



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTABLECIMIENTO DE INDICADORES DE**  
**AUTENTICIDAD**  
**EN YOGUR NATURAL**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:**  
**NATHALI SÁNCHEZ SARMIENTO**

**MÉXICO, CDMX**

**2017**





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.

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:**                   **Profesor: Francisco Rojo Callejas**  
**VOCAL:**                         **Profesor: Sandra Pérez Munguía**  
**SECRETARIO:**               **Profesor: Gloria Díaz Ruíz**  
**1er. SUPLENTE:**             **Profesor: Francisco Ruíz Terán**  
**2° SUPLENTE:**               **Profesor: Amelia Farrés González-Saravia**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio 300 del Departamento de Alimentos y Biotecnología del Edificio E de la Facultad de Química de la UNAM. Circuito de la Investigación Científica s/n Ciudad Universitaria.

### **ASESOR DEL TEMA:**

---

**M. en C. Sandra Pérez Munguía**

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

**Dra. Amelia Farrés González-Saravia**

### **SUSTENTANTE:**

---

**Nathali Sánchez Sarmiento**

*El genio se hace con 1 % de talento y 99 % de trabajo*

Albert Einstein

## Índice

	Lista de símbolos y abreviaturas	i
	Índice de figuras y tablas	v
	Resumen	viii
1.	Introducción	1
2.	Planteamiento del problema	3
3.	Objetivo general	4
4.	Objetivos específicos	4
5.	Hipótesis	4
6.	Antecedentes	5
6.1	Proteínas de la leche de bovino	5
6.2	Efecto del tratamiento térmico sobre las proteínas lácteas	10
6.3	Breve historia del yogur	13
6.4	Definición de leche fermentada	17
6.5	Mercado mundial y nacional del yogur	18
6.6	Proceso de elaboración del yogur	20
6.6.1	Estandarización de la grasa y de los sólidos no grasos	21
6.6.2	Homogeneización	21
6.6.3	Tratamiento térmico	22
6.6.4	Inoculación con las bacterias ácido lácticas	22
6.6.5	Fermentación	23
6.7	Beneficios del consumo de yogur	24
6.8	Métodos electroforéticos	25
6.8.1	Desarrollo histórico de los métodos electroforéticos	25
6.8.2	Fundamentos de la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio	28
6.8.3	Fundamentos de la electroforesis capilar	29
6.8.4	Aplicaciones de la electroforesis capilar	34
7.	Materiales y métodos	36
7.1	Preparación de las disoluciones amortiguadoras	37

7.2	Elaboración de yogur a partir de leche enriquecida con leche en polvo, suero quesería y caseinatos	38
7.3	Análisis fisicoquímicos de las muestras de yogur natural batido	39
7.3.1	Determinación de la acidez titulable y medición del pH	39
7.3.2	Determinación del grado de sinéresis de las muestras de yogur natural batido	40
7.4	Determinación de la viscosidad de las muestras de yogur elaboradas en el laboratorio	40
7.5	Preparación de las muestras de yogur natural batido para los ensayos de solubilidad y electroforéticos	41
7.6	Ensayo de solubilidad de las muestras de yogur	41
7.7	Determinación de proteína soluble mediante el método modificado de Lowry	42
7.8	Ensayos electroforéticos realizados a las muestras de yogur natural batido	42
7.8.1	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio	42
7.8.2	Electroforesis capilar de zona	43
8.	Resultados y análisis de resultados	45
8.1	Análisis fisicoquímicos de las muestras de yogur natural batido: acidez titulable y pH	45
8.2	Grado de sinéresis de las muestras de yogur natural batido	46
8.3	Viscosidad de las muestras de yogur elaboradas en el laboratorio	50
8.4	Solubilidad de las muestras de yogur y contenido de proteína soluble	52
8.5	Análisis electroforéticos realizados a las muestras de yogur natural batido	55
8.5.1	Perfiles electroforéticos de la fracciones soluble e insoluble y del sobrenadante de sinéresis obtenidos mediante SDS-PAGE	55
8.5.2	Perfiles electroforéticos de la fracción soluble de las muestras comerciales de yogur obtenidos mediante electroforesis capilar de zona	62

9.	Conclusiones	69
10.	Perspectivas	70
11.	Bibliografía	71
12.	Apéndices	84
	Apéndice A Prueba LSD para determinar si existe diferencia significativa en el grado de sinéresis de las muestras de yogur	84
	Apéndice B Determinación de proteína soluble por el método modificado de Lowry	85
	Apéndice C Formulación de los geles concentrador y separador y preparación de las disoluciones amortiguadoras usadas en SDS-PAGE	87
	Apéndice D Electroforegramas de las muestras de leche pasteurizada y de yogur comercial	89

## Lista de símbolos y abreviaturas

$\alpha$ -LA	alfa-lactoalbúmina
$\alpha_{s0}$ -CN	alfa-caseína-s <sub>0</sub>
$\alpha_{s1}$ -CN	alfa-caseína-s <sub>1</sub>
$\alpha_{s2}$ -CN	alfa-caseína-s <sub>2</sub>
Ala	alanina
Asp	ácido aspártico
$\beta$ -CN	beta-caseína
$\beta$ -LG	beta-lactoglobulina
°C	grado Celsius
cm	centímetro
Cys	cisteína
Da	dalton
g	gramo
Gly	glicina
h	hora
His	histidina
Hz	hertz
Ig	inmunoglobulina
$\kappa$ -CN	kappa-caseína
kDa	kilodalton
kg	kilogramo
kV	kilovolt
L	litro
Lf	lactoferrina
Lys	lisina
M	molar
mg	miligramo
mL	mililitro
min	minuto



mm	milímetro
mM	milimolar
MPa	megapascal
MΩ	megaohm
N	Normal
nm	nanómetro
μg	microgramo
μm	microlitro
s	segundo
UA	unidad de absorbancia
V	volt
Val	valina
V cm <sup>-1</sup>	vol por centímetro
%	por ciento
% C	por ciento de bisacrilamida
% m/m	por ciento masa/masa
% T	por ciento de poliacrilamida
% v/v	por ciento volumen/volumen
±	más menos
>	mayor que
<	menor que
ζ	potencial zeta
AAPM	agregados de alto peso molecular
APS	persulfato de amonio (por sus siglas en inglés)
AT	acidez titulable
BAL	bacterias ácido lácticas
BSA	albúmina sérica bovina (por sus siglas en inglés)
CAS	caseínas
CCP	fosfato de calcio coloidal (por sus siglas en inglés)
CENAM	Centro Nacional de Metrología
Cr	concentración relativa

c.v.	coeficiente de variación
d.i.	diámetro interno
desv. stdr.	desviación estándar
DTT	DL-ditiotreitól
EC	electroforesis capilar
ECZ	electroforesis capilar de zona
EDTA	sal disódica del ácido etilendiamino tetraacético (por sus siglas en inglés)
EMIM	Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (por sus siglas en inglés)
FEO	flujo electroosmótico
HPMC	hidroxipropilmetil celulosa
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
LC	leche cruda liofilizada certificada por el CENAM
LH	bajo calor (por sus siglas en inglés)
LP	leche pasteurizada
LSD	diferencia mínima significativa (por sus siglas en inglés)
LUHT	leche ultrapasteurizada
MHEC	metilhidroxietil celulosa
MOPS	ácido-3-morfolino propanosulfónico (por sus siglas en inglés)
MPc	leche pasteurizada descremada
NMX	Norma Mexicana
NOM	Norma Oficial Mexicana
pH	potencial de hidrógeno
pI	punto isoeléctrico
PS	proteínas del suero
psi	libra-fuerza por pulgada cuadrada (por sus siglas en inglés)
PVDF	polifloruro de vinilideno (por sus siglas en inglés)
r.c.f.	fuerza centrífuga relativa (por sus siglas en inglés)
r.p.m.	revoluciones por minuto

S	suero de quesería desmineralizado
SDS	dodecil sulfato de sodio (por sus siglas en inglés)
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (por sus siglas en inglés)
SNG	sólidos no grasos
TEMED	tetrametil etilendiamina
tm	tiempo de migración
tmr	tiempo de migración relativo
UFC	unidades formadoras de colonias
UHT	ultra alta temperatura (por sus siglas en inglés)
WHO	Organización Mundial de la Salud (por sus siglas en inglés)
YNA	yogur comercial A
YNB	yogur comercial B
YNC	yogur elaborado a partir de leche enriquecida con caseinatos
YNSD	yogur elaborado a partir de leche enriquecida con suero desmineralizado
YNLP	yogur elaborado a partir de leche enriquecida con leche en polvo
YNS	yogur comercial S
YNU	yogur comercial U

## Índice de figuras y tablas

Figura 1	Micela de caseína de la leche de bovino	6
Figura 2	Sitio de unión de la $\alpha$ -LA al calcio	9
Figura 3	Productos de entrecruzamiento de las proteínas	12
Figura 4	Caricatura parodiando el entusiasmo de Metchnikoff por los probióticos como una panacea	15
Figura 5	Anuncio de yogur en el periódico La Vanguardia de 1911	16
Figura 6	Producción de yogur en México del año 2010 a la primera mitad del año 2016	19
Figura 7	Esquema general del proceso elaboración de yogur	20
Figura 8	Representación esquemática de la coalescencia de la grasa de la leche y de su recubrimiento después del proceso de homogeneización	22
Figura 9	Disminución del pH durante el proceso de fermentación y su efecto en las proteínas de la leche	24
Figura 10	Instrumentación básica en la electroforesis capilar	30
Figura 11	Representación esquemática del flujo electroosmótico	32
Figura 12	Inyección electrocinética	33
Figura 13	Modalidades de la inyección hidrodinámica	33
Figura 14	Diagrama de bloques de la estrategia experimental empleada	36
Figura 15	Muestras de yogur natural elaboradas en el laboratorio	51
Figura 16	Relación entre el precio del yogur y su contenido de proteína declarada en la etiqueta	54
Figura 17	SDS-PAGE. Muestras de leche cruda e industrializada bajo condiciones reductoras y no reductoras	56
Figura 18	Muestras del sobrenadante de la determinación de sinéresis de las muestras de yogur natural batido	59
Figura 19	SDS-PAGE. Muestras de yogur comercial natural batido bajo condiciones reductoras y no reductoras	61

Figura 20	SDS-PAGE. Muestras de yogur natural batido elaborado en el laboratorio bajo condiciones reductoras y no reductoras	61
Figura 21	Electroforegramas de muestras de leche pasteurizada, yogur natural batido comercial y leche ultrapasteurizada	63
Figura 22	Concentración relativa de las principales proteínas lácteas en las muestras comerciales de yogur y leche pasteurizada	67
Figura 23	Curvas de calibración utilizadas para la determinación de proteína soluble	86
Figura 24	Gráficos de los residuales de las curvas de calibración empleadas en la determinación de proteína soluble	86
Figura 25	Perfil electroforético de leche pasteurizada réplica 1	89
Figura 26	Perfil electroforético de leche pasteurizada réplica 2	90
Figura 27	Perfil electroforético de la muestra YNA réplica 1	91
Figura 28	Perfil electroforético de la muestra YNA réplica 2	92
Figura 29	Perfil electroforético de la muestra YNB réplica 1	93
Figura 30	Perfil electroforético de la muestra YNB réplica 2	94
Figura 31	Perfil electroforético de la muestra YNS réplica 1	95
Figura 32	Perfil electroforético de la muestra YNS réplica 2	96
Figura 33	Perfil electroforético de la muestra YNU réplica 1	97
Figura 34	Perfil electroforético de la muestra YNU réplica 2	98
Tabla 1	Características principales de las proteínas de leche de bovino	10
Tabla 2	Principales componentes del equipo de electroforesis capilar	31
Tabla 3	Aplicaciones de la electroforesis capilar en el área de la leche y productos de la leche de 1992 a 2016	35
Tabla 4	Determinación de acidez titulable y pH realizada a las muestras de yogur natural batido	46
Tabla 5	Grado de sinéresis de las muestras de yogur natural batido	48
Tabla 6	Contenido de proteína soluble en el sobrenadante de la prueba de sinéresis	50

Tabla 7	Concentración de proteína soluble de las muestras de yogur natural batido	53
Tabla 8	Pesos teóricos y calculados de las principales proteínas de la leche	58
Tabla 9	Tiempos de migración relativos promedio de las principales proteínas lácteas de las muestras de yogur comercial y leche pasteurizada	66
Tabla 10	Concentración relativa promedio de las principales proteínas lácteas en las muestras de yogur comercial y leche pasteurizada	67
Tabla A	Comparación de medias de la prueba de sinéresis de las muestras de yogur analizadas	84
Tabla B	Composición del reactivo CTC (cobre-tartrato-carbonato)	85
Tabla C1	Composición del gel concentrador (1.0 mm de espesor, 4 % T, 2.6 %C)	87
Tabla C2	Composición del gel de separación (1.0 mm de espesor, 12.5 % T, 2.6 %C)	87
Tabla D1	Parámetros de integración leche pasteurizada, réplica 1	89
Tabla D2	Parámetros de integración leche pasteurizada, réplica 2	90
Tabla D3	Parámetros de integración yogur natural A, réplica 1	91
Tabla D4	Parámetros de integración yogur natural A, réplica 2	92
Tabla D5	Parámetros de integración yogur natural B, réplica 1	93
Tabla D6	Parámetros de integración yogur natural B, réplica 2	94
Tabla D7	Parámetros de integración yogur natural S, réplica 1	95
Tabla D8	Parámetros de integración yogur natural S, réplica 2	96
Tabla D9	Parámetros de integración yogur natural U, réplica 1	97
Tabla D10	Parámetros de integración yogur natural U, réplica 2	98

## Resumen

Ante la demanda de métodos analíticos que garanticen la autenticidad y la calidad de los productos lácteos se buscó extender el alcance del método de prueba descrito en la NMX-F-736/1-COFOCALEC-2012, relativo a la detección y cuantificación de las principales proteínas de la leche por electroforesis capilar de zona (ECZ), para el análisis del yogur natural batido.

Todas las muestras de yogur cumplieron con los valores establecidos de acidez titulable y pH. Sin embargo, estos valores no se traducen en indicadores efectivos que aseguren que un producto con la denominación de yogur lo sea.

Se determinó la sinéresis tanto a muestras comerciales de yogur como a muestras elaboradas en el laboratorio a partir de leche enriquecida con leche en polvo, caseinatos y suero de quesería desmineralizado. La mejor consistencia se logró utilizando leche en polvo y la de menor viscosidad correspondió a la elaborada con el suero. A mayor contenido de proteína menor sinéresis, siempre y cuando se conserve la relación natural de las proteínas propias de la leche de bovino: caseínas 80 % y proteínas del suero 20 %.

En los perfiles proteínicos de las muestras de yogur obtenidos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) de la fracción soluble e insoluble, se detectaron agregados de alto peso molecular (AAPM) resistentes a los agentes reductores, por lo que podrían ser productos del entrecruzamiento de las proteínas.

En los electroforegramas de la fracción soluble de las muestras comerciales del yogur se observó una deformación de las señales, menor altura de los picos y modificación en la línea base, encontrando que la abundancia varía entre el 87 % al 90 % y de 11 % al 9 % para las caseínas y proteínas del suero, respectivamente.

Estos resultados indicarían que las proteínas sufrieron un tratamiento térmico excesivo.

En conclusión, la metodología de la NMX-F-736/1-COFOCALEC-2012 se logró aplicar al estudio de la fracción proteínica del yogur natural batido y se pudo detectar la aplicación de un tratamiento térmico excesivo a la leche usada en la elaboración del yogur. Sin embargo, es necesario seguir trabajando para optimizar el método y analizar yogur en otras presentaciones (bebible, con fruta, con mayor o menor contenido de proteína).



## 1. Introducción

Los hábitos alimenticios de la población a nivel mundial se han modificado con el paso de los años, como resultado del cambio del estilo de vida. La gente ahora muestra mayor interés en su salud y vigila su dieta para prevenir problemas médicos futuros o para tratar algún padecimiento médico actual (Shiby y Mishra, 2013). Como consecuencia, recientemente se ha presentado una marcada tendencia hacia el consumo de productos mínimamente procesados, saludables y/o funcionales (Sloan, 2015), tal y como es el caso del yogur, el más popular de los productos lácteos fermentados.

El contenido proteínico del yogur, y en general de los productos lácteos, eleva su valor comercial y nutricional, por lo que es imprescindible verificar que las proteínas no se reemplacen con proteínas no lácteas de menor valor nutricional y de menor costo, con el consiguiente fraude al consumidor (Scholl *et al.*, 2014). De igual forma, es necesario asegurarse que las proteínas de estos productos no presenten daño térmico, resultado de la aplicación de un calentamiento excesivo durante el procesamiento o de que fueron elaborados a partir de ingredientes con daño térmico previo.

Una de las consecuencias del daño térmico de las proteínas lácteas es la formación de compuestos insolubles de alto peso molecular (> 500 kDa) entre las proteínas y los demás componentes de la leche, que son resistentes a la acción de las enzimas digestivas lo que reduce el valor biológico de las proteínas (Wada y Lonnerdal, 2014; Manzo *et al.*, 2015).

Dentro de la variedad de yogures que se comercializan en el país, no todos cumplen con las especificaciones mínimas necesarias que garanticen su calidad (PROFECO, 2006). Los parámetros establecidos en la normatividad vigente (NOM-185-SSA1-2002, NOM-181-SCFI-2010, NMX-703-COFOCALEC-2012) que regulan

la producción y comercialización del yogur son ambiguos al no establecer en un solo documento las características que debe cumplir este producto lácteo.

La autenticidad y la calidad de los alimentos son temas de gran relevancia entre los consumidores, los investigadores, la industria y los órganos reguladores. Se dice que una materia prima o un producto terminado es auténtico cuando la información contenida en la etiqueta o en los envases es veraz, y se describe y se presenta de forma tal, que no induce al error con respecto a la naturaleza y características del producto, principalmente en términos de los ingredientes y la tecnología de producción (De La Fuente y Juárez, 2005). Por su parte, la calidad de un alimento se refiere al conjunto de características que lo hacen agradable a los sentidos, adecuado para su consumo e inocuo (Martínez *et al.*, 2004).

De lo anterior, surge la necesidad del desarrollo de métodos y normas que permitan garantizar la autenticidad y la calidad de la leche y de los productos lácteos. Ante tal situación, las técnicas electroforéticas se proponen como una alternativa para analizar la fracción proteínica del yogur, mismas que se han aplicado para la separación, identificación y cuantificación de las proteínas lácteas, entre ellas, la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Kinghorn *et al.*, 1995; Veloso *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2010; Wada y Lonnerdal, 2014) y la electroforesis capilar (EC) (De Jong *et al.*, 1993; Recio *et al.*, 1995; Recio *et al.*, 1997a; Recio *et al.*, 1997b; Miralles *et al.*, 2000).

Estudios previos demostraron inequívocamente la presencia de proteínas de soya en leche a un nivel de adición del 5 % por SDS-PAGE y se demostró mediante un estudio interlaboratorios que el método instrumental es selectivo y específico para cuantificar simultáneamente a las principales proteínas lácteas, por lo que el perfil proteínico representa la huella digital con el que se puede caracterizar a la leche (NMX-F-736/1-COFOCALEC 2012), de ahí el interés en extender su aplicación al análisis de la fracción proteínica del yogur natural batido.

## **2. Planteamiento del problema**

El yogur es el alimento lácteo fermentado de mayor consumo en México, cuyo valor nutrimental y comercial está dado por su contenido de proteína, por lo que es necesario vigilar que no sea adulterado por la adición de proteínas no lácteas.

Desafortunadamente, la normatividad vigente que regula la producción, comercialización y métodos de prueba para el análisis del yogur es confusa, además de que las pruebas fisicoquímicas que se usan como indicadores de autenticidad y calidad son insuficientes para asegurar que un producto con la denominación de yogur lo sea, dificultando la inspección de las autoridades.

La falta de herramientas analíticas que permitan verificar la calidad y autenticidad del yogur fue lo que impulsó el desarrollo de esta investigación. Se tomó como referencia la NMX-F-736/1-COFOCALEC 2012, en la cual se describe la metodología para detectar y cuantificar a las proteínas lácteas mediante ECZ, técnica con gran auge internacional pero poco aplicada en el país. Para complementar el análisis la fracción proteínica del yogur también se analizó mediante SDS-PAGE.

Se encontró que la metodología de la NMX-F-736/1-COFOCALEC 2012 es útil para el análisis del yogur natural batido y determinar si existe adulteración con proteínas de diferente origen. Adicionalmente, mediante los análisis electroforéticos se pudo evidenciar la aplicación de un tratamiento térmico excesivo a la leche durante la manufactura del producto. Estos resultados son importantes porque son los primeros que se tienen reportados sobre el uso de las técnicas electroforéticas para el análisis del yogur en nuestro país.

### **3. Objetivo general**

Ampliar el alcance de las técnicas de electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida y electroforesis capilar de zona para el estudio de la fracción proteínica del yogur natural batido y obtener información en torno a su calidad y autenticidad.

### **4. Objetivos específicos**

Determinar la acidez titulable y el pH en muestras de yogur natural batido siguiendo la metodología descrita en la normatividad vigente.

Medir la sinéresis y el contenido de proteína soluble en las muestras de estudio.

Obtener el perfil electroforético de las principales proteínas lácteas de muestras de yogur natural batido empleando la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

Identificar y cuantificar las principales proteínas lácteas presentes en el yogur mediante electroforesis capilar de zona, extendiendo el alcance del método de prueba descrito en la NMX-F-736/1-COFOCALEC 2012, relativo a la detección y cuantificación de las principales proteínas de la leche de bovino.

### **5. Hipótesis**

Sí en la elaboración de yogur natural existe la adición de sólidos no lácteos o de proteínas que han sido expuestas a un tratamiento térmico excesivo, se podrá evidenciar tal situación mediante los análisis electroforéticos.

## 6. Antecedentes

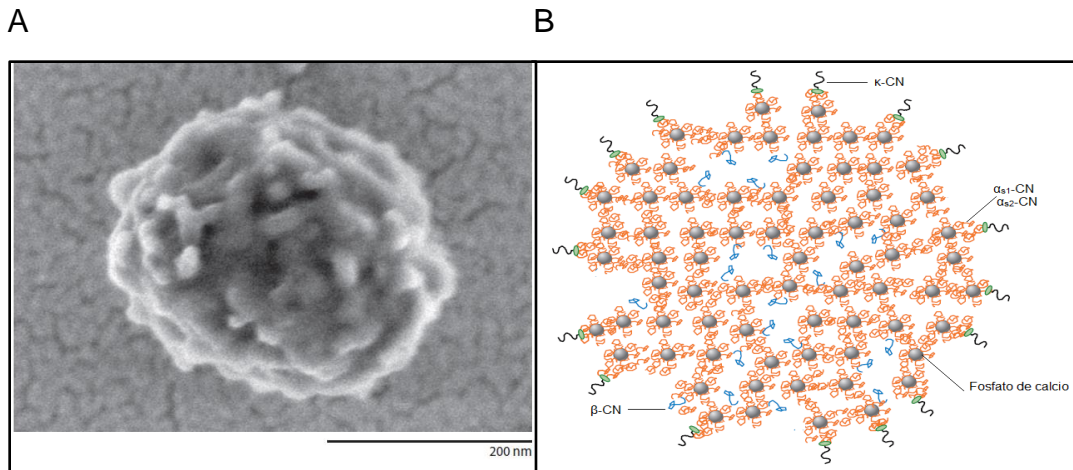
### 6.1 Proteínas de la leche de bovino

#### Caseínas

Las proteínas de la leche están constituidas por las caseínas (80 %) y las proteínas del suero (20 %). Las caseínas son una familia de fosfoproteínas integradas por alfa-caseína-s<sub>1</sub> ( $\alpha_{s1}$ -CN), alfa-caseína-s<sub>2</sub> ( $\alpha_{s2}$ -CN), beta-caseína ( $\beta$ -CN) y kappa-caseína ( $\kappa$ -CN), en una proporción aproximada de 4:1:3.5:1.5, respectivamente (Dalglish y Corredig, 2012).

Las caseínas se encuentran asociadas en estructuras de forma casi esférica, llamadas micelas de caseína, compuestas por aproximadamente 92 % de proteína y el 8 % restante constituido por sales solubles (v.g., sodio, potasio, cloruro) y en estado coloidal asociados íntimamente a las proteínas (fosfato de calcio, fosfato de magnesio, citrato de calcio, citrato de magnesio) (Fox y Kelly, 2012).

Las micelas tienen diámetros comprendidos entre los 50 nm a 500 nm y un peso molecular que varía de entre los  $10^6$  Da a  $10^9$  Da (Horne, 2014). El tamaño de las micelas de caseína depende de la proporción entre las caseínas. Mientras menor sea el tamaño de las micelas de caseína, mayor será el contenido de  $\kappa$ -CN y menor el de  $\beta$ -CN, independientemente del contenido de  $\alpha_{s1}$ -CN y  $\alpha_{s2}$ -CN (Ferrandini *et al.*, 2006). Lo anterior sugiere que  $\kappa$ -CN está localizada predominantemente en la superficie de la micela,  $\beta$ -CN en el interior y  $\alpha_{s1}$ -CN y  $\alpha_{s2}$ -CN distribuidas en toda la estructura (figura 1) (Dalglish y Corredig, 2012). El hecho de que  $\kappa$ -CN esté predominantemente en la superficie permite el reconocimiento del enlace formado por la fenilalanina (Phe<sub>105</sub>) y la metionina (Met<sub>106</sub>) por parte la quimosina, y proteasas con actividad similar. Además, su ubicación permite que interactúe con la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) desnaturalizada lo que da pauta a la formación de los agregados solubles e insolubles (Rasmussen *et al.*, 1992; Horne, 2014).



**Figura 1. Micela de caseína de leche de bovino.** A. Imagen obtenida mediante microscopia electrónica de barrido de emisión de campo y B. Representación esquemática de la organización de las fosfoproteínas y el fosfato de calcio coloidal. Adaptado de Dalgleish y Corredig, 2012.

La  $\kappa$ -CN le confiere estabilidad a la micela de caseína frente a la agregación, debido a que los residuos de aminoácidos del extremo carboxilo terminal (residuos 106 a 169) que conforman el glicomacropéptido, presentan un carácter hidrofílico y se extienden desde la superficie micelar formando una capa de entre 5 nm a 10 nm de espesor. Esta capa conocida como “peluda” es la responsable de la estabilidad de las micelas de caseína por impedimento estérico (Dalgleish y Corredig, 2012).

Las caseínas contienen altos niveles de prolina (v.g.,  $\beta$ -CN es especialmente rica en este aminoácido, con un contenido de 35 de sus 209 residuos de aminoácidos), esto explica la ausencia de estructuras secundarias y terciarias y como consecuencia la mayoría de sus residuos de carácter hidrofóbico están al descubierto (Farrell, 2011). La falta de estructuras secundarias y terciarias también es responsable de su mayor estabilidad térmica (v.g., la leche puede someterse hasta 140 °C durante 25 min sin ninguna modificación visual aparente) (O’Mahony y Fox, 2014).

Las caseínas son insolubles a un pH de 4.6, por lo que la precipitación isoeléctrica es explotada en la elaboración de productos lácteos fermentados y quesos obtenidos mediante coagulación ácida (Farrell, 2011).

### Proteínas del suero

Las proteínas del suero se componen principalmente de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) y de  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -LA), cuyas abundancias varían entre el 55 % al 60 % y del 15 % al 20 %, respectivamente. Están presentes otras proteínas en menor concentración como: la albúmina sérica bovina (BSA) (del 5 % al 10 %), las inmunoglobulinas (Ig) (del 8 % al 10 %) y la lactoferrina (Lf) (< 0.1 %) (Ambrosi *et al.*, 2016). Las proteínas del suero contienen aproximadamente 1.7 % de azufre en su estructura y contienen mayor cantidad de cisteína (Cys) y cistina que las caseínas; además, a diferencia de las caseínas no son estables al tratamiento térmico y son desnaturizadas por completo a 90 °C por 10 min (O'Mahony y Fox, 2014), como consecuencia ocurre la disociación de los oligómeros, el desplegamiento parcial de su estructura nativa y la exposición de aminoácidos reactivos (Huppertz, 2016).

La  $\beta$ -LG es una proteína globular constituida por 162 residuos de aminoácidos cuyo peso molecular es de 18.3 kDa. Esta proteína puede estar presente como monómero a un pH menor de 3.5 y a pH mayor a 7.5; como dímero, a valores de pH de entre 5.5 a 7.5, y como tetrámero en un intervalo de pH de 3.5 a 5.5. Se han identificado diez variantes genéticas de la  $\beta$ -LG, siendo las más abundantes A y B, que difieren por la sustitución de dos aminoácidos en la posición 64 y 118; la variante A tiene ácido aspártico (Asp<sub>64</sub>) y valina (Val<sub>118</sub>) mientras que la variante B presenta glicina (Gly<sub>64</sub>) y alanina (Ala<sub>118</sub>), respectivamente (Edwards y Jameson, 2014).

La estructura primaria de la  $\beta$ -LG presenta un grupo tiol libre, dos puentes disulfuro intramoleculares entre los residuos de cisteína: Cys<sub>66</sub>-Cys<sub>160</sub> y Cys<sub>106</sub>-Cys<sub>119</sub> y un sulfhidrilo libre en el residuo de Cys<sub>121</sub> (O'Mahony y Fox, 2014). La Cys<sub>121</sub> juega un

papel determinante en el proceso de desnaturalización térmica pues puede reaccionar con los grupos disulfuro de las posiciones 11 y 88 de la  $\kappa$ -caseína afectando la coagulación de la leche en el proceso enzimático de elaboración del queso (Ambrosi, 2016).

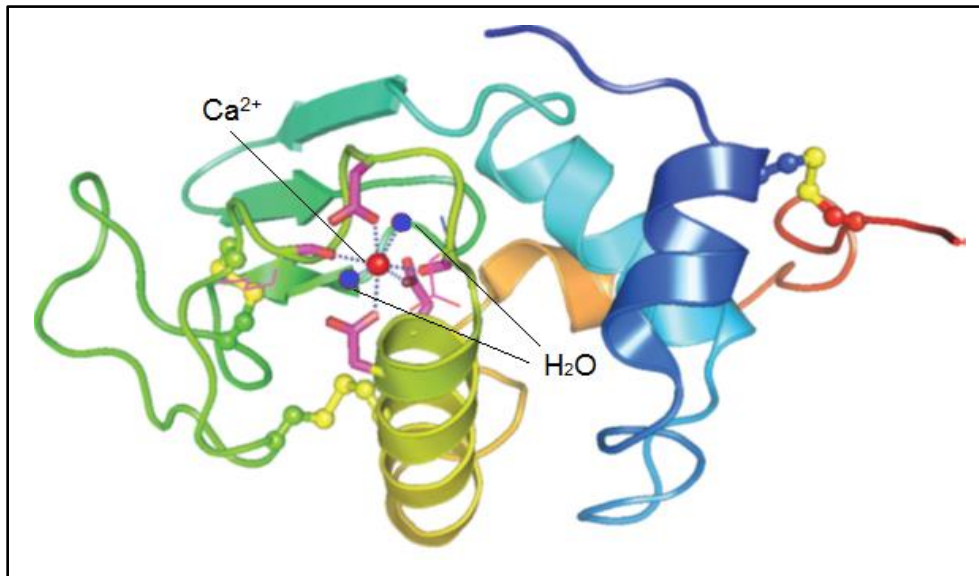
La  $\alpha$ -LA es una proteína globular constituida por 123 residuos de aminoácidos (14.2 kDa) que está presente en la leche de todos los mamíferos y es responsable de regular la síntesis de la lactosa. Sin embargo, a diferencia de  $\beta$ -LG no contiene grupos tiol libres (Brew, 2013).

La estructura nativa de la  $\alpha$ -LA se compone de dos lóbulos: el  $\alpha$ -lóbulo constituido por el extremo amino terminal hasta el residuo 34 y por los residuos 86 al 123 y el  $\beta$ -lóbulo que se extiende por los residuos 35 al 85. La estructura se estabiliza mediante cuatro enlaces disulfuro: Cys<sub>6</sub>-Cys<sub>120</sub> y Cys<sub>28</sub>-Cys<sub>111</sub> en el  $\alpha$ -lóbulo; Cys<sub>60</sub>-Cys<sub>77</sub> en el  $\beta$ -lóbulo, mientras que Cys<sub>73</sub>-Cys<sub>90</sub> mantiene los dos lóbulos juntos (Edwards y Jameson, 2014).

En la zona donde se unen los dos lóbulos, formada por los residuos 79 a 88, se localiza el sitio de unión al calcio, ésta unión le confiere a la proteína una mayor estabilidad ante el tratamiento térmico en comparación con las otras proteínas del suero (O'Mahony y Fox, 2014).

El ión  $\text{Ca}^{2+}$  es coordinado por cinco átomos de oxígeno, tres pertenecientes a los grupos carboxilo de la cadena lateral del Asp<sub>82</sub>, Asp<sub>87</sub>, Asp<sub>88</sub> y dos más por el oxígeno de los grupos carbonilo de los residuos de lisina (Lys), Lys<sub>79</sub> y del Asp<sub>84</sub>. Dos moléculas de agua también participan en el enlace de coordinación, formando una bipirámide ligeramente distorsionada con los grupos ligando de la proteína como se observa en la figura 2. Cuando el pH es menor a 5, el grupo carboxilo del Asp se protona y disocia por lo que deja de unir el calcio (Brew, 2013).





**Figura 2. Sitio de unión de la  $\alpha$ -LA al calcio.** El  $\text{Ca}^{2+}$  (esfera roja) es estabilizado por 7 enlaces de coordinación con los átomos de oxígeno (líneas azules punteadas) de los residuos de Asp<sub>82</sub>, Asp<sub>87</sub>, Asp<sub>88</sub>, Lys<sub>79</sub> y Asp<sub>84</sub> y por dos moléculas de agua (esferas azules). Adaptado de Edwards y Jameson, 2014.

La estructura primaria de la BSA contiene 582 aminoácidos y tiene un peso molecular de 66 kDa. Aparentemente su función es transportar moléculas hidrofóbicas (v.g., ácidos grasos a través de la membrana) (Ambrosi *et al.*, 2016). Por su parte, las inmunoglobulinas (Ig) son una familia de proteínas, siendo la IgG la predominante en el ganado bovino; la IgG está formada por dos cadenas, una ligera y una pesada unidas por enlaces disulfuro, su función es conferir inmunidad pasiva al neonato mientras que su propio sistema inmunológico se desarrolla (Edwards y Jameson, 2014).

Finalmente, la lactoferrina (Lf) es una glicoproteína monomérica globular que tiene una masa molecular de aproximadamente 80 kDa, ésta proteína une hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) por lo que presenta actividad antimicrobiana al privar a los microorganismos de este metal y es usada como nutracéutico en fórmulas infantiles (O'Mahony y Fox, 2014).

**Tabla 1. Características principales de las proteínas de leche de bovino<sup>1</sup>**

	$\alpha_{s1}$ -CN	$\alpha_{s2}$ -CN	$\beta$ -CN	$\kappa$ -CN	$\beta$ -LG	$\alpha$ -LA	BSA	IgG	Lf
<b>Peso molecular (kDa)</b>	23.6	25.2	23.9	19	18.4	14.2	66.4	16.1	80
<b>No. de residuos de aminoácidos</b>	199	207	209	169	162	123	583	508	689
<b>pl (punto isoelectrico)</b>	4.9	5.3	5.2	5.5	5.2	4.8	4.7	-	8.9

<sup>1</sup>Adaptado de Edwards y Jameson, 2014; O'Mahony y Fox, 2014.

## 6.2 Efecto del tratamiento térmico sobre las proteínas lácteas

Por su valor nutricional, la leche es un excelente medio para el crecimiento de los microorganismos, por ello es necesario la aplicación de tratamientos térmicos como la pasteurización o la esterilización en orden de proporcionar un nivel de seguridad aceptable y aumentar la vida útil del producto (Claeys *et al.*, 2002).

Durante el tratamiento térmico de la leche ocurren una serie de cambios entre las proteínas y los demás componentes de la leche, siendo las proteínas del suero las más susceptibles.

A temperaturas superiores a los 70 ° C, las proteínas del suero se desnaturalizan y comienzan a agregarse. Las proteínas del suero desnaturalizadas forman complejos con la  $\kappa$ -CN y en algunos casos con la  $\alpha_{s2}$ -CN (Dalglish y Corredig, 2012), estas interacciones pueden conducir a la formación de AAPM (> 500 kDa) (Patel *et al.*, 2007) mediante interacciones hidrofóbicas o enlaces disulfuro (Manzo *et al.*, 2015), lo que provoca efectos adversos sobre las propiedades sensoriales, nutricionales y fisicoquímicas de la leche y los productos lácteos (Patel *et al.*, 2006; Anema, 2014).

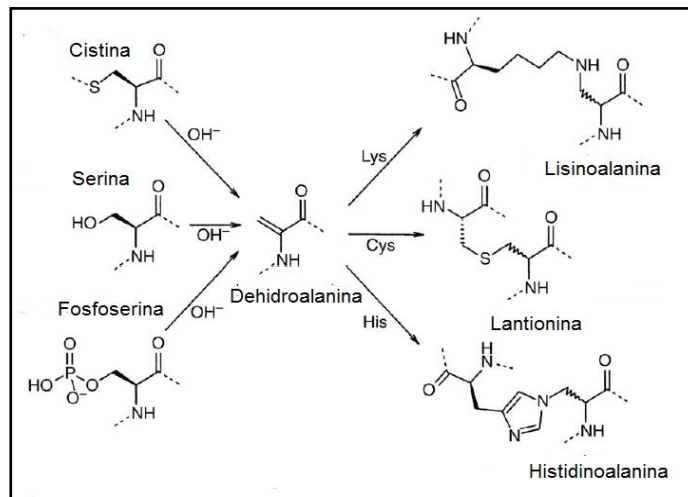
La  $\alpha_{s2}$ -CN a diferencia de  $\kappa$ -CN no reacciona fácilmente con las proteínas del suero desnaturalizadas, aunque se han reportado algunas interacciones cuando se alcanzan temperaturas superiores a los 100 °C (Patel *et al.*, 2006). Esta baja reactividad se atribuye a la ubicación de  $\alpha_{s2}$ -CN en el interior de las micelas de caseína, caso contrario a  $\kappa$ -CN que se encuentra en la superficie de micelas de caseína por lo que es más accesible (Dalglish y Corredig, 2012).

El grado de interacción de las proteínas del suero desnaturalizadas con las micelas de caseína depende de varios factores, tales como: el tiempo, la temperatura y la velocidad de calentamiento, la concentración de las proteínas y el pH de la leche (Anema, 2014).

En estudios de electroforesis en gel aplicados a muestras de leche que fueron expuestas de entre 90 °C a 120 °C se encontró que las bandas correspondientes a BSA, IgG y Lf desaparecen, y disminuyó la intensidad de las bandas de  $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA,  $\kappa$ -CN y en menor proporción  $\alpha_{s2}$ -CN (Anema, 2014). Esto se acompaña con la formación de agregados en el gel concentrador (> 500 kDa). Con la adición de agentes reductores, el patrón de bandas es comparable con el de la leche antes de la aplicación del tratamiento térmico, con lo que se comprobó que las interacciones inter e intramoleculares es mediada mediante la formación de enlaces disulfuro (Patel *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2007).

A partir de los 70 °C se despliegan las estructuras terciarias y secundarias de las proteínas favoreciendo su digestibilidad (Anema, 2014), sin embargo, conforme el tratamiento térmico es más drástico, se han observado modificaciones no enzimáticas en las proteínas lácteas, lo cual repercute negativamente en sus propiedades nutricionales (Wada y Lonnerdal, 2014). Un ejemplo es la reacción de Maillard, en la que los grupos  $\epsilon$ -amino de la Lys reaccionan con el grupo carbonilo de la lactosa para formar los productos de Amadori como la lactulosil-lisina o fructosil-lisina, que posteriormente tras oxidarse forman  $N^{\epsilon}$ -carboximetil lisina (Wada y Lonnerdal, 2015).

El bloqueo de los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de Lys obstaculiza la digestión tróptica, así como la acción de otras enzimas digestivas, por lo que Lys deja de ser biodisponible, lo que reduce el valor biológico de las proteínas. También ocurren reacciones de  $\beta$ -eliminación a los residuos de la fosfoserina y cisteína o cistina, que dan origen a la dehidroalanina, misma que reacciona con los residuos de Lys, Cys e histidina (His) formando productos de entrecruzamiento como la lisinoalanina, lantionina e histidinoalanina respectivamente (figura 3) y que no son hidrolizados por las proteasas (Wada y Lonnerdal, 2014).



**Figura 3. Productos de entrecruzamiento de las proteínas.** Adaptado de Pellegrino *et al.*, 2011.

Los componentes de la leche son afectados negativamente cuando es sometida a tratamientos térmicos excesivos, por lo que resulta importante evaluar el impacto de dichos tratamientos. Para ello se ha propuesto monitorear dos tipos de indicadores:

1. La degradación, desnaturalización o inactivación de compuestos termolábiles como son las proteínas del suero. Las proteínas del suero muestran diferente estabilidad térmica, siendo la  $\alpha$ -LA la más estable seguida de  $\beta$ -LG, BSA e IgG, por lo que la completa fracción proteínica del suero, así como sus componentes individuales, se pueden utilizar como indicadores de tratamiento térmico (Claeys *et al.*, 2002). La desnaturalización de la  $\alpha$ -LA es un buen parámetro para evaluar

tratamientos de esterilización; por su parte, la desnaturalización  $\beta$ -LG es útil para monitorear los tratamientos térmicos desde la pasteurización hasta la ultrapasteurización (Mallik *et al.*, 2015).

2. La formación de nuevos compuestos como la furosina, que es el producto de la hidrólisis de la lactulosil-lisina o la lactulosa, resultante de la isomerización de la lactosa (Lan *et al.*, 2010). Normalmente la lactulosa no se produce en leche fresca ni en la leche pasteurizada, sino sólo en leche ultrapasteurizada (LUHT) y leche esterilizada, por lo que el contenido de lactulosa se considera un indicador adecuado para este tipo de tratamientos térmicos (Mallik *et al.*, 2015).

### **6.3 Breve historia del yogur**

Las leches fermentadas se han producido y consumido en el Oriente Medio, India y Europa oriental por siglos. Se cree que la versión ancestral del yogur apareció probablemente hace 9 000 u 8 000 años a. C., después de que los seres humanos pasaran de ser recolectores a cultivar sus alimentos y a domesticar animales (Tamime y Robinson, 2007).

Originalmente, este tipo de alimentos resultaron de la fermentación espontánea de la leche tras almacenarla en bolsas de piel de cabra durante los días cálidos, lo que provocó su acidificación y coagulación, dando por resultado una manera eficiente de preservar este alimento vulnerable al deterioro (Corrieu y Beal, 2016).

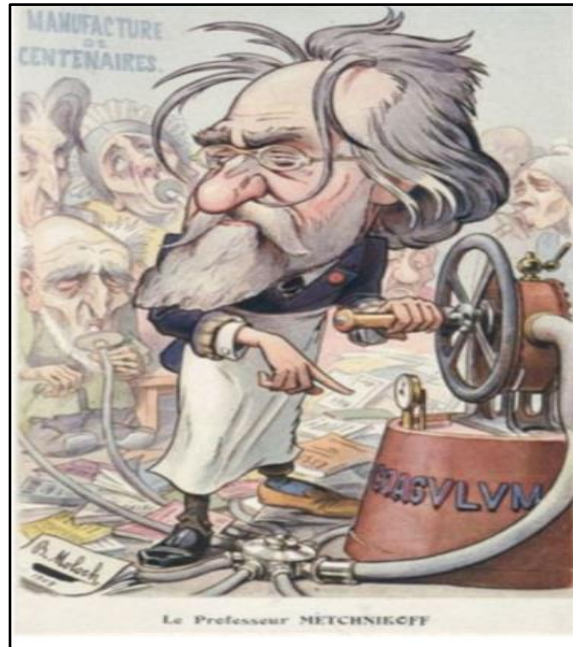
Si bien el origen exacto de las leches fermentadas no está claro, algunos historiadores concuerdan con que pudieron surgir en Asia Central y posteriormente se extendieron al Oriente Medio, el noreste de África y a los países balcánicos (Weerathilake *et al.*, 2014; Corrieu y Beal, 2016). En Europa las leches fermentadas se difundieron con la llegada de los pueblos nómadas asiáticos, así como con los pueblos germánicos y nórdicos. En Australia y América estos productos fueron conocidos después de que los nativos fueron colonizados (Condon *et al.*, 1988).

La palabra yogur probablemente se deriva del turco, "jugurt" que significa "cuajado o coagulado" (Weerathilake *et al.*, 2014). Aunque no hay registros disponibles sobre el origen del yogur, la creencia de su efecto benéfico sobre la salud humana ha existido en distintas civilizaciones a través del tiempo. De acuerdo con la tradición persa, Abraham debía su fecundidad y longevidad a la ingestión regular de leches fermentadas. Durante el siglo I d.C. Plinio "El viejo" llamó al yogur el alimento milagroso y recomendó el consumo de leches fermentadas para el tratamiento de infecciones gastrointestinales (Tamime y Robinson, 2007).

Se dice que en el siglo XII Genghis Khan, el unificador del imperio mongol, alimentaba a su ejército con yogur a lo cual atribuía sus victorias (Weerathilake *et al.*, 2014). Durante el siglo XVI, el emperador Francisco I de Francia dijo que se había curado de una diarrea severa gracias al consumo de yogur de leche de cabra, con lo que introdujo los beneficios que aportaba el yogur a la salud en el mundo occidental (Tamime y Robinson, 2007).

A lo largo de los siguientes siglos, el conocimiento para hacer yogur y leches fermentadas fue regional o local. La contribución del científico ruso Ilya Metchnikoff, quien trabajó en el Instituto Pasteur, fue fundamental para que el consumo del yogur se extendiera (Condon *et al.*, 1988).

Metchnikoff sostenía la hipótesis en sus publicaciones "*Nature of man, studies in optimistic philosophy*" (1903) y "*The prolongation of life*" (1907) sobre lo que él denominaba la putrefacción intestinal, de que en el tracto gastrointestinal habitaban microorganismos dañinos para nuestra salud, mismos que producían toxinas y que para disminuir su efecto, otros microorganismos benéficos debían ser introducidos al colon (Stoilova, 2015). Metchnikoff tomó un particular interés en el consumo de yogur como un tratamiento alternativo para los problemas intestinales y relacionó su consumo con la longevidad de las personas en ciertas comunidades de Bulgaria por lo que sugirió que el yogur retrasaba el proceso de envejecimiento, impulsando así el consumo de este alimento (Weerathilake *et al.*, 2014; Stoilova, 2015) (figura 4).



**Figura 4. Caricatura parodiando el entusiasmo de Metchnikoff por los probióticos como una panacea.** Fuente: Gordon, 2008.

Paralelamente en 1905, el médico búlgaro Stamen Grigoroff publicó en la revista *Revue Médicale de la Suisse Romande* su trabajo en el que identificó a los microorganismos responsables de la transformación de la leche en yogur (Danone, 2013). Grigoroff buscó aislar al microorganismo que provocaba la fermentación de la leche, y descubrió tres diferentes microorganismos a los que llamó *bacillo A*, *micrococo B* y *estreptobacilo C*. El *bacilo A* era el causante de la producción del yogur y lo denominó “bacillus ácido láctico”, el otro microorganismo que también intervenía en la fermentación fue clasificado como un estreptococo y más tarde se le nombró *Streptococcus thermophilus* (Stoilova, 2015).

Si bien el origen de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* es incierto, una hipótesis apunta a que quizá provengan de Bulgaria. Los resultados del estudio de Michaylova *et al.*, (2007) demostraron que las bacterias del yogur están presentes en algunos arbustos silvestres con flores de ese país, tales como: *Cornus mas* (cornejo macho), *Ononis spinosa* (espinilla), *Berberis vulgaris* (abrilla) y *Paliurus aculeatus* (espina santa).

Originalmente el yogur se elaboraba a partir del extracto de las raíces de plantas y leche de oveja, que se dejaba fermentar por cierto tiempo, pudiendo ser transferida esta técnica de conservación de la leche a otros países y haber sido utilizado como inóculo para la producción de lo que ahora conocemos como yogur (Michaylova *et al.*, 2007). No está claro cómo *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* crecen y sobreviven en las plantas, y si estas bacterias son transferidas de otros sitios por insectos. Tampoco está claro cómo adquirieron la capacidad de desarrollarse en la leche y cómo se estableció la simbiosis entre las dos especies bacterianas (Markoff, 1925, citado en Michaylova *et al.*, 2007).

La industrialización del yogur se llevó a cabo en Barcelona en 1919 por Isaac Carasso con su empresa Danone, nombrada así en honor a su hijo Daniel a quien llamaban “Danon”. Carasso comercializó los primeros productos en farmacias (figura 5), pues debido a la influencia de Metchnikoff, el yogur era considerado en ese entonces como un producto medicinal que prolongaba la vida de quienes lo consumían (Weerathilake *et al.*, 2014).



Figura 5. Anuncio de yogur en el periodico La Vanguardia, 1911. Fuente: La Vanguardia 2016.



En 1929 Daniel Carasso, con 23 años de edad, fundó la Sociedad Parisina del yogur Danone, e inauguró el primer punto de venta en la calle André Messager de París. También lanzó el primer eslogan publicitario de la marca “Delicioso y sano, Danone es el postre para una buena digestión” (Danone, 2015).

El yogur se introdujo en los Estados Unidos de América a principios del siglo XX, sin embargo, se hizo popular en 1942 cuando Daniel Carasso fundó *Dannon Milk Product Inc.*, en Nueva York (Weerathilake *et al.*, 2014). La variedad de sabores que conocemos hoy en día también fueron introducidos a lo largo del siglo XX: la adición de mermelada de frutas ocurrió en 1933, el yogur con frutas se comercializó en 1937, y el yogur batido en 1963 (Danone, 2013).

Otro evento que promovió el consumo del yogur fue la comercialización del refrigerador después de la Segunda Guerra Mundial, lo que permitió almacenar y conservar los alimentos frescos por más tiempo (Tamime y Law, 2001). A partir de 1950, el yogur pasó a venderse en lecherías y poco después en tiendas locales, convirtiéndose así en el producto lácteo fermentado de mayor consumo (Tamime y Law, 2001).

#### **6.4 Definición de leche fermentada**

La leche fermentada es el producto lácteo obtenido por medio de la fermentación de la leche, que puede haber sido elaborado a partir de productos obtenidos de la leche con o sin modificaciones en su composición según las limitaciones de lo dispuesto en la sección 3.3 de la Norma para las leches fermentadas 243-2003 del Codex, por medio de la acción de los microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación (precipitación isoeléctrica). Estos cultivos de microorganismos deben ser viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de duración mínima (FAO/ WHO, 2011).

El yogur es el producto lácteo obtenido a partir de la fermentación de la leche por medio de la acción de dos bacterias ácido lácticas (BAL): *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* que deben de ser viables en concentraciones mínimas de 10 millones por g o mL ( $1 \times 10^7$  UFC/g o mL) (FAO/WHO, 2011; Corrieu y Beal, 2016). Desde el punto de vista reológico, el yogur es un gel formado por la agregación de las micelas de caseína mediante la acidificación de la leche dando origen a un producto de mayor viscosidad (Karam *et al.*, 2012).

En el mercado mexicano también se comercializa la leche acidificada, que es el producto obtenido mediante la acidificación de la leche a través de la acción de agentes acidulantes permitidos (*v.g.*, ácido cítrico, ácido láctico, etc.) (NXM-F-703-COFOCALEC-2012), por lo que resulta importante hacer la distinción de estos productos para evitar confusión entre los consumidores.

## **6.5 Mercado mundial y nacional del yogur**

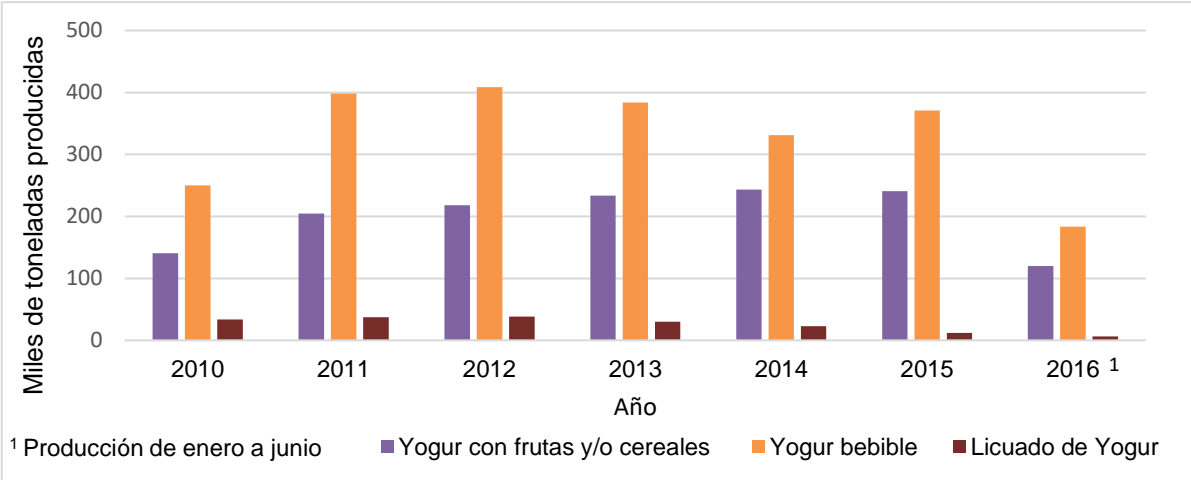
La leche y los productos lácteos forman parte importante de nuestra dieta. En 2015, el consumo total de leche en México fue de 16, 980 millones de litros equivalentes (volumen que ocupa la leche en polvo al hidratarla a un contenido de sólidos totales de aproximadamente 11.8 % para la leche entera y del 8.5 % de sólidos no grasos para la leche descremada), de estos, 11,395 millones fueron de producción nacional y 5,586 millones fueron importados (CANILEC, 2015).

La producción mundial del yogur y de las leches fermentadas alcanzó los 35 millones de toneladas en 2012. Durante 2015 el mercado global fue de US\$67 mil millones. En ese mismo año, la producción anual de Europa fue de 9.3 millones de toneladas siendo Alemania, Francia y España los principales productores, con un 20 %, 18 % y 9 % de la producción, respectivamente (Corrieu y Beal, 2016).

Durante los últimos 5 años en Europa, la producción total de este producto se incrementó en un 10 %, mientras que, para los últimos 30 años en Francia, el aumento fue del 38 %. Además de Europa, los principales productores de yogur son China, Rusia, Irán y los Estados Unidos de América, con 4.0, 2.5, 2.2 y 2.0 millones de toneladas por año, respectivamente. La producción de centro y sudamérica (1.5 millones de toneladas por año) y de África (0.4 millones de toneladas por año) es menor (Corrieu y Beal, 2016).

El incremento en el consumo de este alimento surge debido a la tendencia de los alimentos “listos para comer”, así también, por el significativo aporte de proteína que brinda a la dieta y por los efectos benéficos de las BAL en el aparato digestivo (Oliveira, 2014).

En México, el 8.5 % de la población consume yogur, principalmente los niños en edad preescolar (Rivera *et al.*, 2014). El incremento en la ingesta de este alimento se refleja en un aumento de la producción del 14.25 % durante los últimos cinco años, de acuerdo a los resultados de la encuesta mensual de la industria manufacturera del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (EMIM, INEGI 2016) (figura 6).



**Figura 6. Producción de yogur en México del año 2010 a la primera mitad del año 2016.** Con datos de la encuesta mensual de la industria manufacturera del Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

## 6.6 Proceso de elaboración del yogur

El proceso de producción de yogur se resume en la siguiente secuencia de operaciones: estandarización de los sólidos totales de la leche, homogeneización, tratamiento térmico, inoculación, incubación, enfriamiento, manipulación y embalaje (Behare *et al.*, 2016). El diagrama general del proceso se presenta en la figura 7.

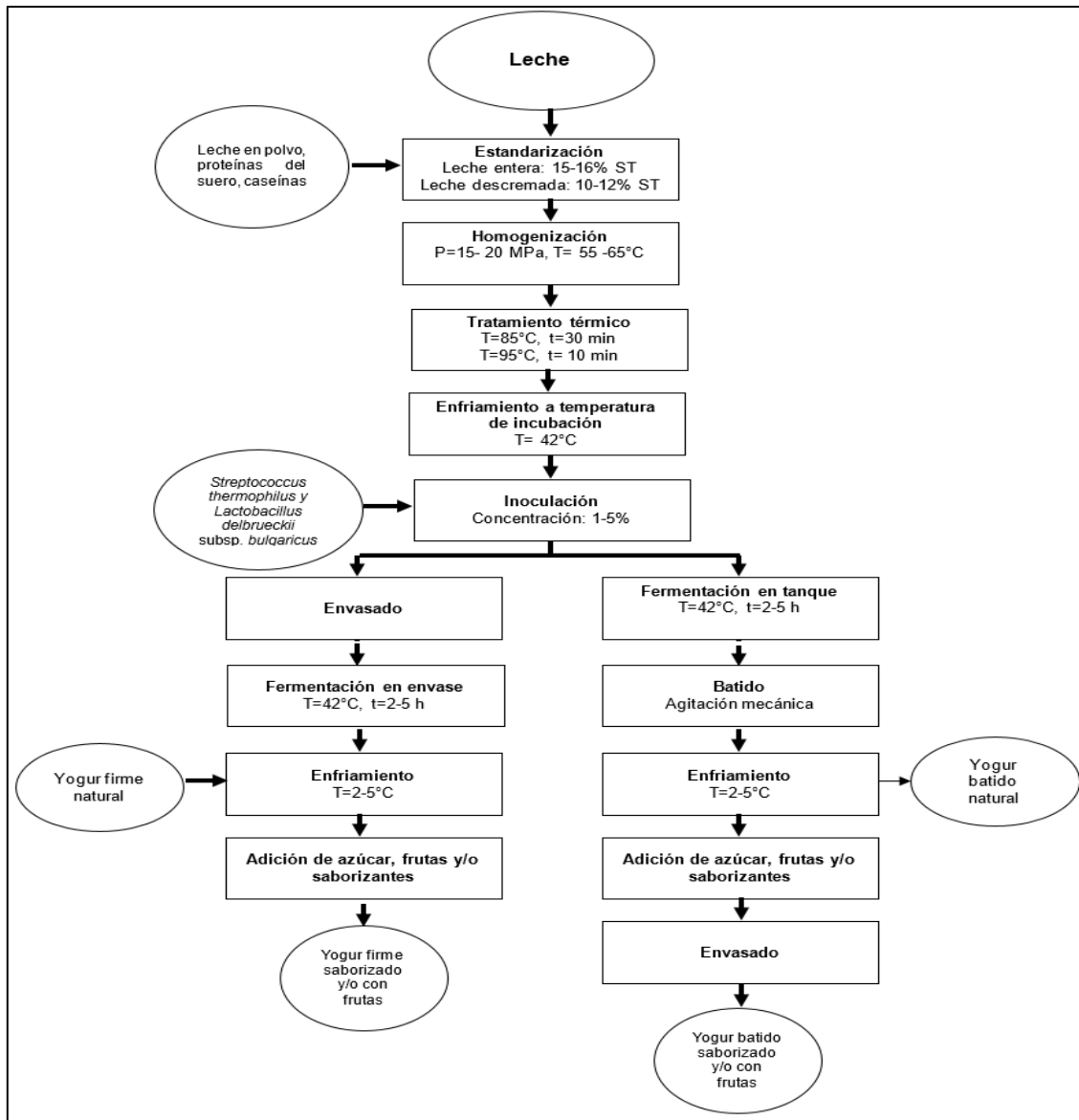


Figura 7. Esquema general del proceso de elaboración de yogur. Adaptado de Oliveira 2014 y Behare *et al.* 2016.

### **6.6.1 Estandarización de la grasa y de los sólidos no grasos**

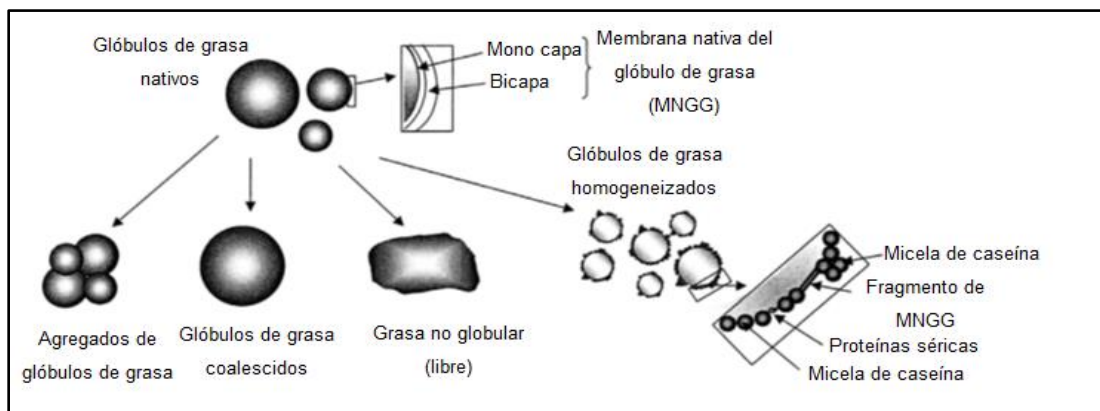
Se inicia con el descremado de la leche, seguido de la normalización del contenido de grasa y de sólidos no grasos (SNG) (Hill y Kethireddipalli, 2012). Para aumentar el contenido de SNG, la leche se concentra mediante evaporación. Otra alternativa es adicionar leche en polvo descremada (entre 3 % a 4 % m/m), suero de leche en polvo o caseinatos (entre 1 % a 2 % m/m) (Karam *et. al.*, 2013). Los sólidos añadidos modifican la cinética de acidificación, previenen la sinéresis y modifican la consistencia logrando una mejor sensación en la boca (Oliveira, 2014).

La adición de estabilizantes es también una práctica común, éstas sustancias se agregan a niveles de 0.1 % a 0.5 % como compuestos individuales o una mezcla de ellos (Oliveira, 2014). Los más empleados son: almidón, carrageninas, gretina, pectina, goma guar y goma de algarrobo. Actúan como agentes gelificantes o espesantes, además de que estabilizan a las proteínas de la leche en una red que retarda el movimiento del agua libre (Hill y Kethireddipalli, 2012).

En nuestro país, la normatividad permite adicionar estabilizantes en una concentración máxima de 5000 mg de estabilizante/kg de producto final, ya sea de manera individual o como una mezcla de ellos (NOM-185-SSA1-2002).

### **6.6.2 Homogeneización**

Esta etapa se realiza en un homogeneizador empleando presiones de entre 15 MPa a 20 MPa y temperaturas de entre 55 °C a 65 °C, con lo que se reduce el tamaño del glóbulo de grasa a aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  y en consecuencia se incrementa su área (Corrieu y Beal, 2016). Esta “nueva superficie” se cubre con las caseínas y las proteínas del suero, como se muestra en la figura 8. Lo anterior minimiza la coalescencia e incrementa la estabilidad del producto durante el almacenamiento (Hill y Kethireddipalli, 2012).



**Figura 8. Representación esquemática de la coalescencia de la grasa de la leche y de su recubrimiento después del proceso de homogeneización.**  
Adaptado de López 2005.

### 6.6.3 Tratamiento térmico

La leche enriquecida se calienta a 85 °C durante 30 min o a 95 °C por 10 min, obteniéndose mejores resultados a menor temperatura por tiempos más prolongados (Early, 1998). Con el tratamiento térmico se eliminan los agentes patógenos y los microorganismos que causan el deterioro de la leche; también se propician las condiciones favorables para el crecimiento del cultivo iniciador al reducirse la cantidad de oxígeno disuelto, propiciando un ambiente microaerófilo, y se logran cambios favorables en las propiedades fisicoquímicas de la leche a través de la desnaturalización de las proteínas del suero y la formación de una red tridimensional entre las proteínas del suero y las caseínas a través de enlaces disulfuro (Karam, 2013, Tamime y Law, 2001).

### 6.6.4 Inoculación con las bacterias ácido lácticas

La mezcla homogeneizada se enfría de 45 °C a 40 °C y se añade el cultivo iniciador formado por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* en una concentración de entre el 3 % al 5 % m/m respecto a la cantidad de leche empleada (Hill y Kethireddipalli, 2012; Oliveira, 2014).

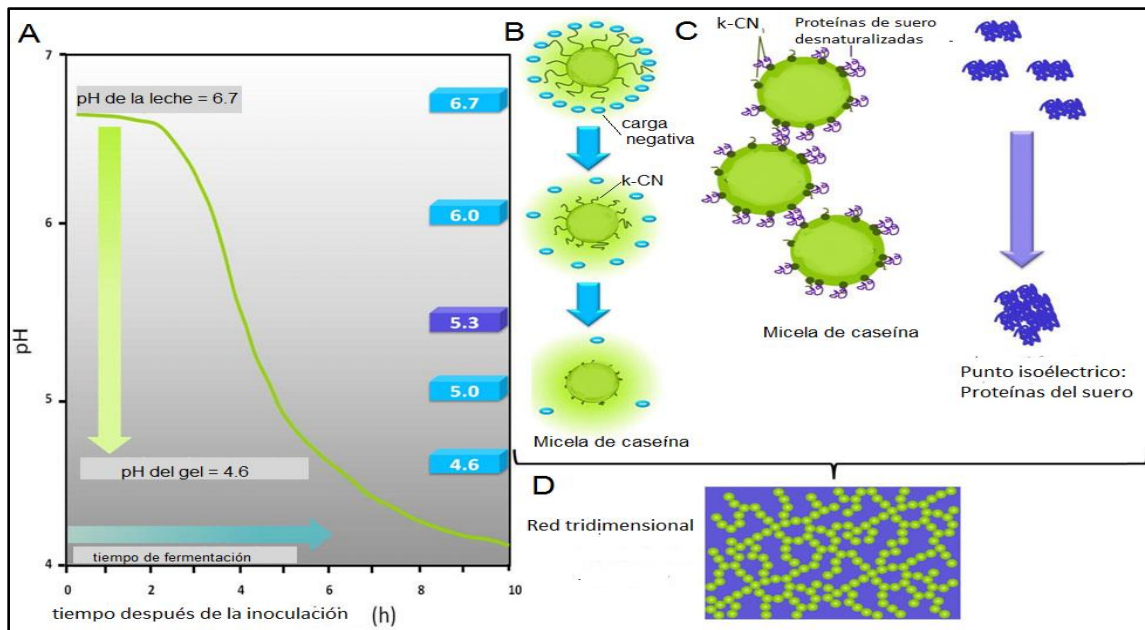
### 6.6.5 Fermentación

Se realiza en envases individuales (yogur firme) o en tanques (yogur batido), posteriormente se mantiene en reposo de 2 h a 5 h a 42 °C. Se monitorea el pH y la acidez titulable (AT) (Corrieu y Beal, 2016). A medida que el pH desciende a 4.6 (figura 9A), la carga negativa de las micelas de caseína disminuye (figura 9B) y aumenta la solubilidad del calcio iónico, lo que causa el colapso de la  $\kappa$ -caseína debido a que las interacciones intra e intercatenarias del glicomacropéptido ya no son suficientes para mantener la estabilidad estérica (Dalgleish y Corredig, 2012). Lo anterior provoca la disminución de la repulsión electrostática y se incrementan las interacciones caseína-caseína (Karam *et al.*, 2013).

Se forman enlaces disulfuro entre las proteínas del suero desnaturizadas con las caseínas (figura 9C) debido a los dos puentes disulfuro y al grupo sulfhidrilo libre que  $\beta$ -LG presenta en su estructura nativa (Patel *et al.*, 2007).

El conjunto de interacciones entre las caseínas y las proteínas de suero desnaturizadas conducen a la formación de una red tridimensional que retiene agua (figura 9D) (Karam *et al.*, 2013).

Con la formación de un gel continuo, el yogur se enfría a aproximadamente 5 °C y se almacena o procesa para producir otros tipos de yogur. Finalmente, el producto se distribuye y comercializa a baja temperatura (Corrieu y Beal, 2016).



**Figura 9. Disminución del de pH durante el proceso de fermentación y su efecto en las proteínas de la leche. Adaptado de Karam 2013.**

## 6.7 Beneficios del consumo de yogur

Las bebidas lácteas fermentadas poseen diversas propiedades nutricionales y terapéuticas. Las BAL desempeñan un papel importante en dichos efectos positivos para la salud (Shiby y Mishra, 2013).

Existe controversia sobre si las BAL empleadas en la elaboración de yogur son o no probióticas debido a que no sobreviven el paso a través del tracto intestinal (Loures-Hattingh y Viljoen, 2001). Por un lado, quienes apoyan que *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* son probióticas, lo hacen basándose en que el consumo del yogur causa efectos benéficos contra enfermedades intestinales, tales como el estreñimiento y el síndrome del intestino irritado (Sarkar, 2008). Además de que en el yogur se ha detectado la presencia de péptidos bioactivos, a los cuales se les atribuyen efectos positivos en el equilibrio intestinal, el sistema inmune, y en la prevención de cáncer (Meydani y Ha, 2000; Piaia *et al.*, 2003).



Asimismo, se encontró que personas con intolerancia a la lactosa mejoraron la digestión y absorción de este azúcar tras el consumo de yogur. Sin embargo, el beneficio sobre la absorción de lactosa también se demostró en sujetos sin problemas de intolerancia (Rizkalla *et al.*, 2000; Guarner *et al.*, 2005).

Por otro lado, se ha reportado que al adicionar probióticos al yogur se mejoran los beneficios aportados por el consumo de este alimento (Loures-Hattingh y Viljoen, 2001). Sefora *et al.*, (2016) encontraron que al suplementar al yogur con *Lactobacillus casei* PRA205 se liberaron péptidos antihipertensivos y antioxidantes. El consumo del yogur adicionado de *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium infantis* mostró una reducción de los niveles de colesterol entre un 17 % al 31 % y que las personas que participaron en el estudio pudieron remover de manera más eficaz el colesterol esterificado (Sarkar, 2008).

Otro punto a resaltar, es que el consumo de yogur aporta mayores niveles de calcio y de potasio (200 mg de calcio/100 g y 255 mg potasio/100 g) que la leche (125 mg de calcio/100 g y 150 mg potasio/100 g) como consecuencia del ajuste de SNG. Finalmente, el contenido de ácido fólico (vitamina B9) es el doble en el yogur (80 µg/L) en comparación con la leche (40 µg/L) (Corrieu y Beal, 2016).

## **6.8 Métodos electroforéticos**

### **6.8.1 Desarrollo histórico de los métodos electroforéticos**

La electroforesis se define como el movimiento o desplazamiento diferencial de especies con carga, sustancias neutras o migración pasiva, por atracción o repulsión, bajo un campo eléctrico continuo (Castagnino, 2000).

La electroforesis es una técnica analítica de separación que ha tenido gran auge internacional (Piñero *et al.*, 2011), pero poco aplicada en nuestro país, de ahí el interés de extenderla al estudio de la fracción proteínica del yogur.

La electroforesis se ha empleado en diversas áreas de la investigación para la separación y cuantificación de moléculas pequeñas (iones metálicos), biomoléculas (aminoácidos, proteínas, hidratos de carbono) y macromoléculas (fragmentos de ADN) (Castillo *et al.*, 2005).

Los fundamentos de la técnica se remontan al siglo XIX (Vesterberg, 1989; Santarén, 2004) con las aportaciones de Reuss (1809) sobre el desplazamiento de sustancias bajo la acción de un campo eléctrico. Posteriormente, en 1897 Kohlrausch formuló las ecuaciones que describen el comportamiento de un campo eléctrico en una interfase, lo que resultó fundamental para el posterior desarrollo de la isotacoforesis. Para el año de 1899 Hardy descubrió el punto isoeléctrico, lo que sentó las bases de la técnica del enfoque isoeléctrico.

Las aportaciones continuaron con Tiselius, quien publicó su tesis doctoral “El método del frente móvil en el estudio de electroforesis de proteínas” en 1930. Tiselius realizó sus experimentos utilizando un tubo en forma de U en cuyo interior las proteínas ionizadas se movían libremente y sus frentes de avance se detectaban y fotografiaban usando luz ultravioleta (Santarén, 2004).

En el año de 1950 Haglund y Tiselius describieron un aparato a escala preparativa en el que la electroforesis se llevaba a cabo en un tubo vertical lleno de esferitas de vidrio para contrarrestar la convección, mismo que Flodin y Kupke mejoraron después reemplazando las esferas de vidrio por celulosa tratada con etanol y HCl (Vesterberg, 1989).

A partir de 1950 se empleó papel filtro como medio de soporte, Smithies empleó geles de almidón mientras que Raymond, Weintraub, Davis y Ornstein utilizaron a la poliacrilamida como soporte (Santarén, 2004).

En 1964 Davis y Ornstein introdujeron la electroforesis discontinua usando disoluciones amortiguadoras con diferentes valores de pH (Vesterberg, 1989).

Posteriormente, en 1967 Shapiro, Viñuela y Maizel describieron la relación existente entre la movilidad electroforética de las proteínas en un gel de poliacrilamida en presencia del dodecil sulfato de sodio (SDS) y su peso molecular (Shapiro *et al.*, 1967). Este trabajo fue retomado en 1969 por Weber y Osborn, quienes demostraron la determinación del peso molecular de proteínas graficando su movilidad electroforética contra el logaritmo del peso molecular de proteínas de peso molecular conocido (Weber y Osborn, 1969).

Laemmli (1970), incorporó SDS al 0.1 % en las disoluciones amortiguadoras usadas por Ornstein y Davis, y además empleó un paso desnaturalizante en la preparación de muestra al usar calor y un agente desnaturalizante (2-mercaptoetanol al 5 %)

El SDS es un detergente aniónico que se une a las proteínas desnaturalizándolas en una conformación extendida. Como consecuencia, la carga de las proteínas queda enmascarada por la mayor carga del SDS que las recubre en una relación aproximada de 1.4 g SDS/g de proteína (Reynolds y Tanford, 1970). Por lo tanto, la movilidad electroforética de la proteína depende exclusivamente de su peso molecular (Voet y Voet, 2007).

Los avances continuaron en el año de 1967 con Hjertén, quien introdujo el uso de capilares de vidrio con diámetros internos (d.i.) de entre 1 mm a 3 mm. Para prevenir el flujo electroosmótico (FEO), la capa interna del capilar se recubría de metilcelulosa (Castillo *et al.*, 2005). Para 1979 Mikkers, Everaerts y Verheggen llevaron a cabo separaciones empleando capilares de 200  $\mu\text{m}$  de d.i., elaborados con vidrio y teflón, respectivamente (Vesterberg, 1989). Para 1981 Jorgenson y Lukacs utilizaron tubos capilares de 75  $\mu\text{m}$  de sílice fundida, popularizándose de esta manera el uso de la electroforesis capilar (EC) (Castagnino, 2000).

### **6.8.2 Fundamentos de la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio**

La electroforesis en gel se emplea para separar moléculas en función de su tamaño y carga eléctrica, siendo la fuerza motriz la diferencia de potencial aplicada a los electrodos en ambos extremos del gel (Carrillo *et al.*, 2013).

La poliacrilamida es el soporte más empleado en el análisis de proteínas, debido a que es químicamente inerte, se puede preparar de manera rápida y reproducible, además de que forma geles con estabilidad mecánica, transparentes e insolubles en agua (García, 2000).

Los geles de poliacrilamida utilizados constan de dos partes, y se preparan sobre moldes de vidrio: un gel concentrador (de poros grandes) que provoca el apilamiento de las proteínas antes de que se resuelvan y un gel separador (de poros pequeños) que permite la separación de las proteínas por su tamaño (García, 2000). La composición química de las disoluciones amortiguadoras utilizadas en ambos geles es igual pero el pH y la concentración de estas difiere (Roca *et al.*, 2003).

El principio de concentración de la muestra es debido a la diferencia de pH establecida entre los dos geles, lo que determina que, al pH del gel concentrador, la glicina (principal componente de la disolución amortiguadora de corrida de la electroforesis) este mayoritariamente en forma de zwitterión al encontrarse a un pH por encima de su  $pI$  (5.97) (Westermeyer, 2005). En cambio, los iones cloruro presentes en las disoluciones amortiguadoras con las que se preparan los geles migran rápidamente hacia el ánodo, mientras que las proteínas, con menor densidad de carga, migran a menor velocidad (Roca *et al.*, 2003).

El frente de glicina se mueve lentamente a través del gel de apilamiento, quedando detrás de los cloruros, provocando una región de baja conductividad y la disminución del voltaje entre ambas especies. Esta zona arrastra las proteínas a

través de los poros del gel de apilamiento y las deposita en la parte superior del gel de resolución como una banda estrecha (Westermeier, 2005).

Cuando las proteínas llegan al gel separador migran a menor velocidad, y su velocidad de migración dependerá de su tamaño (Roca *et al.*, 2003). Al migrar más lentamente, las proteínas son alcanzadas por los glicinatos, que al encontrarse en un pH 8.8 adquieren una carga negativa y se adelantan a las proteínas en la migración. De esta manera, las proteínas se separan aún más lento. La menor velocidad de migración de las proteínas permite su mejor resolución (Westermeier, 2005).

Al término de la electroforesis, las moléculas más pequeñas llegan al ánodo, entonces se pueden fijar y teñir mediante la adición de un colorante para hacerlas visibles (tinción con plata, azul de *Coomassie* o reactivos fluorescentes) (Carrillo, *et al.*, 2013).

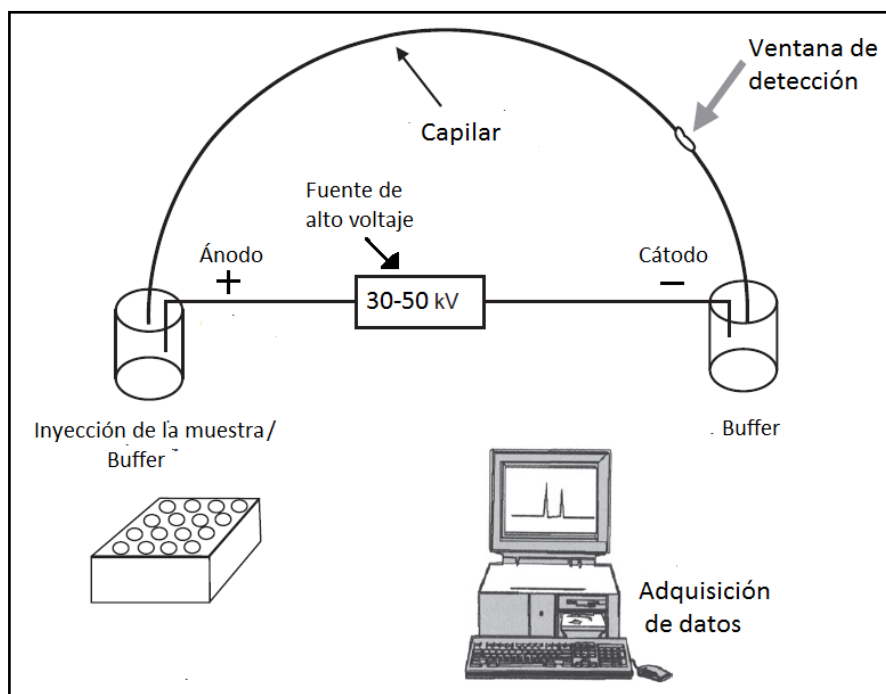
La SDS-PAGE se ha aplicado para identificar a la leche de cabra, de oveja y de vaca en mezclas de leche para evitar adulteraciones (De La Fuente y Juárez, 2005) y para detectar la adición de leche de vaca en quesos y yogur elaborados a partir de leche de oveja y cabra (Kaminarides y Koukiassa, 2001); así mismo, es usada en el análisis de las proteínas del suero de leche para caracterizar los agregados proteínicos formados durante el proceso de elaboración de la leche en polvo, sirviendo como un indicador del tipo de interacciones formadas (Kinghorn *et al.*, 1995; De La Fuente y Juárez, 2005; Patel *et al.*, 2007).

### **6.8.3 Fundamentos de la electroforesis capilar**

La electroforesis capilar es una de las técnicas de separación en fase líquida más poderosas que se realiza en un capilar de sílice fundida de d.i., de 10 µm a 200 µm (Osatinsky, 2007; Shallan *et al.*, 2013).

La movilidad de los compuestos en solución bajo la influencia de un campo eléctrico depende de las características del analito (v.g., tamaño y carga), de la temperatura de la separación, de la naturaleza del electrolito soporte o disolución amortiguadora, así como de la intensidad del campo eléctrico aplicado (Marina *et al.*, 2005).

En términos generales, y como se ilustra en la figura 10, la forma de trabajo en EC consta de: una fuente de alto voltaje, dos electrodos, dos recipientes para contener la muestra y la disolución amortiguadora, un capilar y un sistema de adquisición de datos (Shallan *et al.*, 2013).



**Figura 10. Instrumentación básica en electroforesis capilar.** Adaptado de Butler, 2012.

Los componentes básicos de un equipo de electroforesis capilar se en la tabla 2.

**Tabla 2. Principales componentes de un equipo de electroforesis capilar<sup>1</sup>**

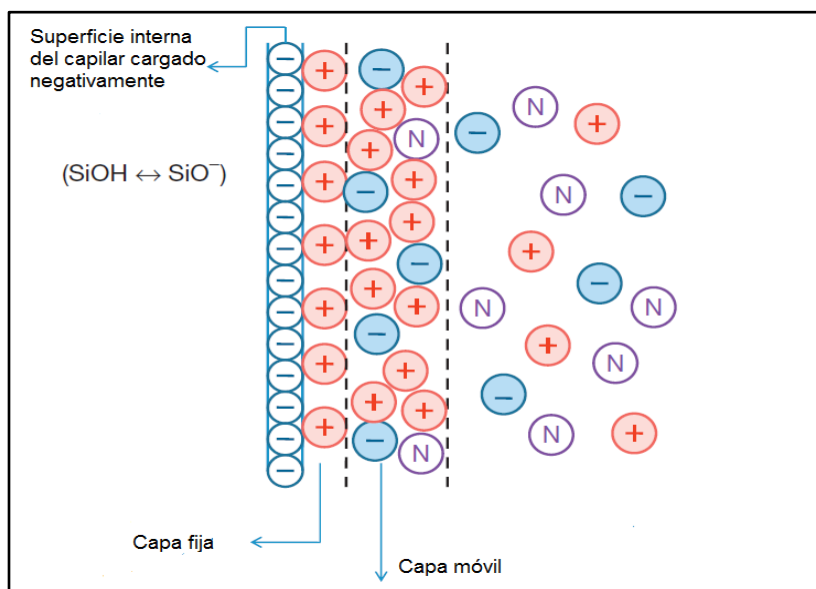
<b>Componente</b>	<b>Función</b>
<b>Fuente de alto voltaje</b>	Permite la aplicación de voltaje hasta 30 kV. Debe tener la capacidad de invertir la polaridad a fin de operar en modo normal (el detector se encuentra en el cátodo) o reversa (el detector se encuentra en el ánodo).
<b>Electrodos</b>	Generalmente de platino.
<b>Capilar</b>	Comúnmente de sílice fundida cubierto de poliamida que le brinda flexibilidad y facilita su manejo. La longitud del capilar va de 50 cm a 100 cm y su d.i. de 10 $\mu\text{m}$ a 200 $\mu\text{m}$ .
<b>Sistema de detección</b>	Absorción UV-Visible, fluorescencia, acoplado a espectrómetro de masas y electroquímicos.

<sup>1</sup>Adaptado de Marina *et al.*, 2005; Butler, 2012; Shallan *et al.*, 2013.

Una característica fundamental de la EC es el FEO. Este flujo es originado en presencia de un campo eléctrico cuando una solución iónica entra en contacto con una superficie sólida con carga (Castillo *et al.*, 2005).

En los capilares de sílice fundida, la superficie interna del capilar contiene grupos silanoles (SiOH) (pKa entre 4 a 6). A valores de pH mayores a 4, los grupos silanol están ionizados presentándose como silanoatos (SiO<sup>-</sup>), por lo que la superficie adquiere carga negativa (Shallan *et al.*, 2013). En la pared del capilar se formará una primera capa fija de iones que son atraídos por la carga negativa de la pared del capilar (figura 11), seguida por una segunda capa (móvil), compuesta principalmente de cationes adyacentes a la primera capa. Al aplicar un campo eléctrico, el exceso de cationes de la capa móvil establece un flujo neto de migración

hacia el polo negativo (cátodo), creando un potencial muy cercano a la pared llamado potencial zeta ( $\zeta$ ) (Shallan *et al.*, 2013).

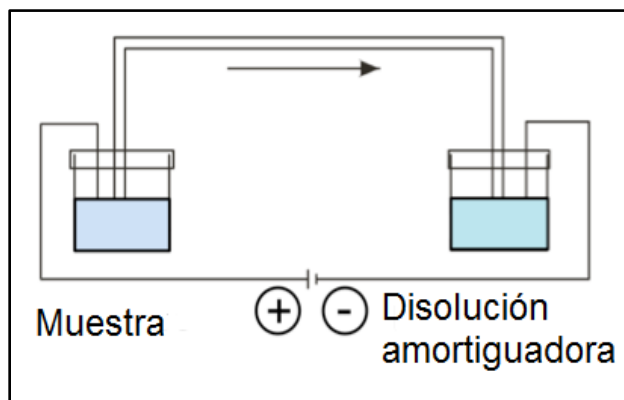


**Figura 11. Representación esquemática del flujo electroosmótico.** Adaptado de Shallan *et al.*, 2013.

### Inyección de la muestra

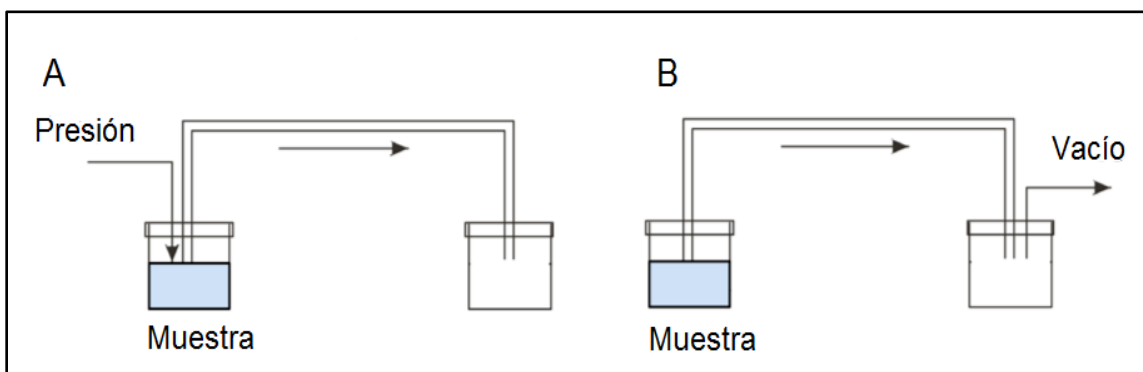
La inyección electrocinética e hidrodinámica son las técnicas de introducción de muestra más usadas en la práctica (Marina *et al.*, 2005). La inyección electrocinética (figura 12) se realiza al introducir un extremo del capilar en el vial que contiene la muestra y el otro extremo en el vial que contiene la disolución amortiguadora, y se aplica una diferencia de potencial de entre 1 kV a 5 kV durante 1 s a 10 s. De esta manera, los analitos entran en el capilar por su migración electroforética y/o por la acción del FEO (Blanco, 2009).





**Figura 12. Inyección electrocinética.** Fuente: Blanco, 2009.

Como se aprecia en la figura 13, la inyección hidrodinámica se puede llevar a cabo por aplicación de presión en el extremo de entrada del capilar, o por succión en el extremo de salida, lo que provoca el paso de muestra al capilar (Blanco, 2009).



**Figura 13. Modalidades de la inyección hidrodinámica.** A) por aplicación de presión o B) por aplicación de vacío. Fuente: Blanco, 2009.

La versatilidad de la electroforesis capilar reside en el desarrollo de diferentes modos de separación, lo que ha permitido expandir el campo de aplicaciones de la técnica, permitiendo así el análisis de una amplia variedad de compuestos con diferentes características con la ventaja de que se puede realizar usando el mismo equipo.

#### **6.8.4 Aplicaciones de la electroforesis capilar**

La principal aplicación de la electroforesis es la separación, identificación y en su caso cuantificación de macromoléculas biológicas, en especial las proteínas (Gas, 2005). El avance de la electroforesis capilar ha permitido su aplicación en diversos campos. En el área farmacéutica y análisis clínicos, se le ha empleado en el control de calidad de medicamentos, en la determinación del contenido de drogas en fármacos, para la separación de compuestos quirales, o en la detección y cuantificación de marcadores en fluidos biológicos con el fin de indicar la presencia de enfermedades (Marina *et al.*, 2005; Piñero *et al.*, 2011).

En el área de control ambiental, se ha identificado contaminantes, pesticidas, fungicidas, herbicidas o metales pesados por EC (Castagnino, 2000).

En el área de alimentos se ha empleado para el fraccionamiento y cuantificación de aminoácidos, péptidos, proteínas, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, vitaminas, aditivos o adulterantes (Cala *et al.*, 2011; Piñero *et al.*, 2011; Domínguez *et al.*, 2016).

Dentro del sector de los lácteos, esta técnica se ha utilizado en la identificación y cuantificación de las proteínas lácteas, para detectar adulteraciones y autenticidad, así como para evaluar el tratamiento térmico aplicado a los productos. En la tabla 3 se presentan algunas de sus aplicaciones más importantes de 1992 a 2016.

**Tabla 3. Aplicaciones de la electroforesis capilar en leche y productos de la leche de 1992 a 2016.**

Aplicación	Autor (es)
Identificación de las principales proteínas de leche bovina en leche fresca y leche en polvo.	Chen y Zang, 1992
Identificación de algunas variantes genéticas de las principales proteínas de la leche bovina.	De Jong <i>et al.</i> , 1993
Obtención de los patrones de electromigración de muestras de leche (bovina, caprina, ovina y humana) y de proteínas de soya.	Kanning <i>et al.</i> , 1993
Análisis cuantitativo de las principales proteínas del suero de leche bovina.	Recio <i>et al.</i> , 1995
Detección de la adición fraudulenta de sólidos de leche en leche en polvo.	Riel y Olieman, 1995
Obtención de los patrones de proteólisis de las caseínas en leche y queso fresco de origen bovino.	Recio <i>et al.</i> , 1997a
Estudio del polimorfismo genético y no genético de las proteínas lácteas de diferentes especies (vaca, oveja y cabra).	Recio <i>et al.</i> , 1997b
Análisis de caseína isoelectrica de mezclas de leche de diferentes especies.	Molina <i>et al.</i> , 1999
Detección de la adición de suero de quesería en leche ultrapasteurizada.	Recio <i>et al.</i> , 2000
Detección de la adición de caseína ácida y caseinatos en queso.	Miralles <i>et al.</i> , 2000
Detección de la adulteración de productos de leche caprina y ovina.	Recio <i>et al.</i> , 2001
Estudio cualitativo y cuantitativo de las proteínas y péptidos de leche de bovino.	Strickland <i>et al.</i> , 2001
Cuantificación de la concentración relativa de los diferentes niveles de fosforilación y las variantes genéticas más comunes en leche bovina.	Heck <i>et al.</i> , 2008
Análisis cuantitativo de lactoferrina de origen bovino en fórmulas infantiles.	Li <i>et al.</i> , 2012
Cuantificación de las principales proteínas de la leche de camella.	Omar <i>et al.</i> , 2016

## 7. Materiales y métodos

Para el desarrollo experimental se siguió la estrategia experimental que se muestra en la figura 14.

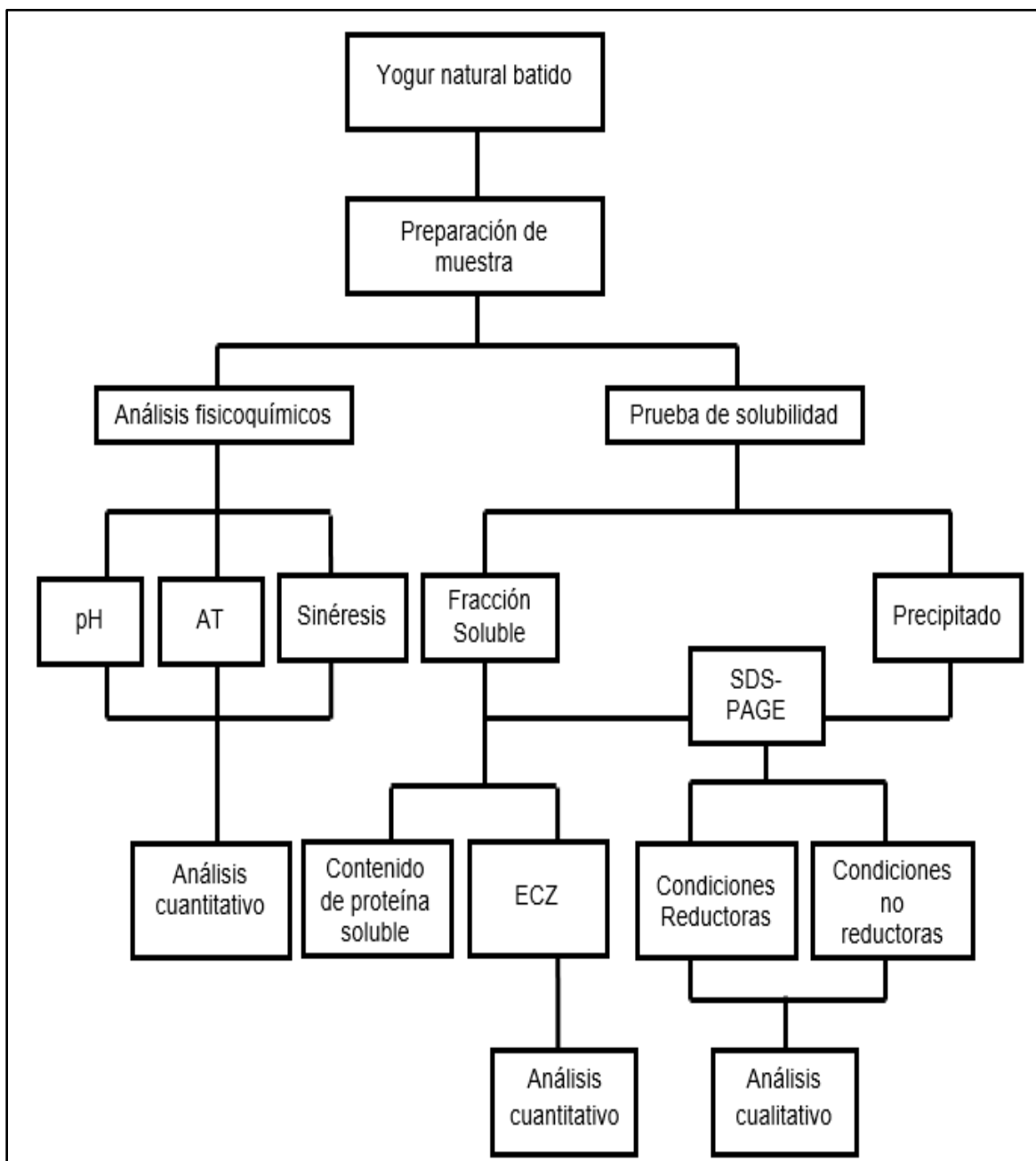


Figura 14. Diagrama de bloques de la estrategia experimental empleada.

Se analizaron, por triplicado, cuatro muestras comerciales de yogur natural batido: **YNA, YNB, YNS y YNU**. Se tomó una alícuota representativa de cada una y se procedió con los análisis fisicoquímicos (pH, AT), de sinéresis, de solubilidad, contenido de proteína soluble y los ensayos electroforéticos (SDS-PAGE y ECZ).

Adicionalmente, para analizar el efecto del contenido de proteína sobre la sinéresis y la viscosidad, se elaboraron tres muestras de yogur a partir de leche enriquecida con leche en polvo descremada (**YNLP**) al 4 %, suero de quesería desmineralizado (**YNSD**) al 2 % y caseinatos (**YNC**) al 1 % (Karam *et al.*, 2013) (ver apartado 7.2). En el caso de estas muestras se les midió la viscosidad y se realizaron los ensayos previamente mencionados a excepción de la ECZ.

### **7.1 Preparación de las disoluciones amortiguadoras**

Para la preparación de las muestras y la elaboración de las disoluciones, se empleó agua Tipo I (18.2 MΩ/cm a 25 °C) filtrada a través de una membrana de Nylon con tamaño de poro de 0.45 μm (*Sistema Simplicity UV*, Millipore, MA, USA), reactivos de la más alta pureza y material desechable.

Disolución amortiguadora de solubilidad (Manso *et al.*, 2002).

Tetraborato de sodio (30 mM) y sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (40 mM). Se pesó la cantidad necesaria de cada reactivo para preparar 100 mL de la disolución. Las sales se disolvieron en aproximadamente 85 mL de agua en un vaso de precipitados de 150 mL. La solución se trasvasó a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó con agua. Finalmente se midió y el pH de la disolución y se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

Disolución amortiguadora de muestra (Adaptado de Riel y Olieman 1995).

Urea (6 M), hidroxipropilmetil celulosa (HPMC) (0.05 %, m/v), tris (hidroximetil) aminoacetano (167 mM), ácido-3-morfolino propanosulfónico (MOPS) (42 mM) EDTA (67 mM). Los reactivos se pesaron y se disolvieron el orden mencionado en un vaso de precipitados de 250 mL con aproximadamente 50 mL de agua. La disolución se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó. Se midió y registró el pH de la disolución amortiguadora, misma que conservó en refrigeración hasta el momento de su empleo.

Disolución amortiguadora de separación (adaptado de Miralles *et al.*, 2001).

Urea (5 M), HPMC (0.05 %, m/v), citrato trisódico dihidratado (20 mM), ácido cítrico (0.185 M). Se pesó la cantidad de reactivos necesaria para preparar 100 mL de disolución y se disolvieron en el orden descrito en un vaso de precipitados de 250 mL con aproximadamente 60 mL de agua. Enseguida se trasvasó a un matraz volumétrico de 100 mL y se completó con agua hasta la línea de aforo. Se midió el pH y la disolución se filtró a través de una membrana de *Nylon* de diámetro de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  (*Titan filtration system*, USA), finalmente se conservó en refrigeración hasta su uso.

## **7.2 Elaboración de yogur a partir de leche enriquecida con leche en polvo, suero quesería desmineralizado y caseinatos.**

Se elaboraron tres formulaciones de yogur natural batido de acuerdo con Karam *et al.*, (2013), a partir de un litro de leche descremada pasteurizada a la que se le incrementó el contenido de sólidos no grasos (SNG) mediante la adición de caseinatos de calcio al 1 % (**YNC**), leche en polvo descremada comercial al 4 % (**YNLP**) y suero de quesería desmineralizado al 2 % (**YNSD**) (lote: D522B, Industrias Lácteas Chihuahuenses, S.A. de C.V).

Para cada formulación se disolvieron los SNG aplicando calor hasta alcanzar 90 °C por 5 min, la mezcla se enfrió y se almacenó en refrigeración hasta el momento de inocular.

Se disolvieron bajo condiciones asépticas 0.9 g del cultivo mixto liofilizado directo (*Centro Sperimentale del Latte S. p.A. Italia*) en un litro de leche pasteurizada. La mezcla se mantuvo a 42 °C por 8 h y se conservó en refrigeración hasta el momento de su uso.

El inóculo para yogur se añadió a una temperatura de 44 °C y en una proporción del 5.0 % v/v respecto al volumen de la leche empleada. La mezcla inoculada se colocó durante 3 h a 42 °C, período en el cual se monitoreó el pH.

### **7.3 Análisis fisicoquímicos de las muestras de yogur natural batido**

#### **7.3.1 Determinación de acidez titulable y medición del pH**

La determinación de la acidez titulable (AT) de las muestras se realizó conforme a la metodología descrita en la NOM-185-SSA1-2002. Se tomaron aproximadamente 18 g de yogur y adicionaron 36 g de agua degasificada (Baño ultrasónico, *Cole-Parmer*, IL, USA), libre de dióxido de carbono. Se utilizó fenolftaleína como indicador y se tituló con una disolución valorada de NaOH. La disolución de NaOH se preparó con agua libre de dióxido de carbono y normalizó empleado biftalato de potasio como patrón primario. El punto final de la titulación se alcanzó hasta el vire del indicador a un color rosa tenue, color que permaneció por al menos por 30 s.

Para la medición del pH (pH Meter, Mo.  $\Phi$  390, *Beckman-Coulter Inc.*, CA, USA) se siguió el protocolo establecido en la NMX-F-317-NORMEX-2013. La muestra se preparó de la misma forma que en la determinación de AT, excepto por la adición de fenolftaleína e NaOH.

### **7.3.2 Determinación del grado de sinéresis de las muestras de yogur natural batido**

La determinación del grado de sinéresis de todas las muestras se realizó mediante la técnica descrita en los trabajos de Verbeken *et al.*, (2006) y Charoenrei *et al.*, (2008). Para lo cual se pesaron 40 g de la muestra en tubos *Falcon* de 50 mL, se centrifugó a 4772 r.c.f., por 30 min a 4°C (centrífuga 5430 R) y por último se recuperó el sobrenadante del que se registró tanto su peso como el volumen.

Se determinó el grado de sinéresis de las muestras empleando la siguiente ecuación (Charoenrei *et al.*, 2008).

$$\text{grado de sinéresis} = \frac{\text{masa del líquido separado de gel}}{\text{masa total del gel antes de la centrifugación}} \% 100$$

Para saber si existía diferencia significativa entre el grado de sinéresis de las muestras se hizo la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) comparando los valores de sinéresis de las muestras (apéndice A). Finalmente, del sobrenadante se tomó una alícuota para determinar su contenido de proteína soluble por el método modificado de Lowry, y también para conocer su perfil proteínico mediante SDS-PAGE.

### **7.4 Determinación de la viscosidad de las muestras de yogur elaboradas en el laboratorio**

La prueba de viscosidad solo se realizó a las muestras elaboradas en el laboratorio en las instalaciones del Laboratorio de tecnología de alimentos, para ello se emplearon 150 mL del yogur a 25 °C, dicha cantidad se colocó dentro de un recipiente de acero inoxidable de 600 mL, los cilindros empleados fueron del tipo Z2DIN, mismos que se colocaron en un viscosímetro rotacional (*Pshysica RheoLab MC, Germany*) y se procedió con el ensayo.



## **7.5 Preparación de las muestras de yogur natural batido para los ensayos de solubilidad y electroforéticos**

Para los análisis de solubilidad y electroforéticos se pesó una determinada cantidad de muestra en tubos tipo *Eppendorf* de 2 mL, de acuerdo al contenido de proteína declarado en la etiqueta por el fabricante para solubilizar una concentración de proteína de 10 mg/mL, concentración utilizada para la identificación y cuantificación relativa de las principales proteínas de la leche por electroforesis capilar de zona (NMX-736/1-COFOCALEC-2012). Las muestras se conservaron a -70 °C (*Nuair*, *Revco Technologies*, NC, USA) hasta su análisis.

## **7.6 Ensayo de solubilidad de las muestras de yogur**

Se descongelaron las muestras y se realizó el ensayo de solubilidad de las proteínas. Se empleó la disolución amortiguadora de solubilidad y la disolución amortiguadora de muestra con ditioneitol (DTT, 17 mM) (condiciones reductoras) y sin DTT (condiciones no reductoras).

Las muestras se mantuvieron en agitación orbital a 800 r.p.m., a una temperatura de 40 °C (*Thermomixer*, *Eppendorf*, *Germany*) por 30 min. Para separar la grasa, las muestras se centrifugaron a 18 000 r.c.f., durante 30 min a 4 °C (centrífuga 5430 R, *Eppendorf*). Se recuperó la fracción soluble con una jeringa de 1 mL (*Norm-Ject*, HSW, *Tuttlingen*, *Germany*). Las muestras bajo condiciones reductoras se filtraron a través de una membrana de PVDF de 13 mm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro (*Agela Technologies Inc.* DE, USA) para su análisis por ECZ, mientras que por SDS-PAGE se analizaron las muestras bajo condiciones reductoras y no reductoras.

## **7.7 Determinación de proteína soluble empleando el método modificado de Lowry**

Se determinó la concentración de proteína mediante espectrofotometría (*Biospectrometer Kinetic, Eppendorf*) usando el método modificado de Lowry (Peterson, 1977). Se analizó la fracción soluble de las muestras de yogur procedentes del ensayo de solubilidad bajo condiciones no reductoras y el filtrado proveniente de la determinación de sinéresis. Se utilizó una disolución de 2 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA) (*Sigma Chemical Co., MO, USA*) como estándar de la curva de calibración (apéndice B). Se empleó un blanco de reactivos para la cuantificación de proteína en la fracción soluble de las muestras de yogur debido a la interferencia de la urea (Peterson, 1979; Moore *et al.*, 2010).

Adicionalmente se realizaron los gráficos de los residuales de las curvas de calibración usadas en la determinación de proteína soluble y no se encontraron datos anormales (apéndice B), por lo que se tiene confianza en la determinación.

## **7.8 Ensayos electroforéticos realizados a las muestras de yogur natural batido**

### **7.8.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio**

Se emplearon geles de poliacrilamida para la concentración (4 % T, 2.6 % C) y separación (12.5 % T, 2.6 % C) (apéndice C) de las proteínas de las muestras de yogur y del filtrado proveniente de la prueba de sinéresis (*Mini-PROTEAN™ Tetra Cell, Bio Rad*). La electroforesis se realizó de acuerdo a Laemmli (1970) aplicando una diferencia de potencial de 100 V (*PowerPac™ HV Power Supply, Bio-Rad*) por aproximadamente 2 h.

Como referencia de la separación electroforética se utilizaron: suero de quesería desmineralizado (**S**) (lote: D522B, Industrias Lácteas Chihuahuenses, S.A. de C.V),

caseinato de sodio (**CAS**) (lote: 61038, Lactoprot), leche cruda genuina de vaca y deshidratada por liofilización (**LC**) certificada por el Centro Nacional de Metrología (CENAM), además de una mezcla de proteínas como estándar de peso molecular (*SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range, Bio-Rad*).

Para conocer el perfil de migración de las proteínas lácteas también se analizaron muestras de leche pasteurizada (**LP**) (75 °C por 15 s), leche ultrapasteurizada (**LUHT**) (136 °C por 4 s), leche en polvo descremada de bajo calor (**LH**, por sus siglas en inglés), la cual para su elaboración fue pasteurizada a 75 °C por 18 s, posteriormente se evaporó y secó por aspersion en una planta industrial, y finalmente, leche en polvo comercial usada en la elaboración del yogur YNLP. Las muestras de leche descremada en polvo se rehidrataron a un nivel de SNG de aproximadamente 11 %.

Los geles se tiñeron con azul de *Coomassie R-250 (Bio-Rad)*, para eliminar el exceso de colorante se empleó una disolución de ácido acético: metanol: agua (1:5:4), y se conservaron en una disolución constituida por los mismos disolventes (7:5:88). Para el análisis cualitativo de los perfiles proteínicos se utilizó un fotodocumentador (*Gel Doc™ XR+Imaging System*, controlado por el *software Image Lab™ Bio-Rad ver 3.0*).

### **7.8.2 Electroforesis capilar de zona**

Para la electromigración de las proteínas se utilizó la disolución amortiguadora de separación y un capilar hidrofílico neutro *eCAP™ (Beckman Coulter)* de 50 cm de longitud efectiva, 50 µm de diámetro interno, con la ventana prefabricada y apertura óptica de 100 µm x 200 µm bajo las siguientes condiciones de trabajo: introducción hidrodinámica de la muestra durante 5 s a 0.7 psi, campo eléctrico de 500 V cm<sup>-1</sup> a 40 °C, detección de la señal a 214 nm con una velocidad de adquisición de datos de 4 Hz (*PACE MDQ, Glycoprotein System, Beckman Coulter Inc.*, controlado por el *software 32 Karat™ ver 8.0*).

Al comienzo de cada sesión se lavó el capilar con agua, se aplicaron 15 psi durante 15 min, en dirección del cátodo al ánodo. A continuación, se empleó la disolución amortiguadora de separación aplicando 15 psi durante 15 min en ambas direcciones con el fin de acondicionar el capilar. Al finalizar, el capilar se lavó con agua durante 15 min a 25 psi en ambas direcciones y se almacenó a 4 °C.

Se analizaron 2 réplicas independientes de las muestras de yogur comercial y se usó leche pasteurizada (**LP**) como control. En cada electroforegrama se registró el tiempo de migración ( $t_m$ ) y el área de cada pico electroforético. Se calculó el tiempo de migración relativo ( $t_{mr}$ ) a  $\alpha_s1$ -CN, y la concentración relativa de cada proteína conforme a Heck *et al.*, (2008).

$$C_x = \left( \frac{A_x/t_x}{\sum_{i=1}^n \frac{A_x}{t_x}} \right) \times 100$$

$C_x$ : concentración relativa de la proteína

$t_x$ : tiempo de migración de la proteína

$A_x$ : área del pico electroforético

$n$ : número total de picos que comprenden el 100 % del área.

## **8. Resultados y análisis de resultados**

### **8.1 Análisis fisicoquímicos de las muestras de yogur natural batido: acidez titulable y pH**

La AT y el pH se monitorean durante el proceso de elaboración de yogur. Cuando el pH alcanza valores de entre 4.0 a 4.6 y los valores de la AT oscilan entre 0.85 % a 1.4 % de ácido láctico se detiene la fermentación (Hill y Kethireddipalli, 2012; Oliveira, 2014). La acidificación gradual del yogur debe ser resultado de la acción de las BAL y no por la adición de agentes acidulantes pues en ese caso correspondería a leche acidificada, tal como lo indica la NOMX-F-703-COFOCALEC-2012. La producción del ácido láctico provoca el descenso del pH y la coagulación de las caseínas con la consecuente formación del gel (Corrieu y Beal, 2016).

La NOM-181-SCFI-2010, establece, en su apartado 6 que el valor de acidez, expresado como gramos de ácido láctico por cada 100 g de muestra, debe ser mínimo del 0.5 %, en tanto que el valor máximo de pH de 4.4, establecido en el apartado 9 de la NOM-185-SSA1-2002. Los resultados de las determinaciones de AT y pH se muestran en la tabla 4.

Tanto las muestras comerciales como las elaboradas en el laboratorio cumplieron con el valor de acidez titulable. Respecto al pH, las muestras comerciales, de mayor pH, cumplieron lo establecido, mientras que las elaboradas en el laboratorio alcanzaron punto isoeléctrico de las caseínas (pH de 4.6).

La variación encontrada entre los valores de AT y pH de las muestras analizadas podría deberse al tiempo de fermentación del producto, a la composición y actividad del inóculo, a la temperatura de la fermentación (Corrieu y Beal, 2016) o a la formulación misma del yogur (presencia de edulcorantes, saborizantes, estabilizantes, sustancia con que se aumentó el contenido de SNG, entre otros).

**Tabla 4. Determinación de acidez titulable y pH realizada a las muestras de yogur natural batido.**

Parámetro	comercial				laboratorio		
	YNA	YNB	YNS	YNU	YNC	YNSD	YNLP
acidez titulable <sup>1</sup>	0.97	0.83	0.97	1.14	0.96	0.93	1.2
desv. stdr.	0.004	0.004	0.002	0.003	0.017	0.003	0.015
c.v. (%)	0.4	0.46	0.21	0.26	1.71	0.32	1.2
pH	4.24	4.23	4.28	3.95	4.59	4.56	4.6
desv. stdr.	0.005	0.005	0.001	0.007	0.009	0.004	0.004
c.v. (%)	0.1	0.1	0.03	0.17	0.21	0.08	0.1

<sup>1</sup>: Expresada como porcentaje de ácido láctico (% m/m).

El hecho de que los productos que tienen la denominación de yogur puedan cumplir fácilmente con los parámetros fisicoquímicos estipulados por la normatividad, no se traduce en que estos valores resulten indicadores efectivos para asegurar que un producto que se ostenta como yogur en realidad lo sea, dificultando la verificación por parte de las autoridades.

## **8.2 Grado de sinéresis de las muestras de yogur natural batido**

La sinéresis es un defecto que se presenta en el yogur de manera común y se describe como la expulsión del suero debido a la contracción del gel de proteínas (Mizrahi, 2010). Si bien no afecta la inocuidad del producto, ocasiona una apariencia desagradable a la vista del consumidor.

La principal causa de la sinéresis es el reordenamiento de las micelas de caseína. Al momento de la gelificación hay fosfato de calcio coloidal residual en el interior de las micelas, por ello, durante el almacenamiento y a bajas temperaturas se produce

un reordenamiento de la estructura micelar y del gel (Dejmek y Walstra, 2004). La solubilización gradual del calcio residual y del fosfato de calcio resulta en un desequilibrio electrostático dentro de las micelas, debido a que hay sitios en el núcleo de las micelas de caseína que no fueron neutralizados durante la formación del gel. Esto aumenta la repulsión proteína-proteína dentro de la red proteínica, causando un debilitamiento del gel y propiciando de esta manera la expulsión del agua del gel proteínico (Dalglish y Corredig, 2012).

Para minimizar la sinéresis la industria hace uso de estabilizantes (pectina, goma guar o goma de algarroba, almidones, grenetina, etc.) (Early, 1998). Estas sustancias retardan el movimiento del agua y por ende su expulsión de la matriz, a la vez que su empleo aporta viscosidad y textura al producto (Hill y Kethireddipalli, 2012).

Un factor que interviene en la susceptibilidad al fenómeno de la sinéresis es el contenido de SNG, principalmente la cantidad de proteína. Cuanto mayor sea el contenido de proteína la tendencia a la sinéresis será menor, recomendándose concentraciones de proteína en el yogur de al menos 3.5 % m/m (Oliveira, 2014). Para constatar lo anterior, se elaboraron tres formulaciones de yogur a partir de leche enriquecida con leche en polvo descremada, suero de quesería desmineralizado y caseinatos y los valores de sinéresis determinados se compararon con los de las muestras comerciales.

En la tabla 5 se muestran los resultados de la prueba de sinéresis realizada a las muestras de yogur. Se esperaba que a mayor contenido de proteína menor fuese el grado de sinéresis, no obstante, no ocurrió lo previsto ya que los menores porcentajes de sinéresis no corresponden a las muestras con el mayor contenido de proteína.

**Tabla 5. Grado de sinéresis de las muestras de yogur natural batido**

parámetro	Comercial				Laboratorio		
	YNA	YNB	YNS	YNU	YNC	YNSD	YNLP
contenido de proteína (%)	3.04 <sup>1</sup>	3.28 <sup>1</sup>	4.12 <sup>1</sup>	4.45 <sup>2</sup>	4.27 <sup>3</sup>	5.26 <sup>3</sup>	4.62 <sup>3</sup>
sinéresis (%) <sup>4</sup>	56.88	55.25	37.19	35.22	66.43	72.13	51.53
desv. stdr.	0.04	0.32	0.31	0.03	0.09	0.50	0.05
c.v. (%)	0.56	0.67	1.8	1.5	0.13	0.6	0.11

<sup>1</sup>: Indicado en la etiqueta (% m/m).

<sup>2</sup>: Determinado por Kjeldahl.

<sup>3</sup>: Valor teórico calculado.

<sup>4</sup>: Expresado como la cantidad de sobrenadante por 100 g de muestra (% m/m).

Se observa que las muestras comerciales cuyos contenidos de proteína son equiparables (**YNA-YNB** y **YNS-YNU**) presentan valores de sinéresis similares, sin embargo, esto no sucedió con las muestras del laboratorio. Las muestras **YNSD** y **YNC** no siguen la tendencia esperada a pesar de contener 5.26 % y 4.27 % de proteína (teórico) respectivamente, este hecho se atribuye a que en ambos casos se enriqueció con una u otra de las fracciones mayoritarias de las proteínas lácteas, perdiéndose la proporción natural en que estas se presentan en la leche de bovino, 80 % caseínas y 20 % proteínas del suero (Tamime y Law, 2001).

En el caso del yogur **YNLP** se utilizó leche en polvo para el enriquecimiento, por lo que se mantuvo la proporción natural de las proteínas lácteas, si bien su grado de sinéresis es mayor que el de las muestras **YNS** y **YNU** que tienen un contenido de proteína del mismo orden de magnitud, se mantiene la tendencia esperada ya que el porcentaje de sinéresis de **YNLP** es menor que el de las muestras **YNA** y **YNB** que tienen un menor contenido de proteína de acuerdo a la etiqueta.



De lo anterior se puede inferir que para que el yogur tenga una consistencia adecuada y presente menor susceptibilidad a la sinéresis, el enriquecimiento debe hacerse respetando las proporciones naturales de las proteínas lácteas.

Se compararon los valores de sinéresis de las muestras mediante la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) (apéndice A) y se encontró que existe diferencia estadísticamente significativa entre ellos, la diferencia entre los valores se atribuye al contenido de proteína de las muestras y al origen de la proteína con que se enriqueció a la leche para la elaboración del yogur.

Con resultados obtenidos en esta determinación se sugiere que la prueba de sinéresis podría utilizarse para determinar de manera rápida y sencilla con que sustancia se enriquece a la leche para la elaboración de yogur. Si se obtienen porcentajes de sinéresis de entre el 30 % al 60 % se trataría de un enriquecimiento con leche en polvo, si el valor oscila entre el 60 % al 70 % se sospecharía de la adición de caseinatos y finalmente, si el porcentaje de sinéresis es mayor al 70 %, podría tratarse de un enriquecimiento con proteínas del suero.

Con el fin de conocer la composición del sobrenadante obtenido en la prueba de sinéresis, se determinó el contenido de proteína soluble de esta fracción (tabla 6) y se obtuvo su perfil electroforético mediante SDS-PAGE (ver apartado 8.5.1, figura 18). Se encontró que la fracción expulsada del gel tras la sinéresis está constituida exclusivamente por proteínas del suero.

Al comparar la concentración de proteína contra el contenido total de proteína en el yogur, se obtuvieron valores menores al 20 %, porcentaje en el que las proteínas séricas se encuentran en la leche de manera normal (tabla 6). La fracción de proteínas que son expulsadas del gel tras el reordenamiento de la micela de caseína, oscila entre el 29 % al 47 % del total de las proteínas del suero.

**Tabla 6. Contenido de proteína soluble en el sobrenadante obtenido en la prueba de sinéresis**

Muestra		Concentración de proteína soluble en el sobrenadante <sup>1</sup>	desv. stdr.	c.v. (%)	% de recuperación <sup>2</sup>
Comercial	YNA	3.86	0.01	0.32	6.9
	YNB	3.45	0.02	0.7	5.8
	YNS	7.41	0.05	0.67	7.03
	YNU	9.40	0.06	0.7	7.64
Laboratorio	YNC	4.79	0.07	1.08	7.71
	YNSD	5.66	0.05	0.93	7.85
	YNLP	5.97	0.05	0.89	9.43

<sup>1</sup>Expresado como mg proteína/mL de sobrenadante de la sinéresis.

<sup>2</sup>Calculado en relación al contenido de proteína teórico (g proteína en el sobrenadante/100 g de proteína total en el yogur).

### 8.3 Viscosidad de las muestras de yogur elaboradas en el laboratorio

Al evaluar visualmente la viscosidad de las muestras elaboradas en el laboratorio, se observó que la más viscosa era YNLP, seguida de YNC y YNSD (figura 15A), lo cual coincidió con la determinación experimental (figura 15B).

Experimentalmente se puede inferir qué tan viscosa es una muestra, cuanto mayores sean los valores del esfuerzo cortante, que es la aplicación de una fuerza tangencial a una superficie provocando la deformación de ésta (Wilson y Buffa, 2003), mayor será la viscosidad.

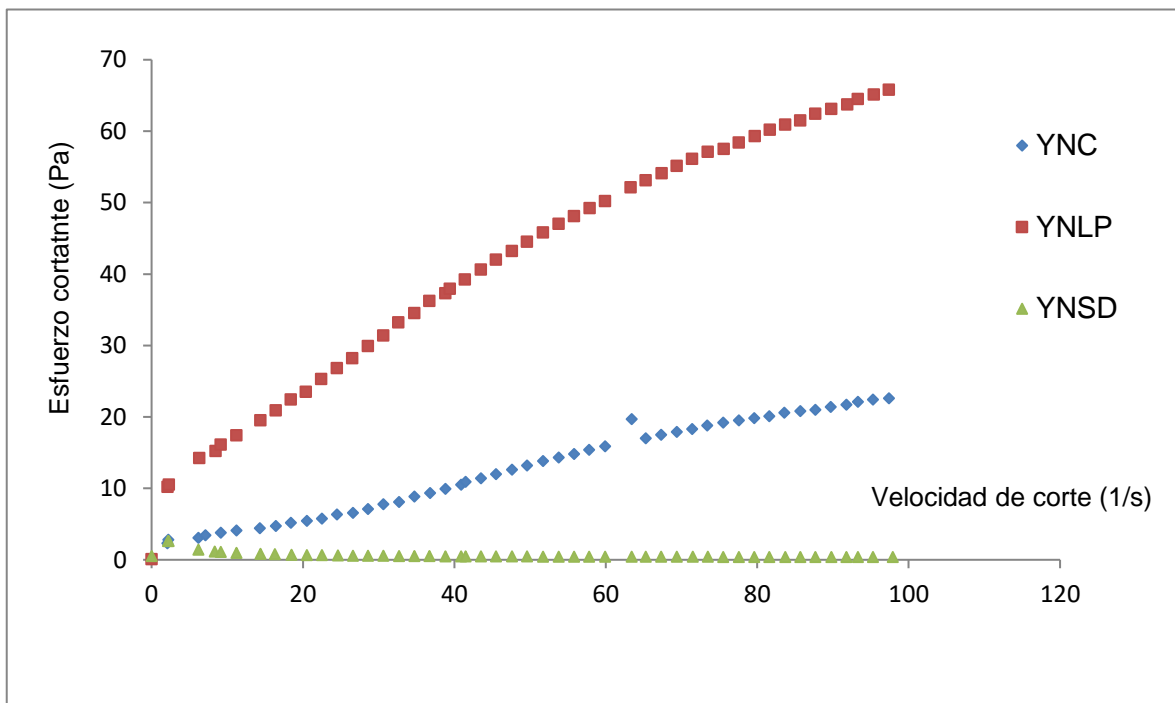
Con la estandarización del contenido de SNG se mejora la viscosidad y la consistencia del producto logrando de esta manera una mejor sensación en la boca, además de se reduce la sinéresis del producto (Oliveira, 2014). El empleo de leche en polvo descremada y de caseinatos de sodio se recomienda para la elaboración del yogur batido, mientras que el uso de proteínas de suero ofrece mejores resultados en el yogur bebible (Karam *et al.*, 2013).

**A**

YNLP

YNC

YNSD

**B**

**Figura 15. Muestras de yogur natural elaboradas en el laboratorio.** (A) Apreciación visual de la viscosidad: YNLP (izquierda), YNC (centro), y YNSD (derecha). (B) viscosidad obtenida experimentalmente (*Pshysica RheoLab MC, Germany*).

#### **8.4 Solubilidad de las muestras de yogur y contenido de proteína soluble en la fracción soluble**

Al realizar la prueba de solubilidad con la disolución amortiguadora de boratos-EDTA que solubiliza selectivamente a las proteínas lácteas (Manso *et al.*, 2002), se observó la presencia de un precipitado en todas las muestras, a diferencia del material certificado de leche fluida liofilizada y de la leche pasteurizada que se usaron como referencia. Tampoco se logró solubilizar por completo a las muestras de yogur natural al emplear la disolución amortiguadora de muestra, de mayor poder disolvente con y sin DTT, ni empleando concentraciones altas de urea (7 M) e incrementando el tiempo de extracción de 30 a 60 min.

Se cree que el precipitado observado en las muestras está formado por proteínas lácteas, lo que indicaría que sufrieron un excesivo daño térmico y en consecuencia se insolubilizaron y formaron nuevos agregados entre ellas y los demás componentes de la leche; esto se confirmó con la determinación de proteína soluble y en el ensayo de electroforesis en gel (figuras 19 y 20). Las proteínas con daño térmico podrían ser el resultado de la aplicación de un severo tratamiento térmico al momento de la manufactura, o provenir de la adición de los SNG, mismos que para su obtención fueron sometidos un tratamiento térmico previo.

Se determinó el contenido de proteína de la muestra certificada por el CENAM mediante el método de Lowry y se obtuvo un valor de proteína del 4 %, al comparar este valor con el obtenido mediante Kjeldahl (3.57 %) (CENAM 2016), hay una sobreestimación del 12.88 %. Los valores presentados en la tabla 7 consideran esa corrección.

Si bien ciertas sustancias como aminoácidos libres, lípidos, agentes reductores, tioles libres, polisacáridos, ácidos nucleicos o  $Fe^{2+}$  causan interferencia en la determinación de proteínas por el método de Lowry (Peterson, 1979), este método

se ha empleado para cuantificar el contenido de proteína en matrices alimenticias que podrían ser potencialmente adulteradas (v.g., cereales, harinas, productos lácteos), se le usa debido a su sensibilidad y bajo costo, además de que ha mostrado una buena correlación al compararse con el método de Kjeldahl (Moore *et al.*, 2010).

Se determinó el contenido de proteína soluble de las muestras de yogur provenientes del ensayo de solubilidad bajo condiciones no reductoras (tabla 7). En el caso del yogur comercial el porcentaje de recuperación de proteína fue menor al 100 %. El contenido de proteína de las muestras elaboradas en el laboratorio está sobreestimado debido a que una fracción de la leche se evaporó durante el tratamiento térmico aplicado en la elaboración del producto. Lo anterior explica el que las muestras **YNC** y **YNLP** tengan porcentajes de recuperación superiores al 100 %.

**Tabla 7. Concentración de proteína soluble de las muestras de yogur natural batido**

Parámetro	Comercial				Laboratorio		
	YNA	YNB	YNS	YNU	YNC	YNSD	YNLP
Proteína (%)	3.04 <sup>1</sup>	3.28 <sup>1</sup>	4.12 <sup>1</sup>	4.45 <sup>2</sup>	4.0 <sup>3</sup>	5.0 <sup>3</sup>	4.36 <sup>3</sup>
Concentración de proteína soluble <sup>4</sup>	6.67	6.26	6.01	5.6	12.2	10.91	14.42
desv. stdr.	0.10	0.10	0.11	0.06	0.12	0.09	0.07
c.v. (%)	1.4	1.31	1.48	1.7	1.04	0.84	0.48
% de recuperación de proteína <sup>5</sup>	66.22	62.87	60.6	58.8	112.07	78.57	134.51

<sup>1</sup>: Indicado en la etiqueta (% m/m).

<sup>2</sup>: Determinado por Kjeldahl.

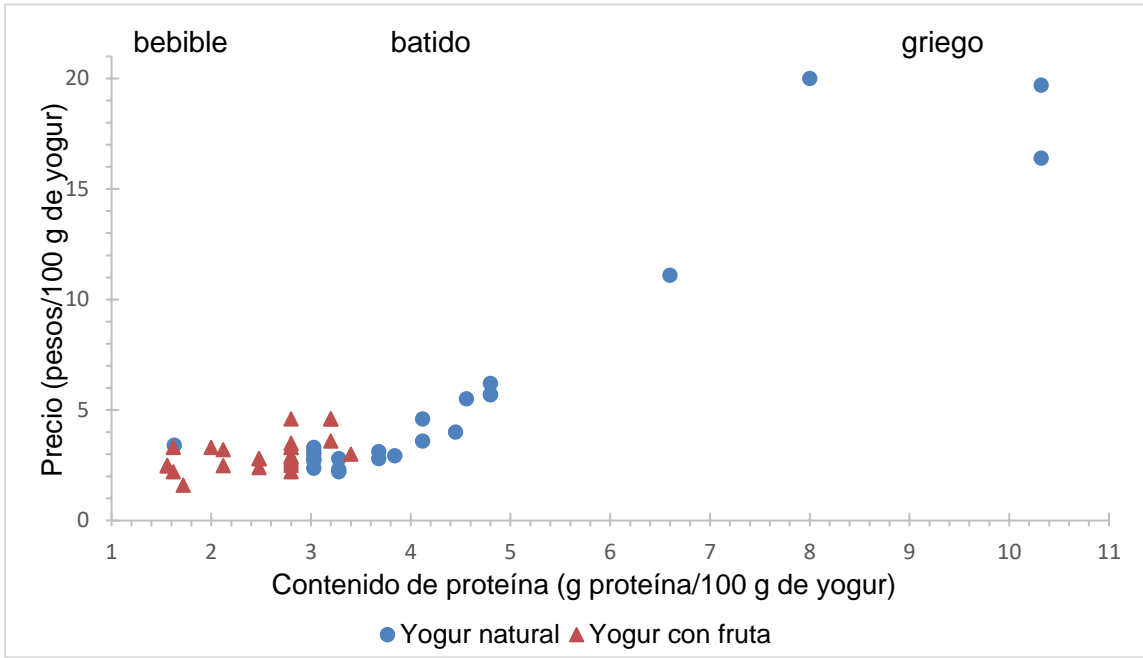
<sup>3</sup>: Valor teórico.

<sup>4</sup>: Porcentaje de proteína soluble en la muestra de yogur (mg/mL).

<sup>5</sup>: Calculado en base al contenido de proteína declarado en la etiqueta.

Los porcentajes de recuperación de proteína fueron diferentes entre las muestras, lo que podría estar relacionado con la severidad del daño térmico recibido por las proteínas. Entre menor sea el porcentaje de recuperación de proteína, mayor se espera que será el daño térmico al que las proteínas fueron sometidas.

Para saber si en el mercado existe una relación entre el precio del yogur con su contenido de proteína, se contrastó el precio de trece marcas de yogur tanto natural como con fruta (figura 16), con su contenido proteínico. En el caso del yogur natural se observa una relación directa entre ambos parámetros, sin embargo, en el caso del yogur con fruta no es tan evidente. Lo anterior no significa que un producto con mayor costo tendrá un mayor contenido de proteína. El precio está relacionado con la escala a la cual se elabora el yogur, así como con el prestigio de la marca, la tecnología empleada en el proceso de elaboración, el contenido de fruta y el punto de venta final del producto.



**Figura 16. Relación entre el precio de diferentes tipos de yogur y su contenido de proteína declarada en la etiqueta.** Datos de diferentes puntos de venta en la Ciudad de México en el 2016.

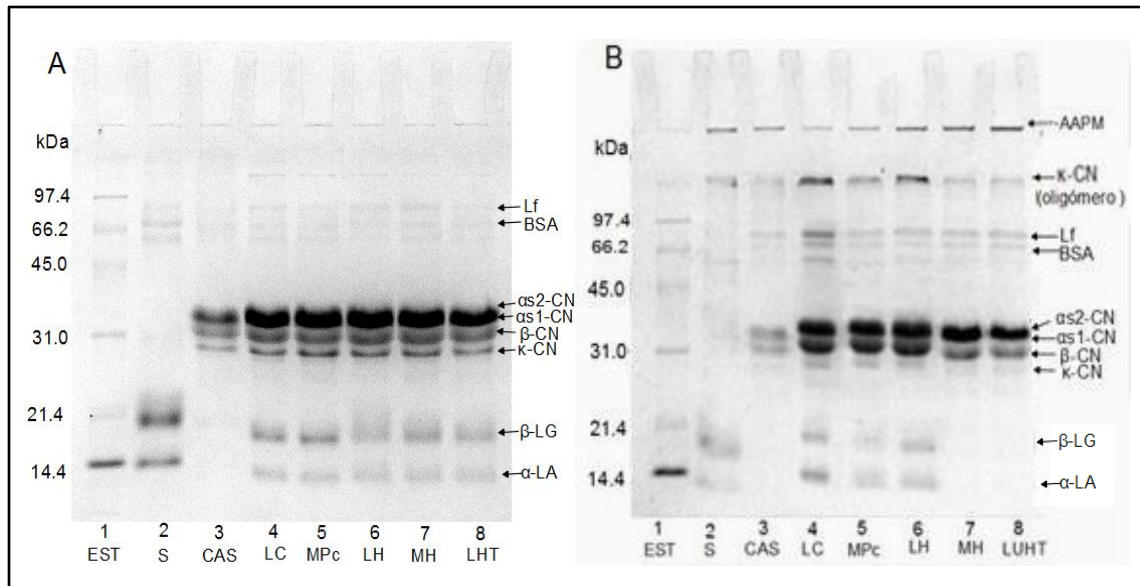
## 8.5 Análisis electroforéticos realizados a las muestras de yogur natural batido

### 8.5.1 Perfiles electroforéticos de la fracciones soluble e insoluble y del sobrenadante de sinéresis obtenidos mediante SDS-PAGE

Como se mencionó, la técnica de SDS-PAGE permite la separación de las moléculas en función de su masa molecular exclusivamente. El empleo de ésta técnica bajo condiciones reductoras y no reductoras es un método muy útil para el análisis de los puentes disulfuro presentes en las proteínas. Para reducir los puentes disulfuro se emplea un agente reductor como lo es el  $\beta$ -mercaptoetanol, en su ausencia, los enlaces covalentes formados entre los monómeros de las proteínas permanecen intactos (García, 2000).

En la figura 17 se aprecia el perfil electroforético de muestras de leche sometidas a diferentes tratamientos térmicos bajo condiciones reductoras (17A) y no reductoras (17B). Como referencia se usaron suero de quesería desmineralizado en polvo (**S**, carril 2) y caseinatos (**CAS**, carril 3), mismos que se adicionaron respectivamente al yogur **YNSD** y **YNC** durante su elaboración para aumentar el contenido de SNG.

También se empleó como referencia una muestra de leche cruda deshidratada por liofilización (**LC**) y certificada por el CENAM (carril 4). En el carril consecutivo (5) está una muestra de leche descremada y pasteurizada (**MPc**) que se usó como materia prima para la elaboración del yogur. La muestra del carril 6 corresponde a leche descremada en polvo de bajo calor (**LH**) (pasteurizada a 75 °C por 18 s; evaporada y secada por aspersión). La muestra del penúltimo carril (7), corresponde a la leche en polvo comercial utilizada para enriquecer la leche en el proceso de elaboración del **YNLP**, de la cual se desconoce el tratamiento térmico empleado para su obtención. Finalmente, en el carril 8 está una muestra de leche ultrapasteurizada (**LUHT**).



**Figura 17. SDS-PAGE. Muestras de leche cruda e industrializada bajo condiciones reductoras (A) y no reductoras (B) (12.5 %T, 2.6 %C).** Aproximadamente 50 µg de proteína por pozo. Mezcla de estándares de peso molecular (EST); suero de quesería desmineralizado en polvo (S); caseínas (CAS); leche cruda liofilizada (LC); leche descremada pasteurizada (MPc); leche en polvo de bajo calor (LH); leche en polvo adicionada a la muestra YNLP (MH); leche ultra pasteurizada (LUHT). Tinción con azul de *Coomassie* (0.05 %) (*Gel Doc<sup>TM</sup> XR+Image System, Bio Rad*).

Para determinar la identidad de las proteínas se calculó su peso teórico y se comparó con el perfil las proteínas lácteas del suero (carril 2) y las caseínas (carril 3), además de que los patrones de las bandas se contrastaron con trabajos previos (Kinghorn *et al.*, 1995; Patel *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2007).

Bajo condiciones reductoras en las muestras de leche industrializada (carriles 5 a 8), se aprecia el mismo patrón de bandas que la muestra de leche cruda genuina certificada por el CENAM (carril 4). En la parte inferior del gel separador se observan las proteínas mayoritarias del suero, que son las de mayor movilidad electroforética y de menor peso molecular (Lin *et al.*, 2010); primero migra α-LA, seguida de β-LG cuyas variantes genéticas A y B co-migran como una sola banda (Kinghorn *et al.*, 1995).



En el centro del gel separador se localizan las caseínas (CAS) integradas por cuatro familias de proteínas:  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN, y  $\kappa$ -CN. Las dos primeras al no resolverse se observan como una sola banda, enseguida migra  $\beta$ -CN y  $\kappa$ -CN. Finalmente migran las proteínas minoritarias del suero, la albúmina sérica bovina (BSA) y la lactoferrina (Lf) (Patel *et al.*, 2007).

Bajo condiciones no reductoras (figura 17B), en las muestras de leche (carriles 4 a 8) la banda correspondiente a  $\kappa$ -CN se observa tenue, a la vez que se aprecia una banda de alto peso molecular, que podría ser un oligómero de  $\kappa$ -CN, ya que puede encontrarse en su forma nativa como monómero o hasta 10 moléculas unidas mediante puentes disulfuro (Rasmussen, *et. al.*, 1992).

En los carriles 5 y 6 (**MPc** y **LH**), las proteínas del suero que son las más termolábiles se aprecian tenues y se observa una fracción de muestra que no entró en la parte superior del gel concentrador, esta fracción posiblemente corresponda a agregados de alto peso molecular (AAPM) de más de 500 kDa, se cree que dichos agregados están formados por las proteínas del suero y  $\kappa$ -CN unidos a través de puentes disulfuro (Patel *et al.*, 2006).

Finalmente, en los carriles 7 y 8, correspondientes a las muestras de leche en polvo usada en la elaboración del yogur **YNLP** y leche **UHT**, ya no se aprecian las proteínas del suero ni la  $\kappa$ -CN y en su lugar se observan con mayor intensidad los AAPM en la parte superior del gel concentrador.

La  $\beta$ -LG parece ser la proteína más sensible a la formación de dichos agregados de alto peso molecular, esto es debido al grupo tiol de la Cys<sub>121</sub> que durante el tratamiento térmico está disponible para participar en enlaces disulfuro, inicialmente con  $\beta$ -LG y después con  $\kappa$ -CN y  $\alpha_{s2}$ -CN (Patel *et al.*, 2007).

La intensidad de la banda es proporcional al contenido de proteína, por ello, conforme el tratamiento térmico al que se sometieron las muestras de leche es más

drástico, las bandas de las proteínas del suero y  $\kappa$ -CN se aprecian más tenues y los AAPM se ven con mayor intensidad (Patel *et al.*, 2006).

El peso molecular de los perfiles de migración se calculó empleando estándares de peso molecular (tabla 8). El peso de las caseínas se sobreestima debido a la diferente capacidad de unión que éstas presentan con el SDS a un pH mayor a 7 (el pH del gel separador es de 8.8); lo anterior es provocado por la desigual distribución de la carga negativa a lo largo de la cadena polipeptídica de las caseínas, resultando en la formación de complejos de caseína-SDS de mayor volumen hidrodinámico (Creamer y Richardson, 1984).

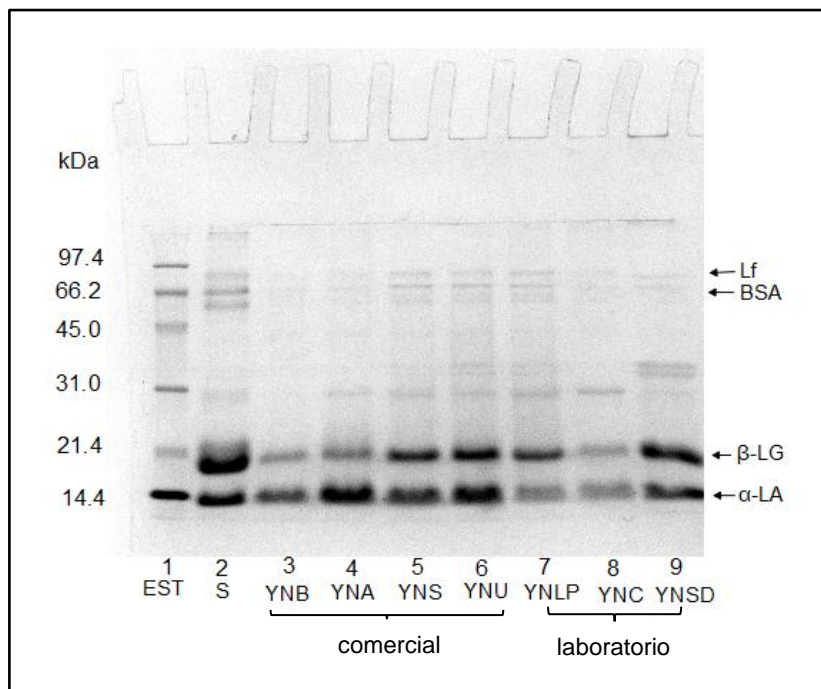
**Tabla 8. Pesos teóricos y calculados de las principales proteínas de la leche bovina**

Nombre	$\alpha$ -LA	$\beta$ -LG	$\kappa$ -CN	$\beta$ -CN	$\alpha$ -CN	BSA	Lf
<b>Teórico (kDa)<sup>1</sup></b>	14.2	18.3	19.0	23.9	25.2	66.4	80
<b>Calculado (kDa)<sup>2</sup></b>	14.1	18.2	29.2	32.9	36.9	70.8	77.2

<sup>1</sup>Edwards y Jameson, 2014.

<sup>2</sup>Calculado con *Image LAB™ software* ver 3.0.

En la figura 18 bajo condiciones reductoras se muestra el perfil de bandas correspondiente al sobrenadante obtenido de las muestras de yogur después de realizar la prueba de sinéresis. Como referencia se usó suero de quesería desmineralizado en polvo (**S**). En todas las muestras se identificaron las proteínas del suero  $\beta$ -LG y  $\alpha$ -LA, lo que indica que, como se ha reportado anteriormente, éstas proteínas son expulsadas de la red tridimensional cuando se contrae.



**Figura 18. SDS-PAGE. Muestras del sobrenadante de la determinación de sinéresis de las muestras de yogur natural batido.** Condiciones reductoras (12.5 % T, 2.6 % C). Mismas condiciones de la figura 17.

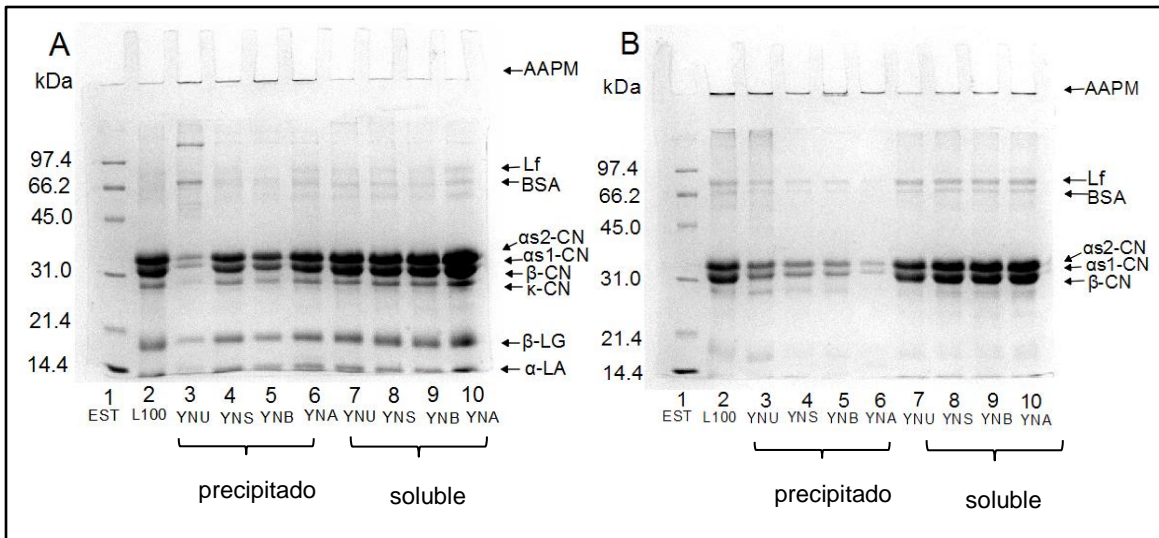
Finalmente, se obtuvieron los perfiles electroforéticos de las fracciones soluble e insoluble (precipitado) de las muestras de yogur bajo condiciones reductoras y no reductoras. Para el yogur comercial se usó como control leche en polvo rehidratada, misma que antes de ser secada por aspersión en una planta industrial fue calentada a 100 °C por 15 s. Para el yogur hecho en el laboratorio se utilizaron como controles la leche pasteurizada descremada usada en la elaboración del yogur (**MPc**), la leche en polvo rehidratada adicionada a YNLP (**MH**) y leche ultrapasteurizada (**LUHT**).

Bajo condiciones reductoras (figura 19A y figura 20A) en los controles y muestras de yogur, se aprecian las caseínas y las proteínas del suero; sin embargo, en la parte superior del gel concentrador, en los pozos correspondientes a la fracción de muestra que precipita (figura 19A, carriles 3 a 6 y figura 20A, carriles 5 a 7), se observan agregados resistentes a la acción del agente reductor empleado.

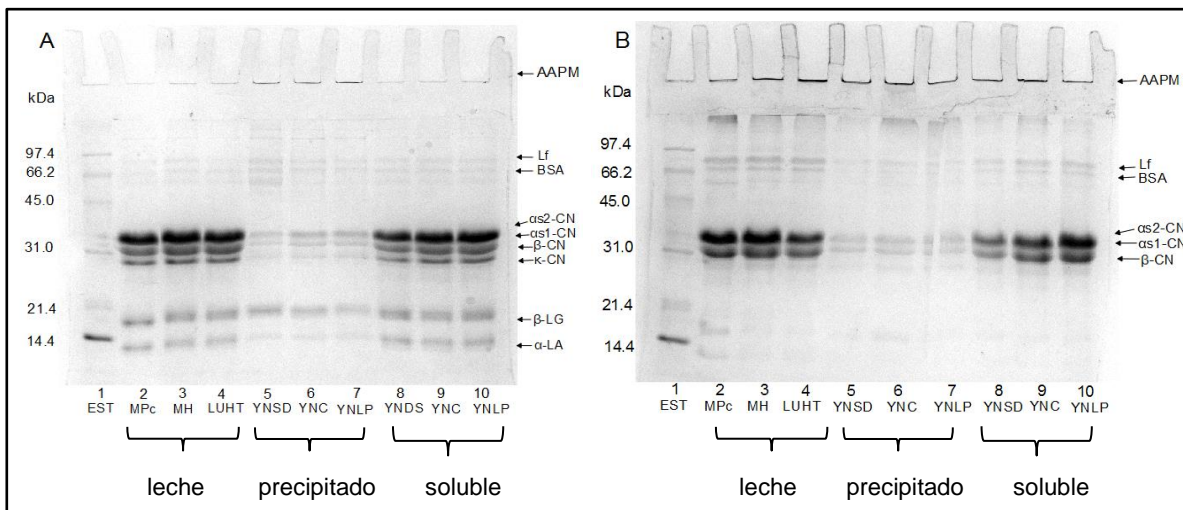
La resistencia de estos AAPM a los agentes reductores utilizados en la preparación de la muestra podría significar la formación de enlaces covalentes diferentes a los puentes disulfuro (Manzo *et al.*, 2015). Podría tratarse de productos de entrecruzamiento de las proteínas, como la lisinoalalina y la lantionina que son resistentes a la hidrólisis por parte de las enzimas digestivas disminuyendo el valor biológico de la proteína (Wada y Lonnerdal, 2014).

Lo anterior es un hecho preocupante porque una de las razones por las cuales la gente consume el yogur, es por su valioso aporte proteínico a la dieta. Además, como se observó en la prueba de solubilidad y en los perfiles electroforéticos de SDS-PAGE, las proteínas se insolubilizan y entre ellas forman complejos que no podemos digerir, sugiriendo que el tratamiento térmico al que se somete el yogur para su elaboración es excesivo o que las sustancias añadidas para aumentar el contenido de SNG ya presentaban daño térmico. Estos resultados enfatizan la importancia en la selección de los ingredientes y de los procesos térmicos empleados en la fabricación del yogur y demás productos de la leche, por lo cual es importante que las autoridades verifiquen no solo la cantidad en que se presentan las proteínas lácteas en la leche y sus derivados, sino también la calidad de estas.

En condiciones no reductoras (figura 19B y figura 20B), en los controles y en las muestras de yogur tanto soluble como precipitado, no se observan las proteínas del suero y ni  $\kappa$ -CN confirmando la formación de complejos entre estas proteínas a causa del tratamiento térmico empleado los cuales se observan en la parte superior del gel concentrador.



**Figura 19. SDS-PAGE. Muestras de yogur comercial natural batido bajo condiciones reductoras (A) y no reductoras (B) (12.5 % T, 2.6 % C).** Mezcla de estándares de peso molecular (EST); leche en polvo (L100); precipitado y fracción soluble de las muestras de yogur YNU, YNS, YNB y YNA. Mismas condiciones de la figura 17.



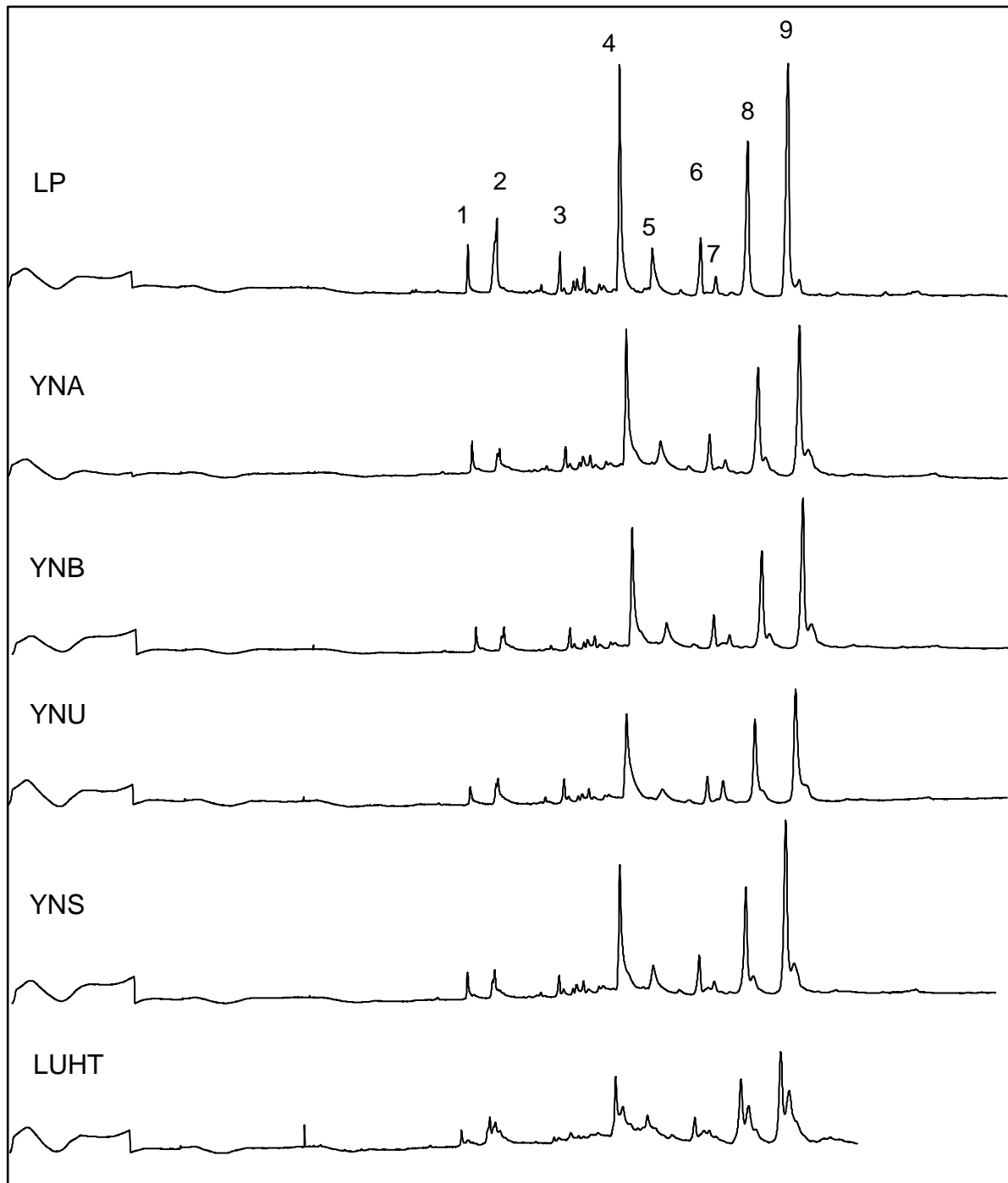
**Figura 20. SDS-PAGE. Muestras de yogur natural batido elaborado en el laboratorio bajo condiciones reductoras (A) y no reductoras (B) (12.5 % T, 2.6 % C).** Mezcla de estándares de peso molecular (EST); leche descremada pasteurizada (MPc); leche en polvo usada en la elaboración de YNLP (MH); leche ultrapasteurizada (LUHT); precipitado y fracción soluble de las muestras YNSD, YNC y YNLP. Mismas condiciones de la figura 17.

### 8.5.2 Perfiles electroforéticos de la fracción soluble de las muestras comerciales de yogur obtenidos mediante electroforesis capilar de zona

En ECZ el uso de capilares con un recubrimiento hidrofílico mediante una solución amortiguadora de pH 3.0 y el uso de aditivos poliméricos, como es la metilhidroxietil celulosa (MHEC) o la hidroxipropilmetil celulosa (HPMC), hace posible la separación simultánea de las proteínas de suero y de las caseínas, incluyendo algunas de sus variantes genéticas en función de su relación carga/masa. Al pH de trabajo, las proteínas lácteas adquieren carga formal positiva debida a los residuos de aminoácidos básicos (histidina, lisina y arginina) y migran hacia el cátodo.

Se obtuvieron los electroforegramas de las muestras comerciales de yogur, de leche entera estandarizada y pasteurizada a 75 °C por 15 s (**LP**) y leche parcialmente descremada que se sometió a 136 °C por 4 s (**LUHT**) en una planta industrial (figura 21). La detección de las proteínas se realizó a 214 nm, debido a que la absorbancia de una proteína a esta longitud de onda es proporcional al número de enlaces peptídicos y los residuos de los aminoácidos aromáticos presentan menor interferencia (Heck *et al.*, 2008). Los electroforegramas de las muestras de yogur y leche, así como sus parámetros de integración se encuentran en el apéndice D

Las proteínas lácteas se separan y migran en el siguiente orden:  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s0}$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -CN B,  $\beta$ -CN A<sup>1</sup> y  $\beta$ -CN A<sup>2</sup>. En los electroforegramas se observa que primero migran las proteínas del suero, el primer pico corresponde a  $\alpha$ -LA y el segundo a  $\beta$ -LG (picos 1 y 2 de la figura 21, LP), ésta última proteína presenta un ligero hombro causado por la presencia de las dos principales variantes genéticas de  $\beta$ -LG predominantes en la raza Holstein (Meza *et al.*, 2010).



**Figura 21. Electroforegramas de muestras de leche pasteurizada (LP); de yogur natural batido comercial (YNA, YNB YNS, YNU) y leche ultrapasteurizada (LUHT).** Capilar hidrofílico neutro (50 cm de longitud efectiva, 50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno eCAP™ Beckman Coulter). Las señales corresponden a las proteínas lácteas en LP 1:  $\alpha$ -LA, 2:  $\beta$ -LG, 3:  $\alpha\text{S}_2$ -CN, 4:  $\alpha\text{S}_1$ -CN, 5:  $\alpha\text{S}_0$ -CN, 6:  $\kappa$ -CN, 7:  $\beta$ -CN B, 8:  $\beta$ -CN A<sup>1</sup> y 9:  $\beta$ -CN A<sup>2</sup>. Misma escala.

Las señales que aparecen en el electroforegrama corresponden a las caseínas, la primera es  $\alpha_{s2}$ -CN (señal 3, figura 21, LP), la más hidrofílica de las caseínas que migra como un pico mayoritario seguido de un grupo de picos menores con diferentes grados de fosforilación que comigran con los productos de hidrólisis de las  $\beta$ -CN (Ortega *et al.*, 2003, Heck *et al.*, 2008). A continuación migra  $\alpha_{s1}$ -CN (figura 21 LP, pico 4) también conocida como  $\alpha_{s1}$ -CN 8P que se aprecia como el pico más alto debido a que es la caseína más abundante. La siguiente proteína es  $\alpha_{s0}$ -CN o  $\alpha_{s1}$ -CN 9P (pico 5);  $\alpha_{s0}$ -CN difiere de  $\alpha_{s1}$ -CN en un grupo fosfato adicional localizado en la posición 41 del residuo de serina, el grupo fosfato extra resulta en una mayor carga negativa y por tanto en un mayor tiempo de migración (Heck *et al.*, 2008).

Se han identificado las variantes genéticas A, B y C de  $\kappa$ -CN empleando la técnica de electroisoelectroforesis, sin embargo, éstas no se resuelven empleando la ECZ. Las dos primeras variantes ofrecen mejor rendimiento y son de mayor interés para el desarrollo de la industria láctea (Ortega *et al.*, 2003). La variante A difiere de la B por tener un residuo de Asp en la posición 148 en lugar de un residuo de Ala como ocurre en la  $\kappa$ -CN B, el resultado es que esta última proteína es más electropositiva, sin embargo, el residuo de ácido aspártico está protonado al pH de trabajo (pH 3, pKa de la cadena lateral = 3.96) y se evita la separación de las dos variantes genéticas (figura 21 LP, pico 6) (Recio *et al.*, 1997b).

Por último, migra  $\beta$ -CN, la más hidrofóbica de las caseínas con sus principales variantes genéticas:  $\beta$ -CN B,  $\beta$ -CN A<sup>1</sup> y  $\beta$ -CN A<sup>2</sup> (picos 7 a 9). La variante B de la  $\beta$ -CN difiere de la  $\beta$ -CN A<sup>2</sup> en un aminoácido en la posición 122. La diferencia es el residuo de serina en  $\beta$ -CN A<sup>2</sup> y arginina en  $\beta$ -CN B, por lo que ésta última migra primero (Miralles *et al.*, 2003). La variante A<sup>1</sup> de  $\beta$ -CN a diferencia de  $\beta$ -CN A<sup>2</sup> contiene histidina en vez de prolina en la posición 67, la cual está positivamente cargada a un pH menor de 6, y como consecuencia tiene mayor movilidad (Ortega *et al.*, 2003).



Al contrastar el electroforegrama de leche pasteurizada (LP) con los electroforegramas de las muestras de yogur y con el de la leche ultrapasteurizada (LUHT), se observa que los picos de LP son de mayor altura, lo que se relaciona con el contenido de proteína soluble, pues cuanto mayor sea éste, mayor altura y área tendrán los picos. Como se mencionó anteriormente, las muestras de yogur no se solubilizaron por completo, por lo que su concentración de proteína soluble es menor al de la leche pasteurizada y se refleja en el área total de los electroforegramas (apéndice D).

También se observa una deformación en las señales de las muestras de yogur y de leche ultrapasteurizada en comparación con la leche pasteurizada, esto es causado por el tratamiento térmico que desnaturaliza las proteínas y se aprecia como irregularidades y pérdida de la simetría en el trazo de los picos. Se ha observado que al comparar muestras de leche en polvo contra muestras leche cruda, hay un incremento en los tiempos de migración de las proteínas del suero, sobre todo en  $\beta$ -LG, éste aumento en los tiempos de migración se atribuye a la lactosilación de  $\beta$ -LG, causando en un cambio en la relación carga/masa de la proteína (De Block *et al.*, 2003).

Para las muestras de yogur y de leche pasteurizada, se calculó el tiempo de migración relativo de las proteínas (tabla 9), que es el tiempo de migración de la proteína dividido entre el tiempo de migración del punto de referencia, para ello, se dividió el tiempo de migración de cada pico entre el tiempo de migración de  $\alpha_{s1}$ -CN, a cuyo pico le corresponde la mayor área.

Estos resultados coinciden con los publicados en la NMX-736/1-COFOCALEC-2012 obtenidos a partir del estudio de comparaciones interlaboratorio de cuatro instituciones.

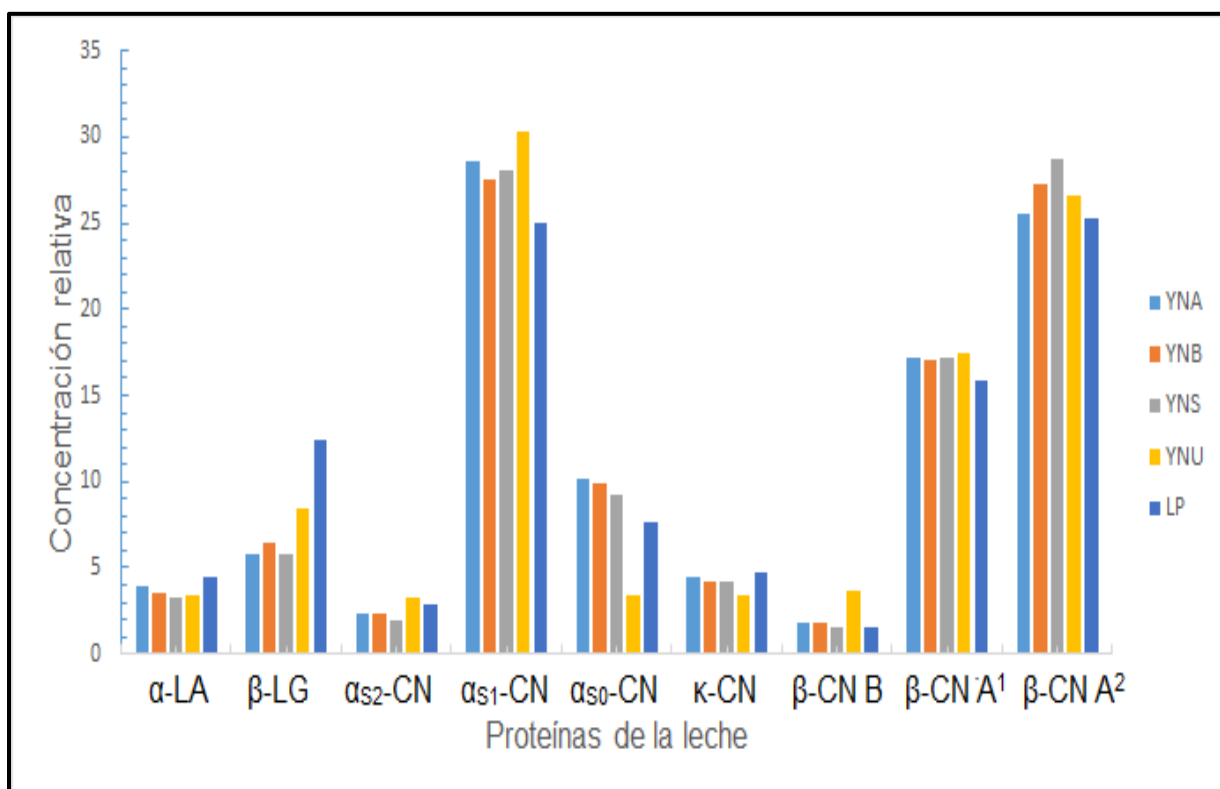
**Tabla 9. Tiempos de migración relativos promedio de las principales proteínas lácteas de las muestras de yogur comercial y leche pasteurizada**

principales proteínas de la leche		YNA	YNB	YNS	YNU	LP
proteínas del suero	$\alpha$ -LA	0.75	0.75	0.75	0.75	0.80
	$\beta$ -LG	0.79	0.79	0.79	0.79	0.80
caseínas	$\alpha_{S2}$ -CN	0.90	0.90	0.90	0.90	0.91
	$\alpha_{S1}$ -CN	1	1	1	1	1
	$\alpha_{S0}$ -CN	1.06	1.06	1.06	1.06	1.05
	k-CN	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14
	$\beta$ -CN B	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16
	$\beta$ -CN A <sup>1</sup>	1.21	1.21	1.21	1.21	1.21
	$\beta$ -CN A <sup>2</sup>	1.28	1.28	1.28	1.28	1.25

Los resultados de la concentración relativa de cada proteína se muestran en la tabla 10 y la figura 22.

**Tabla 10. Concentración relativa (Cr) promedio de las principales proteínas lácteas en las muestras de yogur comercial y leche pasteurizada**

principales proteínas de la leche		YNA	YNB	YNS	YNU	LP
proteínas del suero	$\alpha$ -LA	3.87	3.50	3.22	3.44	4.53
	$\beta$ -LG	5.84	6.39	5.76	8.41	12.42
	$\Sigma$ =	<b>9.71</b>	<b>9.89</b>	<b>8.98</b>	<b>11.85</b>	<b>16.95</b>
caseínas	$\alpha_{S2}$ -CN	2.39	2.37	1.93	3.26	2.89
	$\alpha_{S1}$ -CN	28.65	27.56	28.13	30.36	24.98
	$\alpha_{S0}$ -CN	10.14	9.93	9.24	3.39	7.58
	$\kappa$ -CN	4.46	4.16	4.24	3.46	4.79
	$\beta$ -CN B	1.79	1.86	1.59	3.65	1.60
	$\beta$ -CN A <sup>1</sup>	17.24	17.02	17.19	17.39	15.89
	$\beta$ -CN A <sup>2</sup>	25.60	27.21	28.69	26.63	25.32
	$\Sigma$ =	<b>90.27</b>	<b>90.11</b>	<b>91.01</b>	<b>88.14</b>	<b>83.05</b>



**Figura 22. Concentración relativa de las principales proteínas lácteas en las muestras comerciales de yogur natural batido y leche pasteurizada.**

De manera normal, el contenido de proteínas de la leche se encuentra distribuido con un 76 a 88 % entre las caseínas ( $\alpha_{s1}$ -CN: 44 % a 55 %;  $\beta$ -CN: 25 % a 35 %,  $\kappa$ -CN: 8 % a 15 % y  $\gamma$ -CN: 3 % a 7 %) y con un 15 % a 22 % entre las proteínas del suero ( $\beta$ -LG: 7 % a 12 %,  $\alpha$ -LA: 2 % a 5 %, IgG: 1.9 % A 3.3 %) (Tamime y Robinson, 2007). Al someter a la leche a un tratamiento térmico se modifican estas concentraciones debido a que las proteínas se insolubilizan, siendo más susceptibles las proteínas del suero. Por ejemplo, el contenido de éstas proteínas tras el tratamiento de ultrapasteurización disminuye hasta en un 85.0 %. Además, se observó que  $\alpha$ -LA exhibía mejor tolerancia térmica debido a su capacidad de unión al calcio (Lin *et al*, 2010).

Experimentalmente se encontró que la relación natural caseínas/ proteínas del suero (CAS/PS) se modificó en las muestras de yogur en comparación con la leche pasteurizada. Mientras que para la leche se obtuvo una relación de 83.05/16.95, en el caso del yogur la relación oscila entre el 88.14/11.85 al 90.27/9.71 (tabla 10). También se obtuvo que la concentración relativa de  $\beta$ -LG desciende entre el 30.08 % al 47.02 %, mientras que la de  $\alpha$ -LA disminuyó entre el 12.36 % al 28.91 %

En un estudio comparativo entre muestras de leche del mismo origen, estandarizada y procesada térmicamente, se demostró previamente en el laboratorio, que la pasteurización no afecta el perfil electroforético de las proteínas de la leche de vaca. Sin embargo, la desnaturalización de las proteínas lácteas se muestra como pérdida de la eficiencia y menores señales de cada pico electroforético y en consecuencia del área total. El ensanchamiento, picos múltiples y dobletes sugiere la formación de enlaces covalentes diferentes a los puentes disulfuro (Strickland *et al.*, 2001).

## 9. Conclusiones

Se llevó a cabo un análisis de calidad de yogur en muestras de yogur natural batido comerciales y en elaboradas en el laboratorio. Se consideraron parámetros fisicoquímicos, el fenómeno de sinéresis y el análisis de proteínas.

En términos fisicoquímicos todas las muestras cumplieron con los valores de acidez titulable y pH establecidos en la normatividad vigente.

Se analizó el grado de sinéresis mismo que está relacionado con el contenido de proteína siempre y cuando se conserve la relación natural de las proteínas lácteas.

Los resultados indican que el líquido producto de sinéresis está constituido mayoritariamente por las proteínas del suero, de acuerdo a lo observado mediante SDS-PAGE. Esta prueba puede utilizarse para determinar con qué sustancia se enriquece al yogur para aumentar el contenido de SNG. Valores de sinéresis de entre el 30 % al 60 % indican adición de leche en polvo; entre el 60 % al 70 % sería enriquecimiento con caseinatos; finalmente, valores mayores al 70 % sugieren enriquecimiento con proteínas del suero. En virtud de que los valores obtenidos de las muestras comerciales no superan el 60%, se considera posible el enriquecimiento con leche en polvo.

En el análisis de proteínas se presentó la insolubilidad de las muestras de yogur en las disoluciones amortiguadoras, independientemente de la adición de DTT. A pesar de ello fue posible realizar los análisis por SDS-PAGE y se demostró que el precipitado corresponde a proteínas lácteas, por tanto, no hubo adición de proteínas de otro tipo. Sin embargo, es importante asegurarse que las proteínas presentes en los productos lácteos, además de ser exclusivamente proteínas de la leche, estén disponibles para su aprovechamiento.

El tratamiento térmico al que se sometió la leche para producir yogur propició la desnaturalización de las proteínas, causó la insolubilización de las proteínas lácteas y originó la formación de AAPM principalmente entre  $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA y k-caseína. También se observaron complejos resistentes a la acción de los agentes reductores usados en la preparación de muestra.

La ECZ se pudo llevar a cabo de acuerdo a lo descrito en la norma mexicana vigente NMX-F-736/1-COFOCALEC 2012 y, además de corroborar el perfil de proteínas lácteas, se confirmó el daño térmico que presentan las proteínas de las muestras de yogur analizadas. Los resultados se complementan con las técnicas electroforéticas de SDS-PAGE.

## **10. Perspectivas**

A pesar de que se logró obtener un perfil de proteínas característico de la leche, es necesario optimizar el método de extracción de proteínas con el fin de solubilizar toda la muestra, pues podría haber precipitación selectiva de algunas proteínas.

Queda por demostrar que el método sea aplicable al análisis del yogur en otras presentaciones (con fruta, saborizado, bebible, con mayor o menor contenido de proteína), pues pueden encontrarse componentes adicionales que interfieran con el análisis o compliquen aún más la precipitación completa de la muestra.

La precipitación y la formación de los agregados de alto peso molecular puede analizarse mediante electroforesis en segunda dimensión para conocer su composición.

Finalmente, el uso de esta metodología en forma rutinaria implicará validar el método de análisis para aplicarlo en el estudio del yogur.

## 11. Bibliografía

1. Ambrosi, V., Polenta, G., González, C., Ferrari, G., y Maresca, P. 2016. High hydrostatic pressure assisted enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 30, 1-8.
2. Anema, S. 2014. The whey proteins in milk: thermal denaturation, physical interactions and effects on the functional properties of milk. En: M. Boland, H. Singh y A. Thompson. Eds. *Milk Proteins. From Expression to Food*. Segunda edición. Palmerston North: Academic Press, 269-318.
3. Behare, P., Kumar, H., y Mandal, S. 2016. Yogurt: Yogurt Based Products. En: B. Caballero, P. Finglas y F. Toldrá. Eds. *Encyclopedia of Food and Health*. Oxford: Academic Press, 625-361.
4. *Bio Rad. Product information. Laemmli sample buffer*. [En línea] (Actualizado junio del 2013).  
Disponible en:  
<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006028.pdf> (último acceso: 12 de febrero de 2017).
5. Blanco, R. 2009. Desarrollo de nuevas metodologías analíticas basadas en la electroforesis capilar en medio no acuoso para la determinación de contaminantes emergentes en muestras medioambientales. Memoria para obtener el grado de Doctora en Química. Universidad de Santiago de Compostela, España.
6. Brew, K. 2013.  $\alpha$ -lactoalbumin. En: P. McSweeney y P. Fox. Eds. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins Basic Aspects*. Cuarta edición. New York: Springer Science Business Media, 261-273.
7. Butler, M. 2012. Capillary electrophoresis: principles and instrumentation. En: M, Butler. Ed. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. San Diego California: Academic Press, 141-165.
8. Cala, M., Vázquez, A., García, A., Martínez, J. y Stashenko, E. 2011. Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta

- eficiencia de catequinas extraídas de cinco variedades de cacao colombiano. *Revista Académica Colombiana de Ciencias*, 35, 371-379.
9. CANILEC, 2015. Estadísticas. Importaciones y exportaciones de leche en México. [En línea] (Actualizado diciembre 2015).  
Disponible en:  
<http://www.canilec.org.mx/2016/estadisticas-importaciones.html> (Último acceso 11 de diciembre del 2016)
  10. Carrillo, J., Candia, M., Lugo, R., Espinoza, E., y Noriega, J. 2013. Evaluación de procedimientos de tinción para el análisis de proteínas por electroforesis (SDS-PAGE). *INVURNUS*, 8, 19-26.
  11. Castagnino, J. 2000. Electroforesis capilar. *BIOQUIMIA*, 25, 297-329.
  12. Castillo, M., Revilla, A., López, R., y Rivera, P. 2005. *Fundamentos de electroforesis capilar*. Cuautitlán: UNAM Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
  13. CENAM 2016. Centro Nacional de Metrología. Dirección General de Metrología de Materiales. Ensayo de aptitud para la medición de parámetros bromatológicos en leche fluida liofilizada CNM-A-EA-630-005/206.
  14. Charoenrei, S., Tatirat, O., y Muadklay, J. 2008. Use of centrifugation–filtration for determination of syneresis in freeze–thaw starch gels. *Carbohydrate Polymers*, 73,143–147.
  15. Chen, F., y Zang, J. 1992. Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. *Journal of AOAC International*, 75, 905-909.
  16. Claeys, W., Van Loey, A., y Hendrickx, M. 2002. Intrinsic time temperature integrators for heat treatment of milk. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 293-311.
  17. Condon, R., Mariné, A., y Rafecas, M. 1988. Yogur: elaboración y valor nutritivo. *Fundación española de la nutrición*, 10, 1-39.
  18. Corrieu, G., y Beal, C. 2016. Yogurt: The product and its manufacture. *En: B. Caballero, P. Finglas y F. Toldrá. Eds. Encyclopedia of Food and Health*. Oxford: Academic Press, 617-624.



19. Creamer, L., y Richardson, T. 1984. Anomalous behavior of bovine  $\alpha_{s1}$  and  $\beta$ -caseins on gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate buffers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 234, 476-486.
20. Dalglish, D., y Corredig, M. 2012. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 449-467.
21. Danone, 2013. *A brief history of yogurt*. [En línea].  
Disponible en:  
<http://downtoearth.danone.com/2013/01/31/a-brief-history-of-yogurt/> [Último acceso el 29 de enero de 2017].
22. Danone, 2015. *Nuestro legado*. [En línea].  
Disponible en:  
<http://www.danone.com/es/para-todos/mision-en-accion/nuestro-legado/>  
[Último acceso el 29 de enero de 2017].
23. De Block, J., Merchiers, M., Mortier, L., Breakman, A., Ooghe, W. y Van Renterghem, R. 2003. Monitoring nutritional quality of milk powders: capillary electrophoresis of the whey protein fraction compared with other methods. *International Dairy Journal*, 13, 87-94.
24. De Jong, N., Visser, S., y Olieman, C. 1993. Detection of milk proteins by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 652, 207-213.
25. Dejmek, P., y Walstra, P. 2004. The syneresis of rennet-coagulated curd. En: P. Fox, P. McSweeney, T. Cogan y T. Guinee. Eds. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1. General Aspects*. Tercera edición. London: Academic Press, 71-103.
26. De La Fuente, M., y Juárez, M. 2005. Authenticity assessment of dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 563-585.
27. Domínguez, M., Jacksén, J., Emmer, A., y Centurion, M. 2016. Capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of carbohydrates and proline in honey samples. *Microchemical Journal*, 129, 1-4.
28. Early, R. 1998. *The Technology of Dairy products*. Segunda edición. London: Blackie Academic and Professional.

29. Edwards, P., y Jameson, G.B. 2014. Structure and stability of whey proteins. En: M. Boland, H. Singh y A. Thompson. Eds. *Milk Proteins: From Expression to food*. Segunda edición. Palmerston North: Academic Press, 201-242.
30. Encuesta mensual de la Industria Manufacturera. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. INEGI, 2016. [En línea] (Actualizado al 15 de octubre de 2016).  
 Disponible en <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/encuestas/establecimientos/secundario/emim/tabulados.aspx> [Último acceso el 8 de diciembre de 2016]
31. Farrell, H. 2011. Milk proteins. Casein nomenclature, structure and association. En: Fuquay, J., Fox, P., y McSweeney, P. Eds. *Encyclopedia of dairy sciences*. Segunda edición. Palmerston North: Academic Press: 765-771.
32. FAO/WHO. 2011. Codex Alimentarius: estándares del codex para leches fermentadas 243-2003. En: FAO/ WHO. ed. *Leche y productos lácteos*. Segunda edición. Roma: FAO/WHO, 6-16.
33. Ferrandini, E., Castillo, M., López, M., y Laencina J. 2006. Modelos estructurales de la micela de caseína. *Anales de veterinaria de Murcia*, 22, 5-18.
34. Fox, P., y Kelly, A. 2012. Chemistry and biochemistry of milk constituents. En: B. Simpson, L. Nollet, F. Toldrá, S. Benjakul, J. Paliyath, y Y. Hui. Eds. *Food Biochemistry and food processing*. Segunda edición. Oxford: Willey-Blackwell, 242-264.
35. García, P. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Laboratorios Beterá*, 2, 31-41.
36. Gas, B. 2005. *Electrophoresis. Principles*. Prague. Elsevier Inc.
37. Gordon, S. 2008. Elie Metchnikoff: Father of natural immunity. *European Journal of Immunology*, 38, 3257-3264.
38. Guarner, F., Perdigon, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B., y Morelli, L. 2005. Should yoghurt cultures be considered probiotic? *British Journal of Nutrition*, 93, 783–786.

39. Heck, J., Olieman, C., Schennink, A., van Valenberg, H., Visker, M., Meuldijk, R., y van Hooijdonk, A. 2008. Estimation of variation in concentration, phosphorylation and genetic polymorphism of milk proteins using capillary zone electrophoresis. *International Dairy Journal*, 18, 548-555.
40. Hill, A., y Kethireddipalli, P. 2012. Dairy products: cheese and yogurt. En: N. Eskin y F. Shahidi. Eds. *Biochemistry of Foods*. Tercera edición. San Diego: Academic Press, 319-362.
41. Horne, D. 2014. Casein micelle structure and stability. En: M. Boland, H. Singh y A. Thompson. Eds. *Milk Proteins: From Expression to Food*. Segunda edición. Palmerston North: Academic Press, 169-200.
42. Huppertz, T. 2016. Heat stability of milk. En: McSweeney, P. y O'Mahony J. Eds. *Advanced Dairy Chemistry*. Cuarta edición New York: Springer, 179-196.
43. Kanning, M., Cassalle, M., y Olieman, C. 1993. Milk and soy proteins analysis using capillary zone electrophoresis. *Liquid Chromatography - Gas Chromatography International*, 6, 701-706.
44. Karam, M., Gaiani, C., Barbar, R., Hosri, C., y Scher, J. 2012. Effect of dairy powder rehydration state on gel formation during yogurt process. *Journal of Dairy Research*, 79, 280-286.
45. Karam, M., Gaiani, C., Barbar, R., Hosri, C., Burgain, J., y Scher, J. 2013. Effect of dairy powders fortification on yogurt textural and sensorial properties: a review. *Journal of Dairy Research*, 80, 400-409.
46. Kaminarides, S. y Koukiassa, P. 2001. Detection of bovine milk by electrophoresis of para- $\kappa$ -casein. *Food Chemistry*, 78, 53-55.
47. Kinghorn, N., Norris, C., Paterson, G., y Otter, D. 1995. Comparison of capillary electrophoresis with traditional methods to analyze bovine whey proteins. *Journal of Chromatography A*, 700, 111-123.
48. Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

49. Lan, X., Wang, W., Bu, D., Shen, J., Zheng, y Sun, P. 2010. Effects of heating temperatures and addition of reconstituted milk on the heat indicators in milk. *Journal of Food Science*, 75, 653-658.
50. La vanguardia, 2016. *100 años atrás... La Barcelona modernista compraba el yogur en las farmacias*. [En línea] (fecha de actualización: 09 de junio del 2016).  
Disponible en:  
<http://www.lavanguardia.com/local/20160311/40360044784/yogur-barcelona-generacion-digestion-feliz.html> [Último acceso el 04 de enero de 2017].
51. Li, J., Ding, X., Chen, Y., Song, B., Zhao, S., y Wang, Z. 2012. Determination of bovine lactoferrin in infant formula by capillary electrophoresis with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 1244,178– 183.
52. Lin, S., Sun, J., Cao, D., Cao, J., y Jiang, W. 2010. Distinction of different heat-treated bovine milks by native-PAGE fingerprinting of their whey proteins. *Food Chemistry*, 121, 803-808.
53. López, C. 2005. Focus on the supramolecular structure of milk fat in dairy products. *Reproduction Nutrition Development*, 45, 497–511.
54. Loures-Hattingh, A., y Viljoen, B. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11, 1-17.
55. Mallik, J., Prajapati, J., y Patel, H. 2015. Heat load indicators and their significance in milk processing. Memoria del congreso: *National Seminar on "Indian Dairy Industry - Opportunities and Challenges"*.
56. Manso, M., Catteno, T., Barzaghi, S., Olieman, C., López-Fandiño, R., Leaver, J., Otte, J., Sánchez, A., Svenning, C., Tirelli, A., y Vegarud, C. 2002. Determination of vegetal proteins in milk powder by sodium dodecil sulfate–capillary gel electrophoresis: interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, 85, 1090-1095.
57. Manzo, C., Adalgisa, M., y Pizzano, R. 2015. Thermal markers arising from changes in the protein component of milk. *Food Control*, 51, 251-255.

58. Marina, M., Ríos, A. y Valcárcel, M. 2005. Fundamentals of capillary electrophoresis. En: M. Marina, A. Ríos y M. Várcacel. Eds. *Comprehensive analytical chemistry. Analysis and detection by capillary electrophoresis*. Volumen 40. Elsevier Inc.
59. Martínez, G., González-Garza, M., y Torre, C. 2004. Iniciación en las técnicas culinarias. Segunda edición. Ciudad de México: LIMUSA.
60. Meydani, S., y Ha, W. 2000. Immunologic effects of yogurt. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 861-872.
61. Meza, M., González, A., Becerril, C., Ruíz, F., Díaz, P. y Vallejo, B. 2010. Polimorfismo genético de la  $\beta$ -lactoglobulina en la leche de vacas Holstein y criollo lechero tropical. *Agrociencia*, 445, 531-539.
62. Michaylova, M., Minkova, S., Kimura, K., Sasaki, T., y Isawa, K. 2007. Isolation and characterization of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* from plants in Bulgaria. *Federation of European Microbiological Societies*, 269, 160–169.
63. Miralles, B., Ramos, M. y Amigo, L. 2000. Application of capillary electrophoresis to the characterization of processed cheeses. *Journal of Dairy Research*, 67, 91-100.
64. Miralles, B., Rothbauer, V., Manso, M. A., Amigo, L., Krause, I., y Ramos, M. 2001. Improved method for the simultaneous determination of whey proteins, caseins and para-k-casein in milk and dairy products by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 915, 225-230.
65. Mizrahi, S. 2010. Syneresis in food gels and its implications for food quality. En: *Skibsted, L., Risbo, J., Andersen, M.* Eds. *Food Science, Technology and Nutrition*. Cambridge: Woodhead Publishing, 324-348.
66. Molina, E., Martín-Álvarez, P. J., y Ramos, M. 1999. Analysis of cows', ewes' and goats' milk mixtures by capillary electrophoresis: quantification by multivariate regression analysis. *International Dairy Journal*, 9, 99-105.
67. Moore, J., DeVries, J., Lipp, M., Griffiths, J., y Abernethy, D. 2010. Total protein methods and their potential utility to reduce the risk of food protein

- adulteration. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 330-357.
68. NOM-181-SCFI-2010, Yogurt - Denominación, especificaciones físicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba. [En línea] (Actualizado al 16 de noviembre de 2010).  
Disponible en:  
[http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5167303&fecha=16/11/2010](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5167303&fecha=16/11/2010)  
[Último acceso el 20 de enero de 2017].
69. NOM-185-SSA1-2002, Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias. [En línea] (Actualizado al 16 de octubre del 2003).  
Disponible en:  
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/185ssa12.html> [Último acceso el 20 de enero de 2017].
70. NMX-F-703-COFOCALEC-2012. Sistema Producto Leche – Alimentos – Lácteos - Leche y producto lácteo (-o alimento lácteo) - fermentado o acidificado - Denominaciones, especificaciones y métodos de prueba.
71. NMX-F-736/1-COFOCALEC-2012 - Sistema Producto Leche – Alimentos – Lácteos Identificación de proteínas en leche - Parte 1: Determinación de la composición de las proteínas propias de la leche por electroforesis capilar de zona - Método de prueba.
72. NMX-F-317-NORMEX-2013. Determinación de pH en alimentos y bebidas no alcohólicas - Método Potenciométrico - Método de Prueba. Foods-determination of pH in foods and beverages-potenciometric method-test method. [En línea].  
Disponible en:  
<https://produccionindustrialdealimentos2.jimdo.com/1-1-4-nmx-f-317-normex-2013/>  
[Último acceso el 30 de enero de 2017]

73. Oliveira, M. 2014. Fermented Milks and Yogurt. En: C. Batt y M. Tortorello. Eds. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Segunda edición. London: Academic Press, 908-922.
74. O'Mahony, J., y Fox, P. 2014. Milk: An Overview. En: M. Boland, H. Singh, y A. Thompson. Eds. *Milk Proteins. From expression to food*. Segunda edición. Palmerston North: Academic Press, 19-73.
75. Omar, A., Harbourne, N., y Oruna-Concha, M. 2016. Quantification of major camel milk proteins by capillary electrophoresis. *International Dairy Journal*, 58, 31-35.
76. Ortega, N., Albillos, S., y Busto, M. 2003. Application of factorial design and response surface methodology to the analysis of bovine caseins by capillary zone electrophoresis. *Control Food*, 14, 307-315.
77. Osatinsky, R. 2007. ¿Qué es la electroforesis capilar de zona? *Bioquímica y Patología Clínica*, 71, 60-66.
78. Patel, H., Singh, H., Anema, S., y Creamer, L. 2006. Effects of heat and high hydrostatic pressure treatments on disulfide bonding interchanges among the proteins in skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3409-3420.
79. Patel, H., Anema, S., Holroyd, S., Singh, H., y Creamer, L. 2007. Methods to determine denaturation and aggregation of proteins in low, medium and high-heat skim milk powders. *Lait journal*, 87, 251-268.
80. Pellegrino, L., Catteno, S., y Noni, I. 2011. Effects of processing on protein quality and milk products. En: J. Fuquay, P. Fox y P. McSweeney. Eds. *Encyclopedia of dairy sciences*. Segunda edición. Palmerston North: Academic Press, 1067-1074.
81. Peterson, G. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83, 346-356.
82. Peterson, G. 1979., Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry*, 100, 201-220.
83. Piaia, M., Antoine, J., Mateos-Guardia, J., Leplingard, A., y Lenoir-Wijnkoo, I. 2003. Assessment of the benefits of live yogurt: methods and markers for in

- vivo studies of the physiological effects of yogurt cultures. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 15, 79-87.
84. Piñero, M., Bauza, R., y Arce, L. 2011. Thirty years of capillary electrophoresis in food analysis laboratories: Potential applications. *Electrophoresis*, 32, 1379-1393.
  85. PROFECO. 2006. Estudio de Calidad. Yogur y otros lácteos fermentados. *Revista del consumidor*, 27-36.
  86. Rasmussen, L., Hojrup, P., y Petersen, T. 1992. The multimeric structure and disulfide-bonding pattern of bovine  $\kappa$ -casein. *European Journal of Biochemistry*, 207, 215-215.
  87. Recio, I., Ramos, M., y de Frutos, M. 1995. Quantitative analysis of mayor whey proteins by capillary electrophoresis using uncoated capillaries. *Electrophoresis*, 16, 654-658.
  88. Recio, I., Amigo, L., Ramos, M., y Lopez-Fandiño, R. 1997a. Application of capillary electrophoresis to the study of proteolysis of caseins. *Journal of Dairy Research*, 64, 221-230.
  89. Recio, I., Pérez –Rodríguez, M., Ramos, M., y Amigo, L. 1997b. Capillary electrophoretic analysis of genetic variants of milk proteins from different species. *Journal of Chromatography A*, 768, 47-86.
  90. Recio, I., García-Risco, M., López-Fandiño, R., Olano, A. y Ramos, M. 2000. Detection of rennet whey solids in UHT milk by capillary electrophoresis. *International Dairy Journal*, 10, 333-338.
  91. Recio, I., Ramos, M. y López-Fandiño, R. 2001. Capillary electrophoresis for the analysis of food proteins of animal origin. *Electrophoresis*, 22, 1489-1502.
  92. Reynolds, J., y Tanford, C. 1970. Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Science*, 66 (3), 1002-1007.
  93. Riel, J., y Olieman, C. 1995. Determination of caseinomacropetide with capillary zone electrophoresis and its application to the detection and



- estimation of rennet whey solids in milk and buttermilk powder. *Electrophoresis* 16, 529-533.
94. Rizkalla, S., Luo, J., Kabir, M., Chevalier, A., Pacher, N., y Slama, G. 2000. Chronic consumption of fresh but not heated yogurt improves breath-hydrogen status and short-chain fatty acid profiles: a controlled study in healthy men with or without lactose maldigestion. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 1474-1479.
  95. Rivera, D., López, O., Aburto, S., Pedraza, Z., y Sánchez, P. 2014. *Consumo de productos lácteos en población mexicana*. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. México: Instituto Nacional de Salud Pública.
  96. Roca, M., Oliver, J., y Rodríguez, A. 2003. *Bioquímica técnicas y métodos*. Mallorca: Editorial Hélice.
  97. Santarén, J. F. 2004. De la tesis doctoral de Tiselius a la proteómica: setenta y cinco años de electroforesis de proteínas. *Arbor*, 698, 259-284.
  98. Sarkar, S. 2008. Effect of probiotics on biotechnological characteristics of yogurt a review. *British Food Journal*, 110, 717-740.
  99. Scholl, P., Farris, S., y Mossoba, M. 2014. Rapid turbidometric detection of milk powder adulteration with plants proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1498-1505.
  100. Sefora, R., Tagliazucchi, D. y Solieri, L. 2016. Survival and bioactivities of selected probiotic lactobacilli in yogurt fermentation and cold storage: New insights for developing a bifunctional dairy food. *Food Microbiology*, 60, 54-61.
  101. Shallan, A., Guijt, R. y Breamore, M. 2013. Capillary Electrophoresis: Basic Principles. En: M. Houk. Ed. *Encyclopedia of Forensics Science*. Segunda edición. Washington, DC: Academic Press, 549-559.
  102. Shapiro, A., Viñuela, E., y Maizel, J. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and biophysical research communications*, 28, 815-820.
  103. Shiby, V., y Mishra, H. 2013. Fermented milks and milk products as functional foods. A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 482-496.

104. Sloan, A. 2015. *The top ten food trends*. [En línea] (Actualizado en abril de 2015). Disponible en:  
<http://www.ift.org/food-technology/past-issues/2015/april/features/the-top-ten-food-trends.aspx?page=viewall> [Último acceso el 10 de enero de 2017]
105. Stoilova, E. 2015. The bulgarianization of yoghurt: connecting home, taste and authenticity. *Food and Foodways*, 23, 14-35.
106. Strickland, M., Johnson, M., y Broadbent, J. 2001. Qualitative and quantitative analysis of proteins and peptides in milk products by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 22, 1510-1517.
107. Tamime, A., y Law, B. 2001. *Mechanization and automation in dairy technology*. Florida: Sheffield Academic Press.
108. Tamime, A. y Robinson, R. 2007. *Yoghurt Science and Technology*. Tercera edición. Florida: Woodhead Publishing Limited.
109. Veloso, A., Teixeira, N., y Ferreira, I. 2002. Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. Detection of milk adulterations. *Journal of Chromatography A*, 967, 209-218.
110. Verbeken, D., Bahel, K., Thas, O., y Dewettinck, K. 2006. Interactions between k-carrageenan, milk proteins and modified starch in sterilized dairy desserts. *International Dairy Journal*, 16, 482-488.
111. Vesterberg, O. 1989. History of electrophoretic methods. *Journal of Chromatography*, 480, 3-19.
112. Voet, D., y Voet, J. 2007. *Bioquímica*. Tercera edición. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana.
113. Wada, Y., y Lonnerdal, B. 2014. Effect of different industrial heating processes of milk on site-specific protein modifications and their relationship to in vitro and in vivo digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 175-4185.
114. Wada, Y., y Lonnerdal, B. 2015. Effects of industrial heating processes of milk-based enteral formulas on site-specific protein modifications and their

- relationship to in vitro and in vivo protein digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 6787-67984.
115. Weber, K., y Osborn, M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, 244, 4406-4412.
  116. Weerathilake, W., Rasika, D., Ruwanmali, J., y Munasinghe, M. 2014. The evolution, processing, varieties and health benefits of yogur. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4, 1-10.
  117. Westermeier, R. 2005. *Electrophoresis in Practice*. Cuarta edición. New York: WILEY-VCH.
  118. Wilson, J., y Buffa, A. 2003. *Física*. Quinta edición. Ciudad de México: Pearson Education.

## 12. Apéndices

### Apéndice A. Prueba LSD para determinar si existe diferencia significativa en el grado de sinéresis de las muestras de yogur

Tabla A. Comparación de medias de la prueba de sinéresis entre las muestras de yogur analizadas

Muestra	Media de las muestras
YNA	56.89
YNB	55.26
YNS	37.19
YNU	35.22
YNSD	72.13
YNC	67.43
YNLP	51.53

$$\text{LSD} = S \left( \sqrt{\frac{2}{n}} \right) t$$

Donde:

$$S^2 = 0.066; n = 3; t (6 \text{ gl } \rho=0.05 \%) = 2.447$$

$\text{LSD} = S \left( \sqrt{\frac{2}{n}} \right) t = 0.51$ ; por tanto, como la diferencia entre la media de las determinaciones es mayor a 0.51, existe diferencia significativa entre todas las muestras.

## Apéndice B. Determinación de proteína soluble por el método modificado de Lowry

1. Elaboración de los reactivos de Lowry (Peterson, 1977)

### Reactivo A (150 mL)

a) 50 mL de solución CTC (cobre-tartrato- carbonato)

**Tabla B. composición del reactivo cobre-tartrato- carbonato**

Reactivo	Concentración en la solución CTC
sulfato de cobre	0.1 %
tartrato de sodio	0.2 %
carbonato de sodio	10.0 %

b) 50 mL de solución NaOH aproximadamente 0.8 N.

c) Se mezclaron las disoluciones anteriores con 50 mL de agua.

Una vez preparada la solución A puede almacenarse hasta por un mes y conservarse a temperatura ambiente.

### Reactivo B.

Diluir el reactivo de Folin Fenol-Ciocalteu 2 N mezclando un volumen de éste con once de agua. Una vez preparada la solución B puede almacenarse en un frasco ámbar hasta por un mes y conservarse a temperatura ambiente.

2. Elaboración de la curva de calibración con BSA.

a) Se preparó una solución de BSA 2 mg/mL e hicieron las diluciones correspondientes para tener concentraciones entre 0.20 mg/ mL a 2.0 mg/ mL.

b) Para llevar a cabo la reacción, se tomaron 50  $\mu$ L de cada dilución de BSA y adicionaron 800  $\mu$ L del reactivo A, se homogeneizó y añadieron 500  $\mu$ L del reactivo B, se mezcló de nuevo y dejaron pasar 15 minutos. Transcurrido este tiempo se leyó a 750 nm en el espectrofotómetro.

Tras realizar lo anterior se obtuvo la siguiente curva.

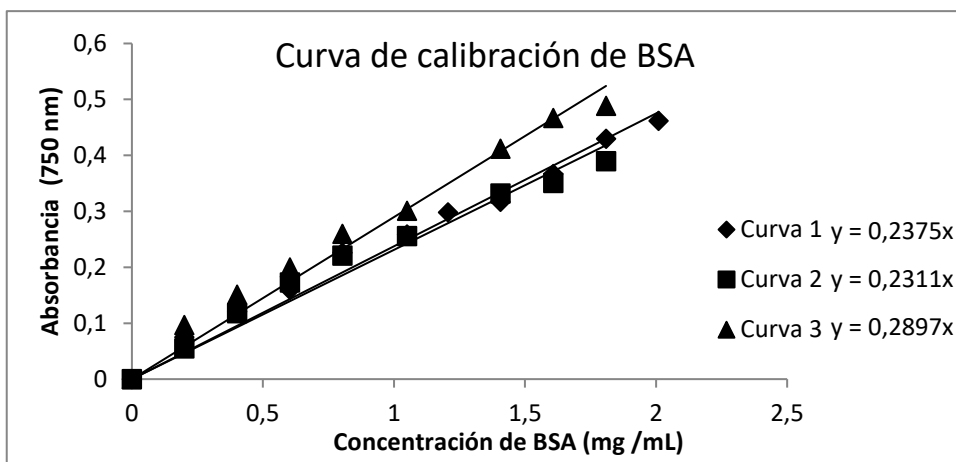


Figura 23. Curvas de calibración utilizadas para la determinación de proteína soluble.

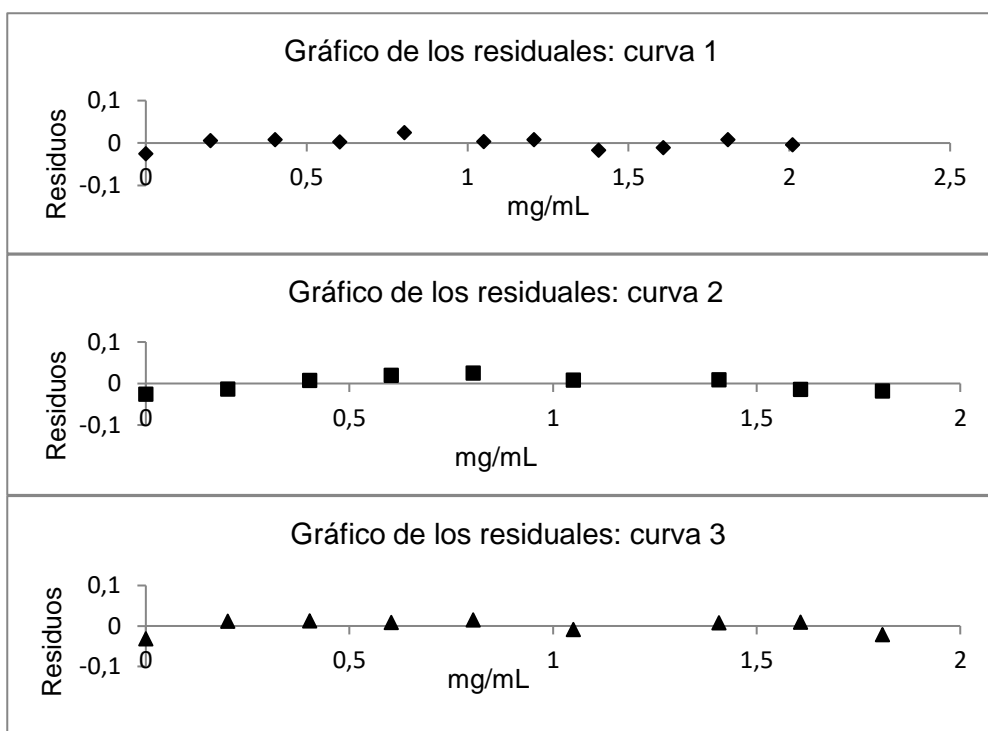


Figura 24. Gráficos de los residuos de las curvas de calibración empleadas en la determinación de proteína soluble.

No se encontraron datos anormales en las curvas de calibración realizadas.

## Apéndice C. Formulación de los geles concentrador y gel separador y preparación de las disoluciones amortiguadoras empleadas SDS-PAGE

**Tabla C1. Composición del gel concentrador (1.0 mm de espesor)  
(4 % T, 2.6 %C)**

Reactivo	mL
Agua des-ionizada	6.08
Buffer 4X 0.5 M (pH 6.8)	2.50
Acrilamida (30 %)	1.36
APS	0.05
TEMED	0.01
Volumen final	10.0

**Tabla C2. Composición del gel de separación (1.0 mm de espesor)  
(12.5 % T, 2.6 %C)**

Reactivo	mL
Agua des-ionizada	3.18
Buffer 4X 1.5 M (pH 8.8)	2.60
Acrilamida (30 %)	4.16
APS	0.05
TEMED	0.01
Volumen final	10.0

### Preparación de las disoluciones amortiguadoras usadas en SDS-PAGE

Disolución amortiguadora 2X (*Bio Rad*).

Para preparar 10 mL de la disolución se midieron los siguientes volúmenes de los reactivos: 2 mL de glicerol, 4 mL de SDS al 10 % (m/v), 0.5 mL de agua, 2.5 mL de disolución amortiguadora 4X (c) y 1 mL de azul de bromofenol al 0.5 % (m/v). La

disolución se homogeneizó y conservó en un recipiente de plástico a temperatura ambiente.

Disolución amortiguadora 4X (c) (*Bio Rad*).

Se prepararon 50 mL de la disolución, para ello se pesaron 3.0 g de tris-base (0.5 M) y disolvieron en aproximadamente 30 mL de agua en un vaso de precipitados de 100 mL. El pH se ajustó a 6.8 con HCl (1:1) y se aforó a 50 mL. La disolución se almacenó en un frasco de vidrio en refrigeración.

Disolución amortiguadora 4X (s) (*Bio Rad*).

Para preparar 100 mL de la disolución se pesaron 18.16 g de tris-base (1.5 M) y disolvieron en un vaso de precipitados de 250 mL con aproximadamente 50 mL de agua. Posteriormente, bajo agitación constante se adicionó poco a poco HCl (1:1), hasta alcanzar un valor de pH de 8.8. Por último, se aforó a 100 mL y almacenó en refrigeración.



## Apéndice D. Electroforegramas de las muestras de leche pasteurizada y de yogur comercial.

### Leche Pasteurizada. Réplica 1

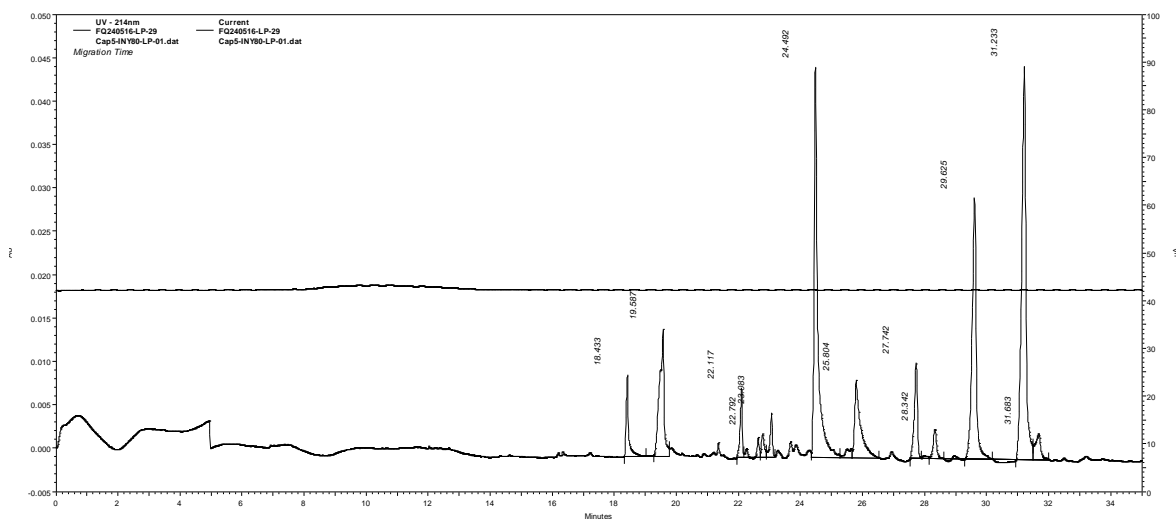


Figura 25. Perfil electroforético de leche pasteurizada réplica 1.

Tabla D1. Parámetros de integración leche pasteurizada, réplica 1

proteína	tm (min)	t <sub>mr</sub>	área	área normalizada	área (%)	Cr	
proteínas del suero	α-LA	18.43	0.83	50385	2733.41	3.18	4.55
	β-LG	19.58	0.80	151138	7716.24	9.55	12.85
caseínas	α <sub>s2</sub> -CN	22.12	0.90	38060	1720.84	2.40	2.86
	α <sub>s1</sub> -CN	24.49	1.00	363100	14825.24	22.95	24.69
	α <sub>s0</sub> -CN	25.80	1.05	116754	4524.64	7.38	7.53
	κ-CN	27.74	1.13	78461	2828.23	4.96	4.71
	β-CN B	28.34	1.15	26819	946.26	1.69	1.57
	β-CN A <sup>1</sup>	29.62	1.21	281341	9496.74	17.78	15.81
	β-CN A <sup>2</sup>	31.23	1.21	475999	15240.25	30.08	25.38
Suma			1582057	60031.90	100	100	
peso de la muestra (g)				0.5023			

## Réplica 2

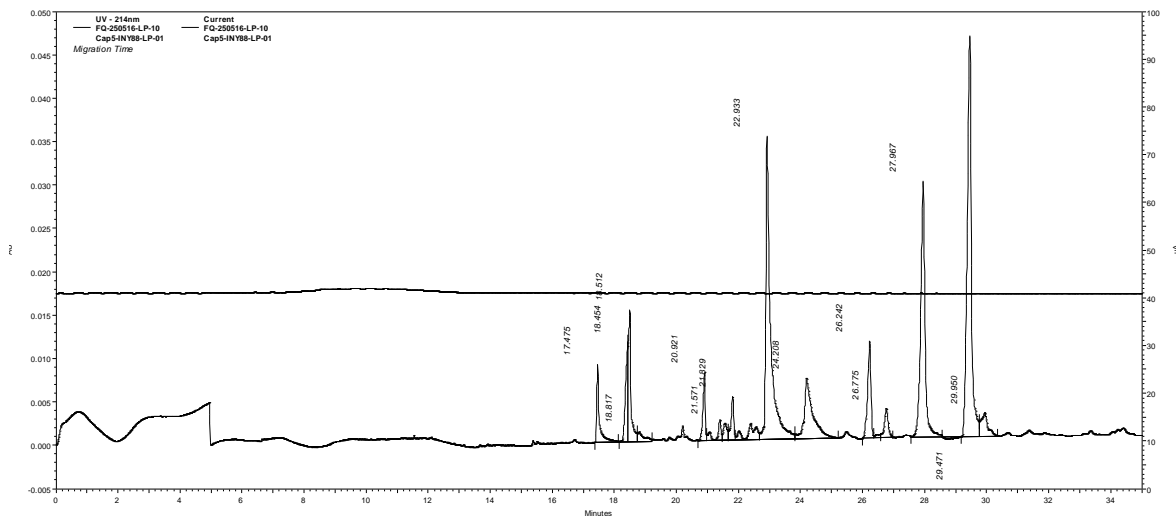


Figura 26. Perfil electroforético de leche pasteurizada réplica 2.

Tabla D2. Parámetros de integración leche pasteurizada, réplica 2

proteína	tm (min)	t <sub>mr</sub>	área	área normalizada	área (%)	Cr	
proteínas del suero	α-LA	18.40	0.80	142996	7748.78	8.92	12.000
	β-LG	20.92	0.91	39455	1885.904	2.46	2.92
caseínas	α <sub>S2</sub> -CN	22.93	1.00	373570	16289.63	23.30	25.22
	α <sub>S1</sub> -CN	24.21	1.06	119278	4927.21	7.44	7.63
	α <sub>S0</sub> -CN	26.24	1.14	82459	3142.25	5.14	4.86
	κ-CN	26.77	1.17	28285	1056.39	1.76	1.63
	β-CN B	27.70	1.20	285579	10310.82	17.81	15.96
	β-CN A <sup>1</sup>	29.47	1.28	480884	16317.19	29.99	25.26
suma			1603107	64573.81	100	100	
peso de la muestra (g)				0.4996			

## Yogur natural A. Réplica 1

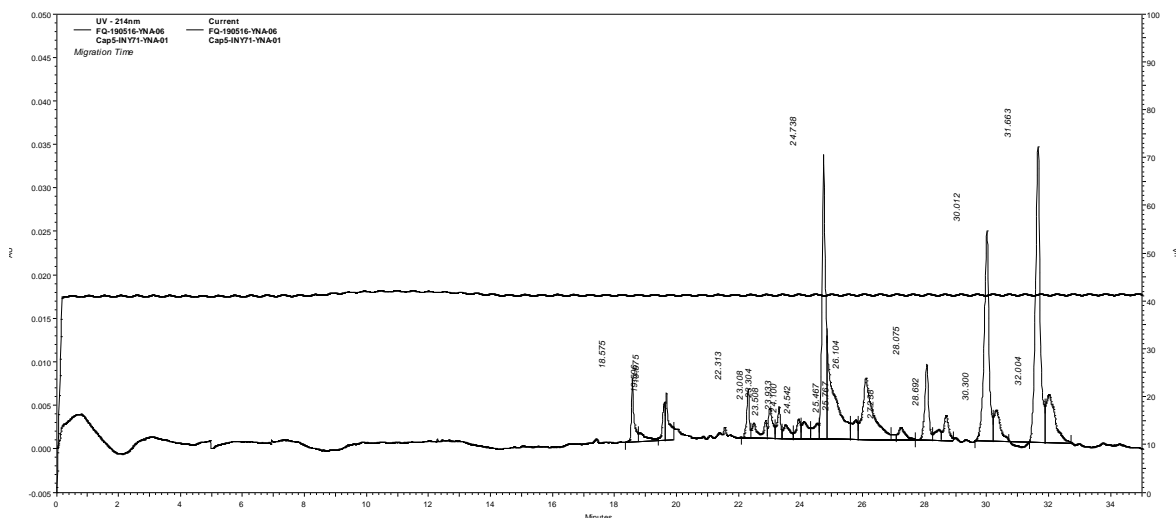


Figura 27. Perfil electroforético de la muestra YNA réplica 1.

Tabla D3. Parámetros de integración yogur natural A, réplica 1

proteína	tm (min)	tmr	área	área normalizada	área (%)	Cr	
proteínas del suero	$\alpha$ -LA	18.58	0.75	43186	2324.95	2.61	3.81
	$\beta$ -LG	19.60	0.79	68227	3481.68	4.12	5.71
Caseínas	$\alpha_{S2}$ -CN	22.31	0.90	33622	1506.83	2.03	2.47
	$\alpha_{S1}$ -CN	24.74	1.00	438548	17727.71	26.47	29.05
	$\alpha_{S0}$ -CN	26.10	1.06	167930	6433.11	10.14	10.54
	$\kappa$ -CN	28.08	1.13	76672	2730.97	4.63	4.48
	$\beta$ -CN B	28.69	1.16	32326	1126.66	1.95	1.85
	$\beta$ -CN A <sup>1</sup>	30.01	1.21	315235	10503.63	19.03	17.21
	$\beta$ -CN A <sup>2</sup>	31.66	1.28	480992	15190.98	29.03	24.89
Suma				1656738	61026.53	100	100
peso de la muestra (g)				0.4930			

## Yogur natural A. Réplica 2

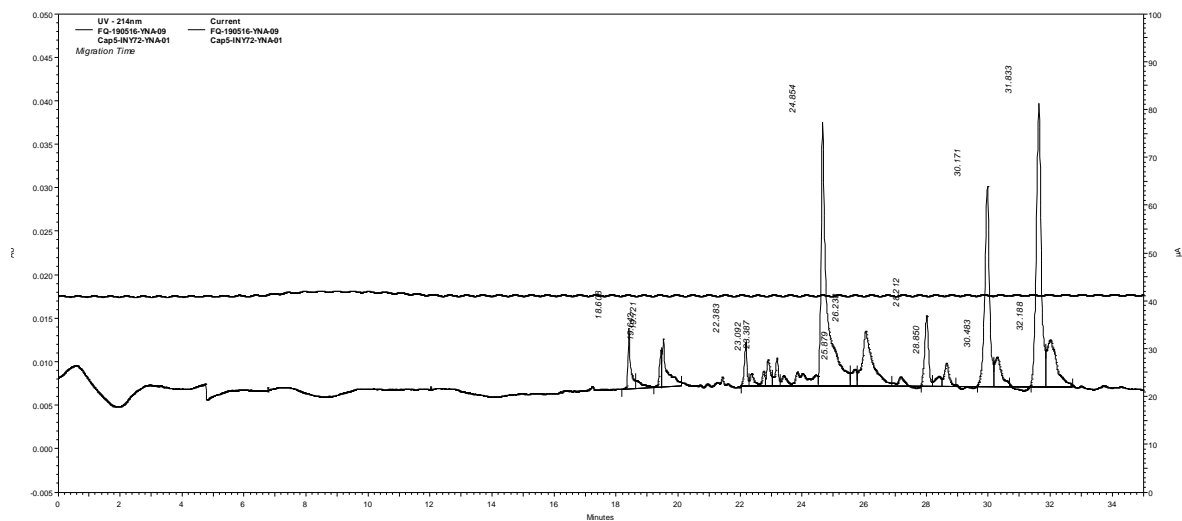


Figura 28. Perfil electroforético de la muestra YNA réplica 2.

Tabla D4. Parámetros de integración yogur natural A, réplica 2

Proteína		tm (min)	t <sub>mr</sub>	área	área normalizada	área (%)	Cr
proteínas del suero	α-LA	18.61	0.75	41904	2251.93	2.70	3.96
	β-LG	19.64	0.79	66762	3398.94	4.30	5.98
	α <sub>s2</sub> -CN	22.38	0.90	29372	1312.25	1.89	2.31
	α <sub>s1</sub> -CN	24.85	1.00	399100	16057.78	25.68	28.25
	α <sub>s0</sub> -CN	26.24	1.06	145292	5537.46	9.35	9.74
Caseínas	κ-CN	28.21	1.14	71272	2526.30	4.59	4.44
	β-CN B	28.85	1.16	28568	990.23	1.84	1.74
	β-CN A <sup>1</sup>	30.17	1.21	296002	9810.81	19.04	17.26
	β-CN A <sup>2</sup>	31.83	1.28	476030	14953.98	30.63	26.31
Suma				1554302	56839.68	100	100
peso de la muestra (g)				0.4946			

## Yogur natural B. Réplica 1

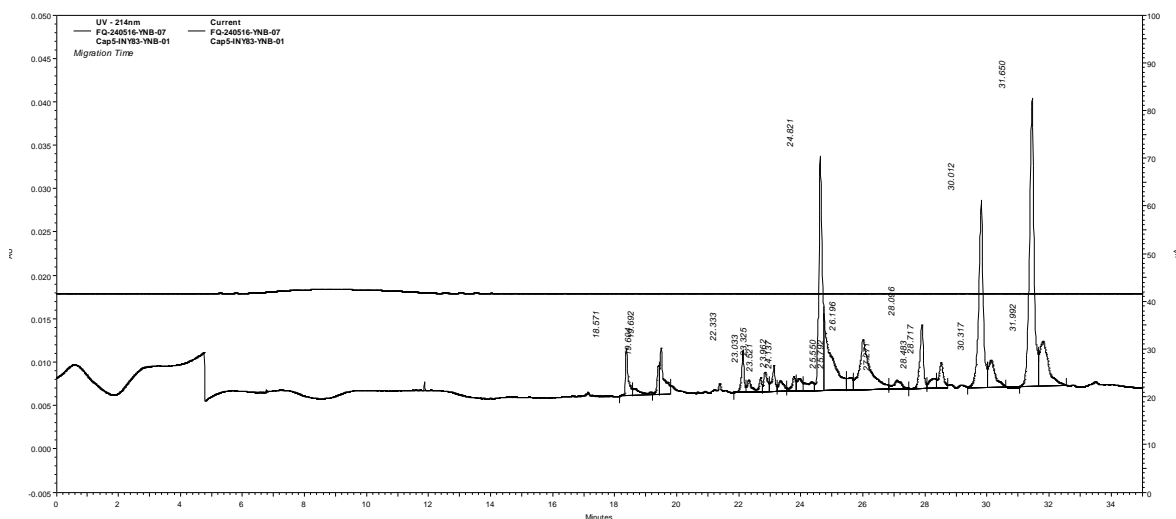


Figura 29. Perfil electroforético de la muestra YNB réplica 1.

Tabla D5. Parámetros de integración yogur natural B, réplica 1

Proteína		tm (min)	t <sub>mr</sub>	área	área normalizada	área (%)	Cr
proteínas del suero	α-LA	18.57	0.74	32765	1764.31	2.32	3.42
	β-LG	19.60	0.79	63958	3262.49	4.54	6.33
caseínas	α <sub>s2</sub> -CN	22.33	0.90	27107	1213.76	1.92	2.35
	α <sub>s1</sub> -CN	24.82	1.00	345062	13902.02	24.51	26.99
	α <sub>s0</sub> -CN	26.19	1.05	137502	5248.97	9.77	10.19
	κ-CN	28.09	1.13	62017	2207.32	4.40	4.28
	β-CN B	28.71	1.15	29452	1025.59	2.09	1.99
	β-CN A <sup>1</sup>	30.01	1.20	265664	8851.92	18.87	17.18
	β-CN A <sup>2</sup>	31.6	1.27	443869	14024.29	31.53	27.23
Suma				1407396	51500.70	100	100
peso de la muestra (g)				0.4578			

## Yogur natural B. Réplica 2

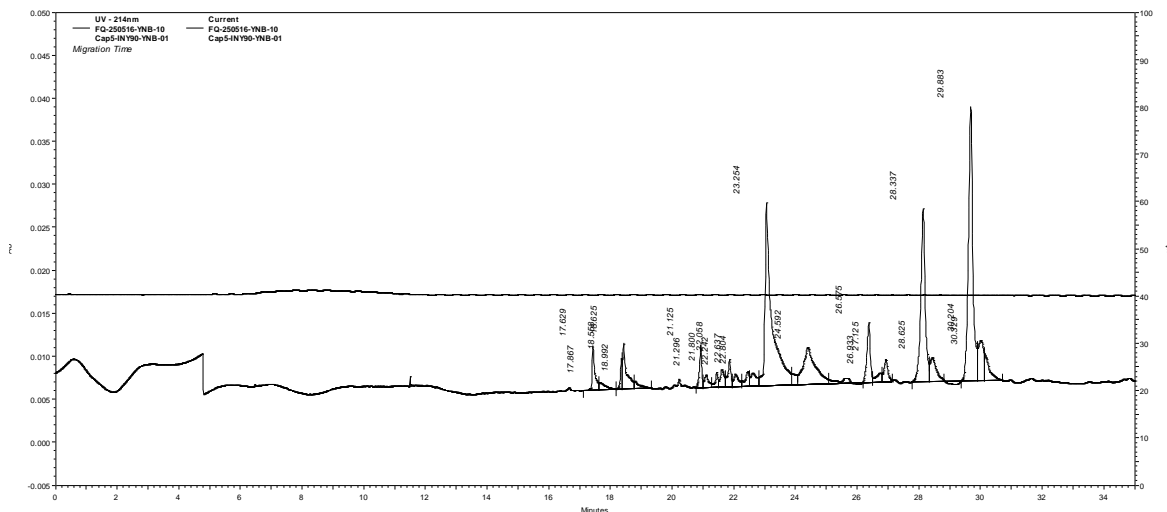
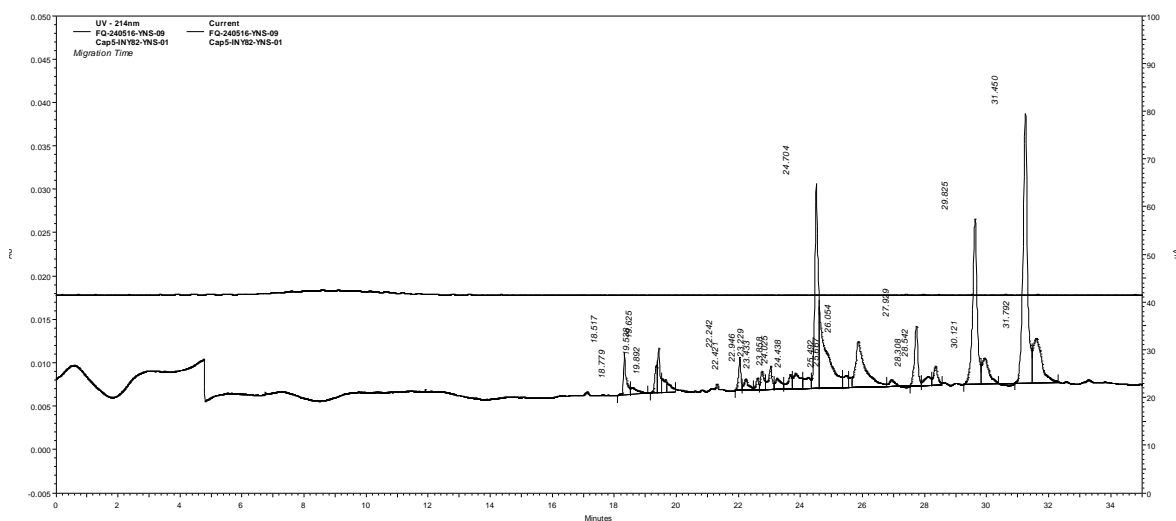


Figura 30. Perfil electroforético de la muestra YNB réplica 2.

Tabla D6. Parámetros de integración yogur natural B, réplica 2

Proteína	tm	tmr	área	área normalizada	área (%)	Cr	
proteínas del suero	$\alpha$ -LA	17.62	0.75	31590	1791.93	2.45	3.57
	$\beta$ -LG	18.55	0.79	59946	3230.19	4.65	6.44
Caseínas	$\alpha_{52}$ -CN	21.12	0.90	25364	1200.66	1.97	2.39
	$\alpha_{51}$ -CN	23.25	1.00	327668	14090.82	25.46	28.12
	$\alpha_{50}$ -CN	24.59	1.05	119129	4844.21	9.25	9.67
	$\kappa$ -CN	26.57	1.14	53660	2019.19	4.17	4.03
	$\beta$ -CN B	27.12	1.16	23645	871.70	1.83	1.74
	$\beta$ -CN A <sup>1</sup>	28.33	1.21	238708	8423.89	18.55	16.81
	$\beta$ -CN A <sup>2</sup>	29.88	1.28	407135	13624.30	31.63	27.19
Suma			1286845	50096.92	100	100	
peso de la muestra (g)				0.4533			

## Yogur natural S. Réplica 1



**Figura 31. Perfil electroforético de la muestra YNS réplica 1.**

**Tabla D7. Parámetros de integración yogur natural S, réplica 1**

Proteína		tm	t <sub>mr</sub>	área	área normalizada	área (%)	Cr
proteínas del suero	α-LA	18.51	0.75	28637	1546.52	2.27	3.34
	β-LG	19.53	0.79	54161	2772.08	4.29	5.99
Caseínas	α <sub>s2</sub> -CN	22.24	0.90	20777	934.13	1.64	2.02
	α <sub>s1</sub> -CN	24.70	1.00	317607	12856.50	25.19	27.81
	α <sub>s0</sub> -CN	26.05	1.05	111367	4274.46	8.83	9.24
	κ-CN	27.92	1.13	54325	1945.11	4.30	4.20
	β-CN B	28.54	1.15	20419	715.40	1.62	1.54
	β-CN A <sup>1</sup>	29.82	1.20	236701	7936.32	18.77	17.16
	β-CN A <sup>2</sup>	31.45	1.27	416688	13249.22	33.05	28.65
Suma				1260682	46229.77	100	100
peso de la muestra (g)				0.4303			

## Yogur natural S. Réplica 2

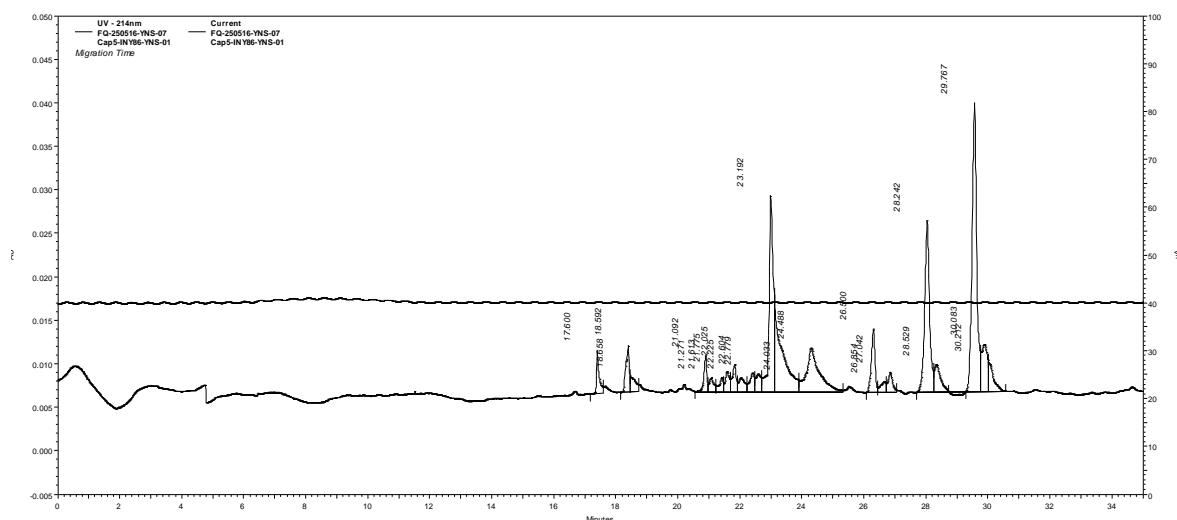


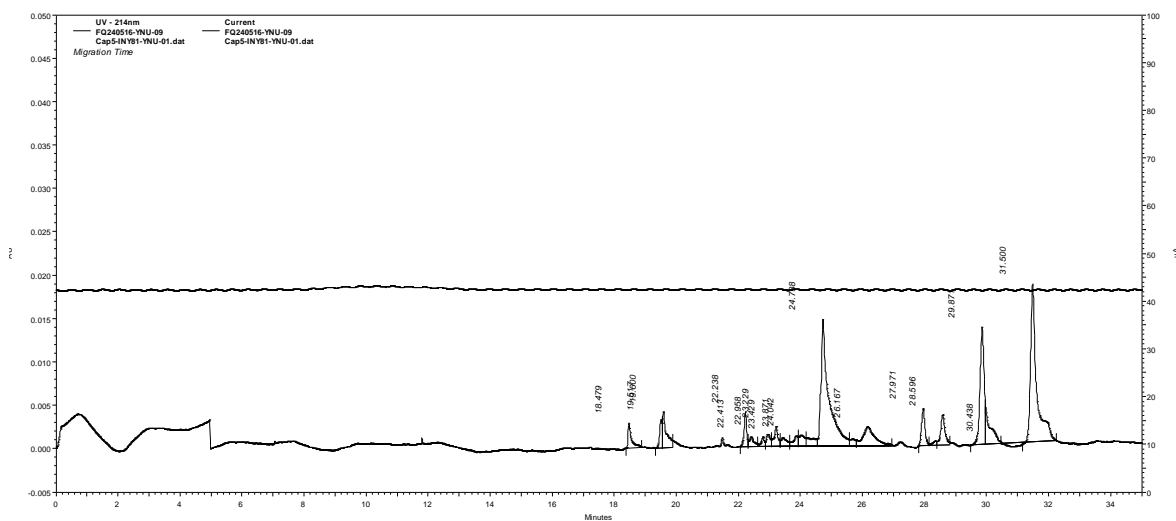
Figura 32. Perfil electroforético de la muestra YNS réplica 2.

Tabla D8. Parámetros de integración yogur natural S, réplica 2

Proteína		tm (min)	t <sub>mr</sub>	área	área normalizada	área (%)	Cr
proteínas del suero	α-LA	17.60	0.75	28819	1637.44	2.11	3.10
	β-LG	18.55	0.80	54011	2911.01	3.96	5.51
caseínas	α <sub>S2</sub> -CN	21.09	0.91	20520	972.88	1.50	1.84
	α <sub>S1</sub> -CN	23.19	1.00	348064	15007.93	25.56	28.44
	α <sub>S0</sub> -CN	24.48	1.05	119293	4871.48	8.76	9.23
	κ-CN	26.50	1.14	59772	2255.54	4.39	4.27
	β-CN B	27.04	1.16	23344	863.25	1.71	1.63
	β-CN A <sup>1</sup>	28.24	1.22	256531	9083.31	18.84	17.21
	β-CN A <sup>2</sup>	29.767	1.284	451117	15154.93	33.13	28.72
Suma				1361471	52757.81	100	100
peso de la muestra (g)				0.4390			



## Yogur natural U. Réplica 1



**Figura 33. Perfil electroforético de la muestra YNU réplica 1.**

**Tabla D9. Parámetros de integración yogur natural U, réplica 1**

	proteína	tm (min)	tmr	área	área normalizada	área (%)	Cr
proteínas del suero	α-LA	18.47	0.74	21817	1180.63	2.46	3.59
	β-LG	19.51	0.78	54657	2800.48	6.17	8.52
caseínas	α <sub>S2</sub> -CN	22.23	0.89	23276	1046.67	2.62	3.18
	α <sub>S1</sub> -CN	24.73	1.00	248676	10052.38	28.08	30.59
	α <sub>S0</sub> -CN	26.16	1.05	30470	1164.44	3.44	3.54
	κ-CN	27.97	1.13	31724	1134.17	3.58	3.45
	β-CN B	28.59	1.15	34974	1223.03	3.94	3.72
	β-CN A <sup>1</sup>	29.87	1.20	168799	5650.93	19.06	17.19
	β-CN A <sup>2</sup>	31.50	1.27	271119	8606.95	30.61	26.19
Suma				885512	32859.72	100	100
peso de la muestra(g)				0.4322			

## Yogur natural U. Réplica 2

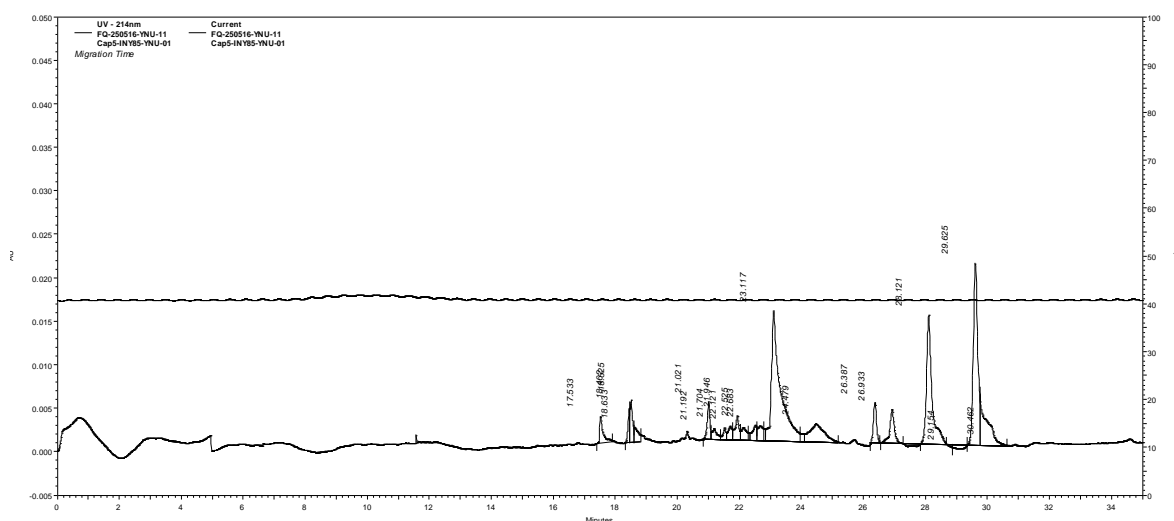


Figura 34. Perfil electroforético de la muestra YNU réplica 2.

Tabla D10. Parámetros de integración yogur natural U, réplica 2

Proteína		tm (min)	t <sub>mr</sub>	área	área normalizada	área (%)	Cr
proteínas del suero	α-LA	17.53	0.75	21102	1203.55	2.27	3.30
	β-LG	18.46	0.79	56054	3036.18	6.03	8.30
caseínas	α <sub>s2</sub> -CN	21.02	0.90	25745	1224.72	2.78	3.35
	α <sub>s1</sub> -CN	23.11	1.00	254597	11013.41	27.41	30.13
	α <sub>s0</sub> -CN	24.47	1.05	28961	1183.09	3.12	3.23
	κ-CN	26.38	1.14	33506	1269.79	3.60	3.47
	β-CN B	26.99	1.16	35268	1306.56	3.80	3.57
	β-CN A <sup>1</sup>	28.12	1.21	180747	6427.47	19.47	17.58
	β-CN A <sup>2</sup>	29.62	1.28	292691	9879.86	31.51	27.03
Suma				928671	36544.66	100	100
peso de la muestra (g)				0.4394			