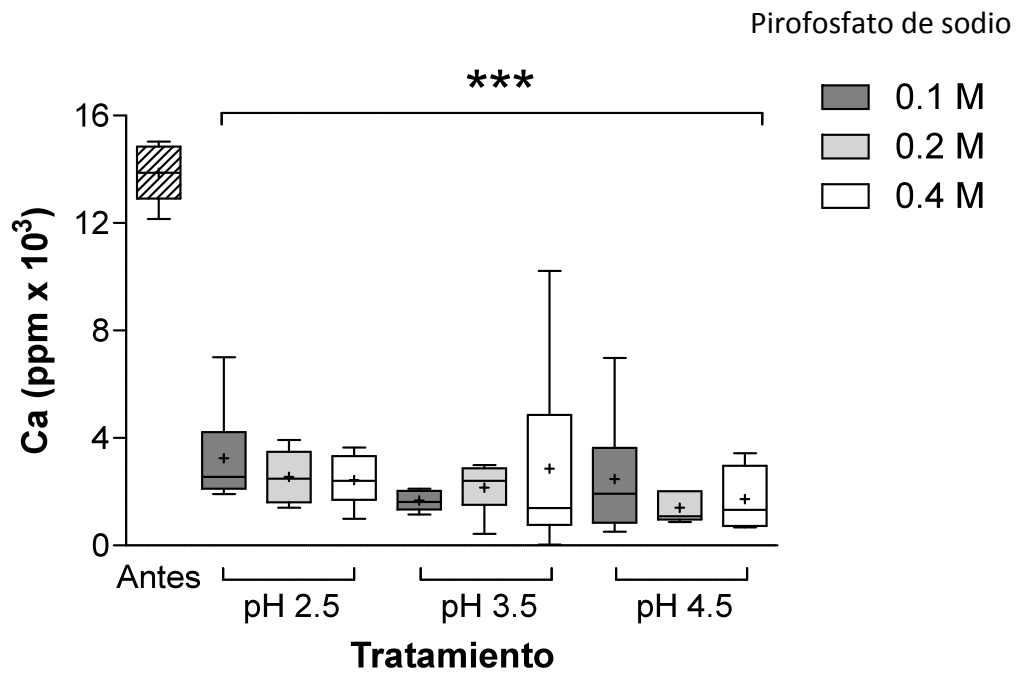


Figura 9. Contenido de calcio en la proteína de lactosuero bovino después de cada tratamiento de fosforilación. El símbolo + indica la media de cada tratamiento.*** indican diferencias significativas al nivel de $p < 0.001$ entre cada tratamiento y el control (denotado como “Antes”).

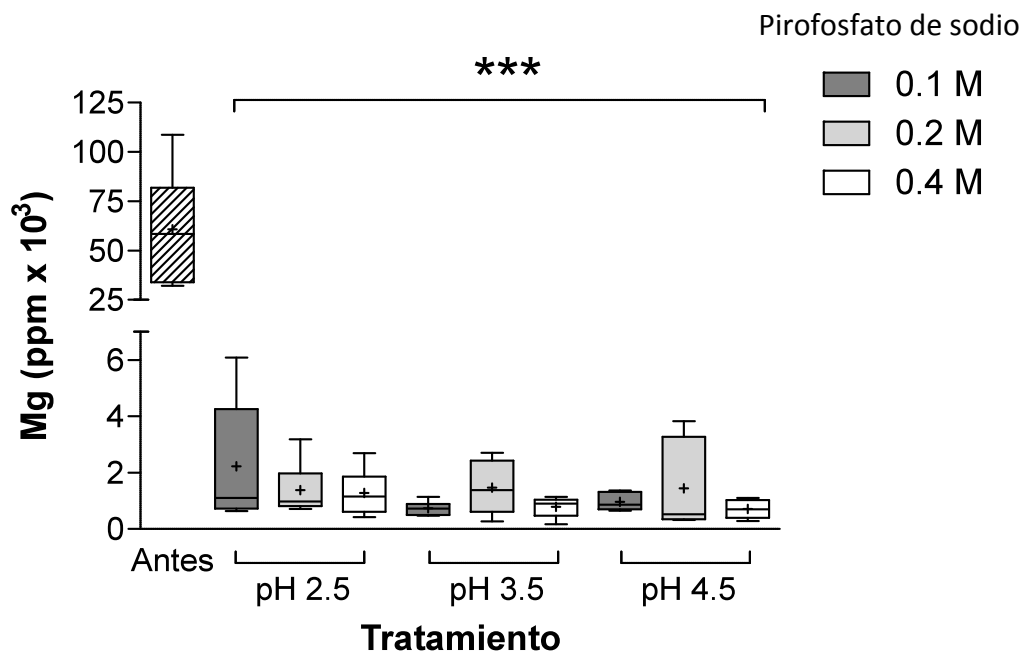


Figura 10. Contenido de magnesio en la proteína de lactosuero bovino después de cada tratamiento de fosforilación. El símbolo + indica la media de cada tratamiento.*** indican diferencias significativas al nivel de $p < 0.001$ entre cada tratamiento y el control (denotado como “Antes”).

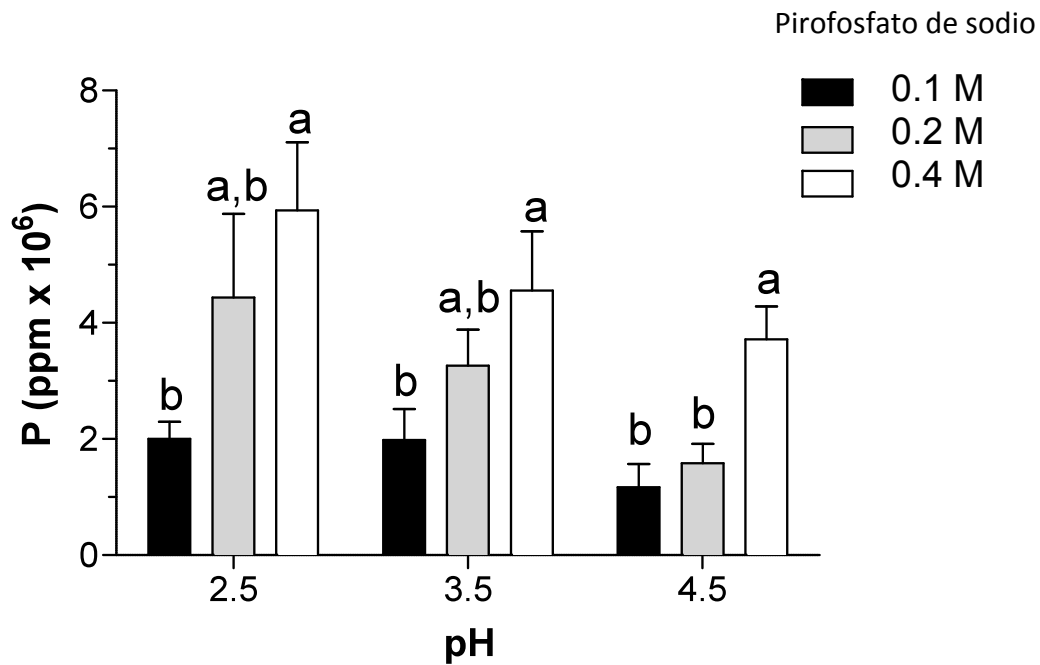


Figura 11. Contenido de fósforo en la proteína de lactosuero bovino fosforilada a diferentes valores de pH y molaridad. Los datos se expresan como la media \pm EE.. ^{a,b} literales distintas dentro de cada valor de pH indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

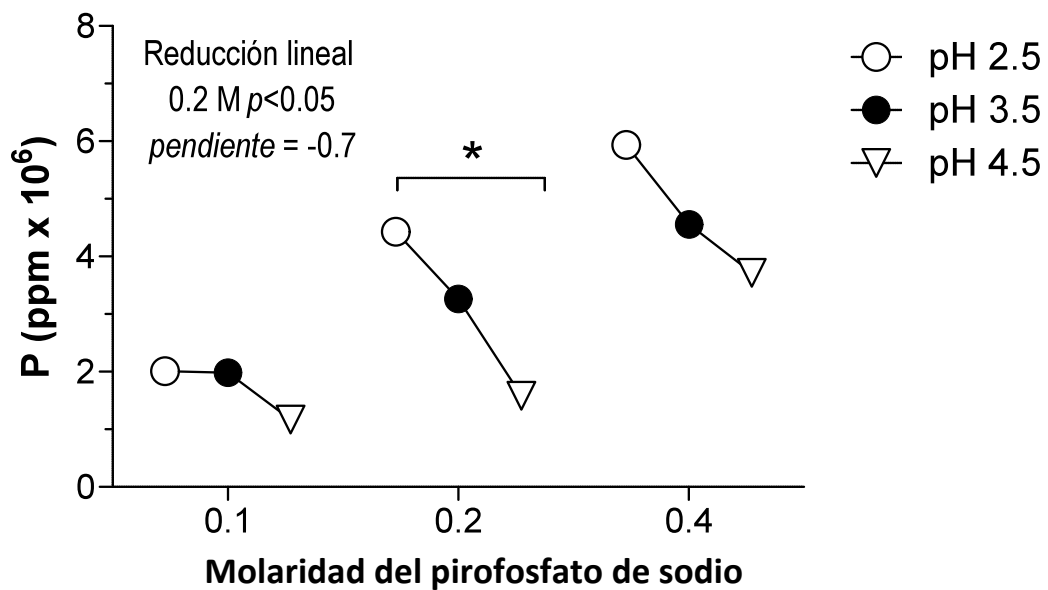


Figura 12. Contenido de fósforo en la proteína de lactosuero bovino fosforilada a diferentes valores de pH y molaridad. Los datos se expresan como la media. El símbolo * indica diferencias significativas entre los valores de pH a cada molaridad evaluada ($p < 0.05$).

Cuadro 7.2
COEFICIENTES DE CORRELACIÓN LINEAL ENTRE MINERALES DE LA
FRACCIÓN PROTEICA DEL LACTOSUERO BOVINO ANTES DE LA
FOSFORILACIÓN

	Na	K	Ca	Mg
P	0.43	0.49	0.54	0.90 *
Na		0.54	-0.26	0.59
K			0.48	0.48
Ca				0.27

* indica un coeficiente de correlación de Pearson (r^2) significativo al nivel de $p < 0.05$.

Cuadro 7.3
COEFICIENTES DE CORRELACIÓN LINEAL ENTRE MINERALES DE LA
FRACCIÓN PROTEICA DEL LACTOSUERO BOVINO DESPUÉS DE LA
FOSFORILACIÓN

	pH 2.5				pH 3.5				pH 4.5			
	0.1 M				0.1 M				0.1 M			
	Na	K	Ca	Mg	Na	K	Ca	Mg	Na	K	Ca	Mg
P	0.94 **	0.58	-0.05	0.19	0.89 *	0.79	0.91 *	0.87 *	0.99 ***	0.97 **	0.80	0.36
Na		0.68	0.09	0.37		0.97 **	0.72	0.72		0.98 ***	0.80	0.41
K			0.74	0.91 *			0.65	0.62			0.91 **	0.54
Ca				0.93 **				0.77				0.63
	0.2 M				0.2 M				0.2 M			
	Na	K	Ca	Mg	Na	K	Ca	Mg	Na	K	Ca	Mg
P	0.99 ***	0.95 **	0.85 *	0.98 ***	0.93 **	0.91 *	0.83 *	0.72	0.97 **	0.95 **	0.85 *	0.76
Na		0.95 **	0.85 *	0.97 ***		0.84 *	0.67	0.57		0.97 **	0.79	0.87 *
K			0.81	0.93 **			0.73	0.57			0.81	0.89 *
Ca				0.78				0.78				0.66
	0.4 M				0.4 M				0.4 M			
	Na	K	Ca	Mg	Na	K	Ca	Mg	Na	K	Ca	Mg
P	0.19	-0.18	0.16	-0.33	0.82 *	0.29	0.31	0.23	0.99 ***	0.97 **	0.57	0.93 **
Na		0.82 *	0.45	0.74		-0.25	-0.27	-0.31		0.98 ***	0.49	0.91 *
K			0.72	0.96 **			0.97 **	0.99 ***			0.55	0.86 *
Ca				0.69				0.99 ***				0.59

*, ** y *** indican coeficientes de correlación de Pearson (r^2) significativos al nivel de $p < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente.

8. Discusión

En este estudio el valor de la densidad en lactosuero entero fue de 25.9 ± 4.0 kg/m^3 y es un parámetro predictivo que permite inferir que entre más alto sea, mayor es el contenido de sólidos en el lactosuero. El índice de regresión de densidad con lactosa fue de 0.9999, densidad con sólidos no grasos: 0.9997; densidad con proteínas: 0.9994 y densidad con sales minerales: 0.9985. Los valores de estas regresiones indican que la densidad es dependiente de estos parámetros. El valor de densidad del lactosuero encontrado en trabajos previos corresponde a 66 kg/m^3 .^{1,8,41} Este parámetro presenta dos posibilidades de discusión: cuando es muy alto se puede referir a que quedaron fuera de la cuajada una buena cantidad de sólidos de la leche, por lo tanto el proceso de coagulación no fue eficiente, pero para los productores de derivados del lactosuero será de una gran utilidad al obtener mayor cantidad de sus derivados y por consecuencia la rentabilidad será mayor. Cuando el lactosuero es de baja densidad, consecuentemente sus derivados se obtendrán en menor cantidad y será menos rentable su utilización.

El valor encontrado de lactosa fue de 3.7 ± 0.5 % y no hay diferencia significativa con el descrito por otros investigadores,^{1,8,41} quienes notifican un promedio de 4.0 – 4.5 % . En otras palabras, los resultados están en el margen inferior de los notificados en la literatura. De alguna forma se debe considerar el tiempo que transcurre mientras se lleva a cabo la medición de la lactosa como un factor determinante de su concentración, debido a los procesos de fermentación antes de la colecta.

La proteína del lactosuero descrita en este trabajo fue 2.5 ± 0.4 % y al compararse con lo reportado en la literatura (0.8 – 1.0 %)^{1,8,41} estos resultados son 3 veces superiores. El hecho de encontrar una cantidad de proteína mayor a lo reportado significa que la leche tenía una mayor cantidad de ésta o que la coagulación durante la producción del queso fue ineficiente. Este último dato puede representar para los fabricantes de queso de la zona una recomendación

para mejorar su sistema de coagulación de la proteína de la leche y por lo tanto tener un mayor rendimiento en la producción de quesos.

El contenido de elementos minerales analizado en lactosuero entero fue de 0.5 ± 0.09 %, y es inferior al descrito en investigaciones previas,^{1,8,41} donde se reportaron valores de 0.8 – 1.0 %. La cantidad de minerales en el lactosuero depende del contenido en la leche. Cantidades inferiores a las reportadas pueden sugerir una deficiencia mineral en la leche que se origina desde una deficiencia en el alimento de la vaca.

En esta investigación se analizó el contenido de los elementos minerales tanto en la fracción proteica como en la fracción hidrosoluble del lactosuero bovino. En la literatura solamente se encontró el contenido de calcio y fósforo en el lactosuero entero¹ por lo tanto no es comparable, y otros autores solamente lo refieren como un contenido total de sales minerales.^{1,8,41} En este estudio es importante resaltar que se midieron además del calcio y el fósforo: sodio, potasio, magnesio, cobre, hierro y zinc, éstos tres últimos no fueron detectados en alguna de las porciones del lactosuero porque las absorbancias estaban por debajo del límite inferior de detección del equipo.

También es conveniente señalar que en la porción proteica el contenido de elementos minerales fue significativamente mayor que en la porción hidrosoluble, esto le da un mayor valor nutritivo al lactosuero ya que estos minerales al estar enlazados a la proteína son más asimilables y tienen una mayor biodisponibilidad.

La información obtenida del contenido de elementos minerales en las dos fracciones del lactosuero es de primera generación. Este hecho se basa en que no se encontró información en la literatura revisada de las cantidades de minerales en las dos fracciones del lactosuero (proteica e hidrosoluble)

En este trabajo la fosforilación de las proteínas del lactosuero se realizó variando el pH y la molaridad del agente fosforilante (pirofosfato de sodio). Antes de la

fosforilación el contenido promedio de fósforo fue de 6700 ppm y después a un pH de 2.5 y 0.4 M aumentó a $5,935 \cdot 10^3$ ppm, de acuerdo al análisis de Dunnet, numéricamente es el valor mayor alcanzado, pero es importante notar que todos los tratamientos resultaron en incremento de en el contenido de fósforo altamente significativo ($p < 0.001$). Por otra parte, en otro estudio de fosforilación de proteínas de lactosuero se realizó a un pH 4.0 y 0.1 M del fosforilante (pirofosfato de sodio) y se llegó a un incremento de la cantidad de fósforo de 25 veces aproximadamente, ya q presentaba un inicial de 0.04 % y después de la fosforilación alcanzaba un porcentaje de 1.04.¹⁷ En otro estudio de fosforilación de proteínas cuando se utilizó con oxiclورو de fósforo como agente fosforilante se reportó un incremento en el contenido de fósforo de 3, 6 y hasta $8 \cdot 10^6$ ppm, que correspondería a un incremento de 1000 veces.⁴² En este trabajo el incremento de fósforo en la proteína fue de 1000 veces al utilizar pirofosfato de sodio (0.4 M) como agente fosforilante a un pH de la proteína de 2.5

Con el análisis de correlación entre los elementos minerales de la porción proteica del lactosuero se observó que mientras el fósforo y el sodio incrementaron, el potasio, calcio y magnesio disminuyeron. Esto se debe a que se utilizó como agente fosforilante pirofosfato de sodio, el cual efectivamente logró incrementar el contenido de fósforo en la proteína y además incrementó el contenido de sodio, esto no sería recomendable en un alimento ya que el consumo en exceso de este mineral está asociado a enfermedades como la hipertensión arterial.

Al elaborar un complemento alimenticio a base de proteínas de lactosuero y enriquecido con fósforo se aprovecha de manera útil el lactosuero y además se elabora un producto recomendado para aquellos individuos que requieren del suplemento del fósforo. Son conocidas las diversas fuentes comerciales de fosfatos inorgánicos que efectivamente son asimilables, mas sin embargo hay que resaltar que estas sales inorgánicas vienen con otros elementos minerales no tan deseables como el arsénico y flúor. La ventaja de la fosforilación es que el fósforo va unido a la proteína, con mayor biodisponibilidad y además libre de elementos

minerales no deseados (arsénico y flúor), como sucede en algunos fosfatos comerciales.

9. Conclusiones

En esta investigación se lograron analizar algunos componentes y características fisicoquímicas del lactosuero bovino entero así como el análisis de elementos minerales en las porciones proteica e hidrosoluble. Se encontró una mayor concentración de minerales (sodio, potasio, calcio, magnesio, fósforo) en la fracción proteica, lo que le da un mayor valor nutrimental a las proteínas de lactosuero bovino, ya que estos minerales al estar enlazados a la proteína tienen una mayor biodisponibilidad.

Además se lograron identificar las condiciones óptimas de pH y molaridad del agente fosforilante (pirofosfato de sodio) para la fosforilación de la porción proteica del lactosuero bovino.

Se recomienda la deshidratación de la proteína fosforilada para evitar el crecimiento bacteriano y su posible descomposición.

La obtención de la porción proteica es una alternativa de utilización del lactosuero bovino, y su fosforilación permite mejorar su perfil nutrimental, además al utilizarla como ingrediente aumenta el contenido de proteína de un alimento y ofrece excelentes propiedades funcionales a una gran variedad de productos.

Este estudio se realizó a nivel laboratorio; para evaluar la rentabilidad del proceso sería necesario el diseño de una planta piloto.

9. Referencias

- 1.- PANESAR P, KENNEDY J, GANDHI D, BUNKO K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. J Food Chem 2007; 105: 1-14.
- 2.- LINDEN G, LORIENT D. Bioquímica Agroindustrial: revalorización alimentaria de la producción agrícola. 2ª ed. España: Ed Acribia, 1996.
- 3.- Reference Manual for U.S. Whey and lactose products. US Dairy Export Council. 2nd ed. USA, 1999.
- 4.- Protein quality evaluation. Report of the joint FAO/WHO Consultation. 1991
- 5.- ALMÉCIJA M. Obtención de la lactoferrina bovina mediante ultrafiltración de lactosuero. Tesis de Doctorado en Tecnología y Calidad de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad de Granada, España, 2007.
- 6.- BRICZINSKI E, ROBERTS R. Production of an exopolysaccharide-containing whey protein concentrate by fermentation of whey. J Dairy Sci 2002; 85(12): 3189-3197.
- 7.- REVILLION J, BRANDELLI A, AYUB M. Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*. Int J Brazilian Arch BiolTech 2003; 46(1): 121-127.
- 8.- LONDOÑO M. Aprovechamiento del suero ácido de queso doble crema para la elaboración de quesillo utilizando tres métodos de complementación de acidez con tres ácidos orgánicos. Perspectivas en nutrición humana. Rev Perspectivas en Nutrición Humana-Escuela de Nutrición y Dietética-Universidad de Antioquia 2006; 16: 11-20.
- 9.- CARRILLO A. Tratamiento y reutilización del suero de leche. Rev. Conversus IPN México 2002; 10: 27-30.
- 10.- VÁZQUEZ RA, AGUILAR I. Organizaciones lecheras en los Altos Sur de Jalisco: un análisis de las interacciones productivas. Rev Región y Sociedad. México 2010; 22 (48).
- 11.- PARRA R. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. Rev Fac Nal Agro Medellín 2009; 62(1): 4967-4982.

- 12.- AIDER M, HALLEUX D, MELNIKOVA. Skim acidic milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: Impact of processing conditions. *Innov Food Sci and Emerg Tech* 2009; 10(3): 334-341.
- 13.- FERNANDES M, FORNARI R, MAZUTTI M, OLIVEIRA D. 2009. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *J Food Eng* 2009; 90(1): 119–123.
- 14.- El estado mundial de la agricultura y la alimentación 1997. Parte III: La agroindustria y el desarrollo económico. Recuadro: Aprovechamiento de contaminantes: el caso del suero". FAO 1997.
- 15.- GRASELLI M, NAVARRO A, FERNANDEZ H, MIRANDA M, CAMPERI S, CASCONO O. ¿Qué hacer con el suero del queso? Cátedra de Microbiol. Ind. y Biotec. *Rev Ciencia Hoy* 1997; 8(43).
- 16.- KOUTINAS A, PAPAPOSTOLOU H, DIMITRELLOU D, KOPSAHELIS N, KATECHAKI E, BEKATOROU A. Whey valorization: a complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. *J Bioresource Tech* 2009; 100(15): 3734 - 3739.
- 17.- LI CP, ENOMOTO H, OHKI S, OHTOMO H, AOKI T. Improvement of functional properties of whey protein isolate through glycation and phosphorylation by dry heating. *J Dairy Sci* 2005; 88: 4137 – 4145.
- 18.- LONDOÑO M, SEPÚLVEDA J, HERNÁNDEZ A, PARRA J. Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con *Lactobacillus casei*. *Fac Nal Agro Medellín* 2008; 61(1): 4409 – 4421.
- 18.- ALMEIDA K, TAMIME A, OLIVEIRA M. Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Tech* 2009; 42(2): 672 – 678.
- 19.- ALMEIDA K, TAMIME A, OLIVEIRA M. Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. *LWT - Food Sci Tech* 2009; 42(2): 672 – 678.
- 20.- U.S Dairy Export Council, Products, Whey, Application & Formulas.
- 21.- Veisseyre, R. *Lactología Técnica: composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche*. 2ª ed. Acribia. España 1988

- 22.- Hui Y. Dairy science and technology handbook 1. Principles and properties. 1st ed. New York, 1993.
- 23.- FEENEY RE. Chemical modification of food proteins. In: Food proteins: improvement through chemical and enzymatic modification. Adv Chem Ser 160. Am Chem Soc Washington, DC. 1977.
- 24.- FEENEY RE, YAMASAKI RB, GOEGHEGAN KF. Chemical modification of food proteins: an overview. In: Modification of proteins: Food, nutritional, and pharmacological aspects. Adv Chem Ser 198. Am Chem Soc Washington, DC. 1982.
- 25.- RYAN DS. Determinants of the functional properties of proteins and protein derivatives in foods. In: Food Proteins: Improvement through chemical and enzymatic modification. Adv Chem Ser 160. Am Chem. Soc. Washington, DC. 1977.
- 26.- HEIDELBERGER M, DAVIS B, TREFFERS HP. Phosphorylated egg albumin. J Am Chem Soc. 1941; 63:498.
- 27.- MATHEIS G, PENNER MH, FEENEY RE, WHITAKER JR. Phosphorylation of casein and lisozyme by phosphorus oxychloride. J Acric Food Chem 1983; 31:379.
- 28.- SUNG HY, CHEN HJ, LIU TY, SU JC. Improvement of the functionalities of soy protein isolate through chemical phosphorylation. J Food Sci 1983; 48:716.
- 29.- DICKSON IR, PERKINS DJ. Studies on the interaction between purified bovine caseins and alkaline-earth-metal ions. Biochem J 1971; 124:235.
- 30.- FERREL RE, OLCOTT HS, FRAENKEL-CONRAT H. Phosphorylation of proteins with phosphoric acid containing excess phosphorus pentoxide. J Am Chem Soc 1948; 70:2101.
- 31.- YOSHIKAWA M, SASAKI R, CHIBA H. Effects of chemical phosphorylation of bovine casein components on the properties related to casein micelle formation. Agric Biol Chem 1981; 45: 909.

- 32.- LI CP, SALVADOR AS, IBRAHIM HR, SUGIMOTO Y, AOKI T. Phosphorylation of egg white proteins by dry-heating in the presence of phosphate. *J Agric Food Che* 2003; 51: 6808 – 6815.
- 33.- WOO SL, RICHARDSON T. Functional properties of phosphorylated β -lactoglobulin. *J Dairy Sci* 1983; 66:984.
- 34.- KESTER JJ, RICHARDSON T. Modification of whey proteins to improve functionality. *J Dairy Sci* 1984; 67: 2757 – 2774.
- 35.- TARELLI E, WHEELER SF. Drying from phosphate-buffered solutions can result in the phosphorylation of primary and secondary alcohol groups of saccharides, hydroxylated amino acids, proteins and glycoproteins. *Anal Biochem* 1994; 222: 196 – 201.
- 36.- McDOWELL L. Minerals in Animal and Human Nutrition. Academic Press, New York 1992; 27-77.
- 37.- Perkin Elmer. Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrometry. The Perkin Elmer Co. Norwalk , CT U.S.A . 1994.
- 38.- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 13th ed., Washington D.C. 1980; 2.021-2.025.
- 39.- SAS Institute Inc., Cary, NC, USA
- 40.- Graphpad Software, Inc.
- 41.- MUÑI, A, PAEZ G, FARÍA J, FERRER J, RAMONES E. Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/ nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. *Rev Científica* 2005; 15(4): 361–367.
- 42.- NAYAK SK, ARORA S, SINDHU JS, SANGWAN RB. Effect of chemical phosphorylation on solubility of buffalo milk proteins. *Int Dairy J.* 2006 ;16:268–273.

11. Anexos

Anexo 1. Arreglo de las condiciones de pH de la proteína y molaridad del pirofosfato de sodio (M) a las que se realizó la fosforilación de la fracción proteica del lactosuero bovino.

MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA
1	2	3	4	5	6
pH 2.5 0.1 M	pH 2.5 0.1 M	pH 2.5 0.1 M	pH 2.5 0.1 M	pH 2.5 0.1 M	pH 2.5 0.1 M
pH 2.5 0.2 M	pH 2.5 0.2 M	pH 2.5 0.2 M	pH 2.5 0.2 M	pH 2.5 0.2 M	pH 2.5 0.2 M
pH 2.5 0.4 M	pH 2.5 0.4 M	pH 2.5 0.4 M	pH 2.5 0.4 M	pH 2.5 0.4 M	pH 2.5 0.4 M
pH 3.5 0.1 M	pH 3.5 0.1 M	pH 3.5 0.1 M	pH 3.5 0.1 M	pH 3.5 0.1 M	pH 3.5 0.1 M
pH 3.5 0.2 M	pH 3.5 0.2 M	pH 3.5 0.2 M	pH 3.5 0.2 M	pH 3.5 0.2 M	pH 3.5 0.2 M
pH 3.5 0.4 M	pH 3.5 0.4 M	pH 3.5 0.4 M	pH 3.5 0.4 M	pH 3.5 0.4 M	pH 3.5 0.4 M
pH 4.5 0.1 M	pH 4.5 0.1 M	pH 4.5 0.1 M	pH 4.5 0.1 M	pH 4.5 0.1 M	pH 4.5 0.1 M
pH 4.5 0.2 M	pH 4.5 0.2 M	pH 4.5 0.2 M	pH 4.5 0.2 M	pH 4.5 0.2 M	pH 4.5 0.2 M
pH 4.5 0.4 M	pH 4.5 0.4 M	pH 4.5 0.4 M	pH 4.5 0.4 M	pH 4.5 0.4 M	pH 4.5 0.4 M

Anexo 2. Características fisicoquímicas del lactosuero bovino entero.

Muestra	Temp. °C	Densidad kg/m ³	Lactosa %	Sólidos no grasos %	Proteínas %	Sales minerales %	Sólidos grasos %	Punto de congelación C
1	10.8	20.87	2.97	5.49	2.07	0.42	nsd	0.318
2	10.6	25.66	3.66	6.77	2.56	0.52	nsd	0.398
3	11.6	28.1	4.01	7.42	2.81	0.58	nsd	0.439
4	10	21.5	3.08	5.72	2.17	0.44	nsd	0.332
5	9.7	30.91	4.41	8.16	3.09	0.63	nsd	0.487
6	11.7	28.56	4.08	7.56	2.87	0.59	nsd	0.448

nsd: no se detectó

Anexo 3. Contenido de elementos minerales (ppm) en la fracción proteica del lactosuero bovino entero.

Muestra	Na	K	Ca	Mg	P
1	15390	13770	13660	50360	2100
2	31320	15620	13880	66570	8310
3	3340	4790	12150	32050	2800
4	5880	12710	15030	34530	3610
5	7280	15650	28080	72810	11120
6	22240	12860	14670	108680	12440

Anexo 4. Contenido de elementos minerales (ppm) en la fracción hidrosoluble del lactosuero bovino entero.

Muestra	Na	K	Ca	Mg	P
1	493	1671	87	134	934
2	653	54	96	33	539
3	361	245	37	37	387
4	433	1385	8	49	914
5	396	1433	111	56	644
6	662	149	36	33	485

Anexo 5. Contenido de fósforo (ppm) en proteína de lactosuero bovino, fosforilada a diferente molaridad y pH

Muestra	Molaridad del pirofosfato de sodio	pH 2.5	pH 3.5	pH 4.5
1	0.1	3.320 *10 ⁶	2.220 *10 ⁶	1.470 *10 ⁶
1	0.2	10.910 *10 ⁶	5.400 *10 ⁶	1.470 *10 ⁶
1	0.4	10.600 *10 ⁶	8.390 *10 ⁶	4.420 *10 ⁶
2	0.1	1.260 *10 ⁶	1.180 *10 ⁶	0.610 *10 ⁶
2	0.2	1.600 *10 ⁶	1.430 *10 ⁶	1.000 *10 ⁶
2	0.4	4.090 *10 ⁶	3.070 *10 ⁶	2.660 *10 ⁶
3	0.1	1.680 *10 ⁶	1.730 *10 ⁶	0.670 *10 ⁶
3	0.2	2.510 *10 ⁶	3.050 *10 ⁶	1.700 *10 ⁶
3	0.4	4.940 *10 ⁶	4.080 *10 ⁶	2.750 *10 ⁶
4	0.1	2.190 *10 ⁶	4.500 *10 ⁶	3.060 *10 ⁶
4	0.2	2.680 *10 ⁶	3.920 *10 ⁶	3.110 *10 ⁶
4	0.4	2.760 *10 ⁶	5.280 *10 ⁶	5.890 *10 ⁶
5	0.1	1.660 *10 ⁶	1.120 *10 ⁶	0.620 *10 ⁶
5	0.2	2.740 *10 ⁶	4.070 *10 ⁶	1.370 *10 ⁶
5	0.4	8.060 *10 ⁶	1.000 *10 ⁶	4.290 *10 ⁶
6	0.1	1.930 *10 ⁶	1.130 *10 ⁶	0.580 *10 ⁶
6	0.2	6.160 *10 ⁶	1.700 *10 ⁶	0.860 *10 ⁶
6	0.4	5.160 *10 ⁶	5.520 *10 ⁶	2.280 *10 ⁶

Anexo 6. Contenido de elementos minerales (ppm) en proteína de lactosuero bovino, fosforilada a pH 2.5

Muestra	Molaridad del pirofosfato de sodio	Na	K	Ca	Mg
1	0.1	2.465 *10 ⁶	20750	3300	3650
1	0.2	5.259 *10 ⁶	15160	3920	3180
1	0.4	4.077 *10 ⁶	12180	2370	1060
2	0.1	1.631 *10 ⁶	6400	2180	1440
2	0.2	1.311 *10 ⁶	4880	1410	0840
2	0.4	2.187 *10 ⁶	7910	1940	0670
3	0.1	1.891 *10 ⁶	20070	6990	6090
3	0.2	1.992 *10 ⁶	7420	1680	710
3	0.4	2.228 *10 ⁶	7380	990	420
4	0.1	2.093 *10 ⁶	7340	1920	750
4	0.2	1.997 *10 ⁶	9280	1890	1070
4	0.4	4.211 *10 ⁶	19970	3220	2690
5	0.1	1.608 *10 ⁶	5730	2650	760
5	0.2	2.172 *10 ⁶	7160	3080	880
5	0.4	2.596 *10 ⁶	12210	3650	1250
6	0.1	1.783 *10 ⁶	6770	2460	640
6	0.2	2.941 *10 ⁶	11160	3340	1580
6	0.4	3.119 *10 ⁶	11570	2450	1590

Anexo 7. Contenido de elementos minerales (ppm) en proteína de lactosuero bovino, fosforilada a pH 3.5

Muestra	Molaridad del pirofosfato de sodio	Na	K	Ca	Mg
1	0.1	2.496 *10 ⁶	12490	1510	740
1	0.2	3.631 *10 ⁶	11170	2840	2710
1	0.4	3.317 *10 ⁶	11450	1600	940
2	0.1	1.097 *10 ⁶	6310	2120	470
2	0.2	1.160 *10 ⁶	3340	0430	270
2	0.4	1.646 *10 ⁶	5600	1010	770
3	0.1	1.018 *10 ⁶	3600	1160	720
3	0.2	2.067 *10 ⁶	9710	1880	730
3	0.4	2.062 *10 ⁶	5400	1180	900
4	0.1	2.943 *10 ⁶	13130	8040	1140
4	0.2	2.738 *10 ⁶	7800	2820	1100
4	0.4	11.733 *10 ⁶	42680	10220	7310
5	0.1	0.953 *10 ⁶	4640	1940	510
5	0.2	1.931 *10 ⁶	8810	2990	2330
5	0.4	0.928 *10 ⁶	5280	30	170
6	0.1	0.918 *10 ⁶	4930	1620	810
6	0.2	1.252 *10 ⁶	4320	1980	1650
6	0.4	1.890 *10 ⁶	7870	3080	1140

Anexo 8. Contenido de elementos minerales (ppm) en proteína de lactosuero bovino, fosforilada a pH 4.5

Muestra	Molaridad del pirofosfato de sodio	Na	K	Ca	Mg
1	0.1	1.609 *10 ⁶	5290	520	650
1	0.2	1.859 *10 ⁶	10360	1090	3090
1	0.4	2.889 *10 ⁶	8670	750	1000
2	0.1	0.862 *10 ⁶	4630	2520	1370
2	0.2	1.083 *10 ⁶	3120	1070	350
2	0.4	1.708 *10 ⁶	5920	1010	470
3	0.1	0.988 *10 ⁶	3900	950	1010
3	0.2	1.624 *10 ⁶	8740	870	520
3	0.4	1.704 *10 ⁶	4990	670	290
4	0.1	3.338 *10 ⁶	15080	6980	1300
4	0.2	3.040 *10 ⁶	18390	6320	3830
4	0.4	3.906 *10 ⁶	14570	2820	1100
5	0.1	0.855 *10 ⁶	3600	1440	720
5	0.2	1.346 *10 ⁶	5780	2020	320
5	0.4	2.576 *10 ⁶	8290	3430	940
6	0.1	0.683 *10 ⁶	3550	2400	720
6	0.2	0.826 *10 ⁶	5360	2010	520
6	0.4	1.308 *10 ⁶	4360	1650	440