



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DETECCIÓN DE SUERO DE QUESERÍA
EN LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA
STHEFANY CHÁVEZ CRUZ

Director de tesis:
Sandra Pérez Munguía



Ciudad Universitaria, CDMX

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Sandra Pérez Munguía**
VOCAL: **Profesor: Juan Carlos Ramírez Orejel**
SECRETARIO: **Profesor: Elizabeth Reyes López**
1er SUPLENTE: **Profesor: Gustavo Adolfo Zelada Guillén**
2º SUPLENTE: **Profesor: Amelia Farrés González Sarabia**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio 300 del Departamento de Alimentos y Biotecnología del Conjunto 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 Sarabia

SUSTENTANTE:

Sthefany Chávez Cruz

Índice

Índice	i
Índice de Figuras y Tablas	iv
Lista de abreviaturas, acrónimos y símbolos	vi
Resumen	1
Planteamiento del problema	2
Hipótesis	3
Objetivo general	3
Objetivos particulares	3
1.0 Marco teórico	4
1.1 Fraude en alimentos	4
1.2 Leche	5
1.3 Suero de quesería	8
1.4 Glicomacropéptido	8
1.4.1 Estructura, composición química e isoformas	9
1.4.2 Punto isoeléctrico	10
1.4.3 Peso molecular	10
1.4.4 Propiedades funcionales	11
1.4.5 Propiedades biológicas	13
1.4.6 Técnicas de purificación del glicomacropéptido	14
1.4.7 Técnicas de identificación del glicomacropéptido	15
1.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida	17
2.0 Metodología	19
2.1 Esquema de bloques de la estrategia experimental	19
2.2 Materiales	20
2.3 Preparación de las disoluciones amortiguadoras	20
2.4 Preparación de mezclas de leche pasteurizada con suero dulce de quesería	20
2.4.1 Análisis fisicoquímico por ultrasonido de las mezclas compuestas	20
2.4.2 Cuantificación de proteína soluble de las mezclas compuestas	21

2.4.3	Precipitación isoelectrica de las caseínas de las mezclas compuestas	21
2.5	Aislamiento de glicomacropéptido del suero dulce de quesería por precipitación secuencial con ácido tricloroacético	21
2.6	Aislamiento del glicomacropéptido del suero dulce de quesería por tratamiento térmico	22
2.6.1	Efecto del pH durante el tratamiento térmico	22
2.6.2	Efecto del tiempo y el cloruro de calcio durante el tratamiento térmico	22
2.6.3	Pruebas químicas para identificar el glicomacropéptido	22
2.7	Optimización de la metodología	23
2.7.1	Optimización del aislamiento del glicomacropéptido por precipitación secuencial con ácido tricloroacético	23
2.7.2	Combinación del tratamiento térmico con ultrafiltración	23
2.8	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio	23
2.9	Análisis estadístico	24
3.0	Resultados y discusión	24
3.1	Análisis fisicoquímico de las mezclas compuestas por ultrasonido	24
3.2	Cuantificación de proteína soluble de las mezclas compuestas	27
3.3	Perfil electroforético de las mezclas compuestas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio	28
3.4	Precipitación isoelectrica de las caseínas	30
3.5	Aislamiento del glicomacropéptido del suero dulce de quesería por precipitación secuencial con ácido tricloroacético	30
3.6	Aislamiento del glicomacropéptido del suero dulce de quesería por tratamiento térmico	32
3.6.1	Efecto del pH	32
3.6.2	Efecto del tiempo y el cloruro de calcio	33
3.6.3	Pruebas químicas	35
3.7	Optimización de la metodología	36
3.8	Selección de muestras comerciales	42

3.8.1	Análisis fisicoquímico de muestras de leche y lácteos por ultrasonido	43
3.8.2	Detección de la adulteración de muestras lácteas con suero dulce de quesería por densitometría	45
4.0	Conclusiones	51
5.0	Referencias	52
6.0	Anexos	63
	Anexo A. Preparación de las disoluciones	63
	Anexo B. Análisis fisicoquímico de la leche pasteurizada y de las mezclas de leche entera pasteurizada con agua	67
	Anexo C. Curvas de calibración	68
	Anexo D. Fundamento del método rápido para determinar la composición de leche por ultrasonido	69

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1.1	Micela de caseína	6
Figura 1.2	Representación esquemática de κ -CN destacando la porción del glicomacropéptido y los posibles sitios de unión de los tetrasacáridos	7
Figura 1.3	Secuencia primaria del glicomacropéptido	10
Figura 1.4	Modelo tridimensional del GMP a pH 7.0 ($\mu=0$)	11
Figura 1.5	Diagrama esquemático de la adsorción del aGMP y gGMP en una interfase hidrofóbica/hidrofílica a pH 7.0	12
Figura 1.6	Modelo de autoagregación del glicomacropéptido	13
Figura 3.1	Análisis fisicoquímico de la leche pasteurizada y de las mezclas de leche entera pasteurizada con suero dulce de quesería: 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30 (v/v) (LP:SDQ), determinados por ultrasonido (<i>LactiCheck™</i>)	25
Figura 3.2	Perfiles electroforéticos de mezcla de leche pasteurizada y suero dulce de quesería	29
Figura 3.3	Aislamiento del glicomacropéptido del suero de quesería	31
Figura 3.4	Perfiles proteínicos del fraccionamiento de la LP y mezcla de leche adicionada de suero dulce de quesería 80:20	32
Figura 3.5	Efecto del pH en el tratamiento térmico aplicado al suero dulce de quesería	33
Figura 3.6	Efecto del tiempo en el tratamiento térmico aplicado al suero dulce de quesería	34
Figura 3.7	Caracterización química del SDQ _D , SA _D y los sobrenadantes a diferentes tiempos de análisis	36
Figura 3.8	Análisis fisicoquímico de la leche entera pasteurizada y de las mezclas de leche entera pasteurizada con suero dulce de quesería: 95:5, 90:10, 85:15 (v/v) (LP:SDQ), determinados por ultrasonido (<i>LactiCheck™</i>)	37
Figura 3.9	Perfiles electroforéticos de mezcla de leche pasteurizada y suero dulce de quesería	39
Figura 3.10	Detección del glicomacropéptido de mezclas de leche adicionada de suero dulce de quesería por precipitación secuencial con TCA	40
Figura 3.11	Perfil proteínico de la fracción concentrada por ultrafiltración obtenidas de la fracción soluble después del tratamiento térmico	41
Figura 3.12	Análisis fisicoquímico de las muestras lácteas comerciales, determinados por ultrasonido (<i>LactiCheck™</i>)	44
Figura 3.13	Perfiles electroforéticos de las muestras comerciales	46

Figura 3.14	Detección del GMP por precipitación isoelectrica de las caseínas seguido de la precipitación secuencial con TCA en muestras de leche y lácteos comerciales	49
Figura B1	Análisis fisicoquímico de la leche pasteurizada y de las mezclas de leche entera pasteurizada con agua: 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 (v/v) (LP:agua), determinados por ultrasonido (<i>LactiCheck™</i>)	67
Figura C1	Curva de calibración Lowry	68
Figura C2	Curva de calibración fenol sulfúrico	68
Tabla 1.1	Composición química promedio del suero dulce y del suero ácido	8
Tabla 1.2	Propiedades biológicas del glicomacropéptido	14
Tabla 1.3	Técnicas de identificación del glicomacropéptido	16
Tabla 3.1	Concentración promedio de proteína en leche pasteurizada y en las mezclas de leche y suero dulce de quesería determinada por espectrofotometría y ultrasonido	28
Tabla 3.2	Especificaciones fisicoquímicas del producto lácteo y del producto lácteo combinado e información del etiquetado cuantitativo de los ingredientes	45
Tabla 3.3	Concentración relativa de las proteínas en las muestras comerciales	48

Lista de abreviaturas, acrónimos y símbolos

α -CN	alfa caseína	GMPA	glicomacropéptido variante A
α -LA	alfa lactoalbúmina	GMPB	glicomacropéptido variante B
AAPM	agregados de alto peso molecular	°C	grado Celsius
aGMP	aglicopéptido	°H	grados Horvet
Ala	alanina	h	hora
Arg	arginina	HCl	ácido clorhídrico
Asn	asparagina	His	histidina
Asp	ácido aspártico	HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia (por sus siglas en inglés)
β -CN	beta caseína	Igs	inmunoglobulinas
β -LG	beta lactoglobulina	Ile	isoleucina
BSA	albúmina sérica bovina	κ -CN	kappa caseína
CA	cromatografía de afinidad	kDa	kilodalton
CN	caseína	kg	kilogramo
CFG	cromatografía de filtración en gel	L	litro
CIH	cromatografía de interacción hidrofóbica	Leu	leucina
CII	cromatografía de intercambio iónico	Lys	lisina
CV	coeficiente de variación	μ L	microlitro
Cys	cisteína	μ g	microgramo
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético	M	molar
ELISA	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (por sus siglas en inglés)	mM	milimolar
EST	estándares de peso molecular	MC	mezcla compuesta
FDA	Administración de alimentos y medicamentos	MCR	material de referencia
FNC	fracción no caseínica	Met	metionina
γ -CN	gamma caseína	MF	microfiltración
g	gramo	mg	miligramo
Gal	galactosa	min	minuto
GalNAc	N-acetilgalactosamina	mL	mililitro
Gln	glutamina	M Ω	megaohmio
Glu	ácido glutámico	MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
Gly	glicina	NaOH	hidróxido de sodio
gGMP	glicopéptido	NeuAc	ácido N-acetilneuramínico
GMP	glicomacropéptido	nm	nanómetro
		pH	potencial de hidrógeno
		Phe	fenilalanina
		pI	punto isoeléctrico
		PL	producto lácteo
		PLC	producto lácteo combinado
		PP	precipitado
		pH	potencial de hidrógeno

Phe	fenilalanina
pI	punto isoelectrico
PL	producto lácteo
PLC	producto lácteo combinado
Pro	prolina
PS	proteínas del suero
PSAPM	proteínas del suero de alto peso molecular
Pyroglu	ácido piroglutámico
ρ	densidad
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
SA	suero ácido
SA _D	suero ácido dializado
SDQ	suero dulce de quesería
SDQ _D	suero dulce de quesería dializado
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (por sus siglas en inglés)
SN	sobrenadante
SNG	sólidos no grasos
SQ	suero de quesería
TCA	ácido tricloroacético
Thr	treonina
Tris	tris(hidroximetil)amino metano
Trp	triptófano
Tyr	tirosina
UF	ultrafiltración
v	volumen
Val	valina
WPC	concentrado de proteína del suero (por sus siglas en inglés)
% T	porcentaje de acrilamida
Σ	suma

Resumen

Un alimento se considera adulterado cuando su composición química no corresponde con la declaración nutrimental y la lista de ingredientes de la etiqueta o con las especificaciones propias de su denominación comercial. Se considera que la adulteración pretende obtener mayor rendimiento del producto final con la consecuente ganancia económica. Históricamente, la leche se ha adulterado de diferentes maneras: por adición de agua o suero de quesería, proteínas no lácteas, grasa no propia de la leche, urea, melamina, etc., afectando su calidad como materia prima y como producto terminado. El CODEX STAN 206-1999, establece que “la leche es la secreción mamaria de animales lecheros sanos obtenida mediante uno o más ordeños sin ningún tipo de adición o extracción, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración ulterior”. En ese sentido, se estableció la metodología analítica para detectar al glicomacropéptido (GMP) como indicador de la adulteración de leche y productos lácteos comerciales con suero dulce de quesería (SDQ), para lo cual se prepararon mezclas de leche entera pasteurizada (LP) con suero dulce de quesería en una relación 95:5, 90:10, 85:15, 80:20 y 70:30 (LP:SDQ) y se realizó el análisis fisicoquímico por ultrasonido así como la caracterización de los perfiles proteínicos por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Se detectó 0.26 % de agua agregada en la mezcla con un contenido del 85 % de leche. El aporte de sólidos no grasos del SDQ enmascara el efecto de la dilución de la leche interfiriendo en la mayoría de los parámetros fisicoquímicos evaluados por ultrasonido. Se aisló el GMP del SDQ y se detectó al macropéptido como un trímero de 28 kDa en la mezcla 95:5 (LP:SDQ) por SDS-PAGE. No se logró la separación de β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina del GMP debido a la interacción entre las proteínas del suero y el péptido promovida por el calor, interacciones iónicas e hidrofóbicas y la acidez del medio. El fraccionamiento de las proteínas lácteas mediante la precipitación isoeléctrica de las caseínas seguida de la precipitación secuencial de las proteínas del suero y del GMP con ácido tricloroacético, permitió detectar SDQ en dos muestras comerciales de leche, en tres productos lácteos y en un producto lácteo combinado. La confirmación de la presencia del SDQ, sin respetar la proporción entre las caseínas y las proteínas de suero, independientemente de la denominación comercial del producto, resulta en un engaño al consumidor.

Planteamiento del problema

La investigación y detección de fraudes alimentarios, particularmente en leche y productos lácteos, demanda generalmente complejos y costosos procedimientos analíticos que suelen incluir varias etapas y análisis instrumental. No obstante, la aplicación de un método analítico no es suficiente para calificar de fraude la obtención de un resultado anormal. Para la correcta interpretación del resultado es necesario disponer de conocimientos sobre las variaciones naturales del alimento, así como de una base legislativa para constatar y validar el resultado obtenido y poder calificar al producto (Laloux, 2006).

Particularmente, resulta económicamente atractivo adulterar productos lácteos con suero de quesería por su menor costo. Se han desarrollado distintos métodos para detectar la adición de suero de leche. Algunos están basados en la cuantificación de la relación entre las caseínas y las proteínas del suero (Mrowetz y Klostermeyer, 1976; Wolfschoon-Pombo y Furtado, 1989; De Souza *et al.*, 2000; Miralles *et al.*, 2000), pero la mayoría de los estudios se han enfocado en la detección del glicomacropéptido (GMP) y han sido aplicados en leche en polvo, leche ultrapasteurizada y bebidas lácteas saborizadas (Koning *et al.*, 1966; Van Hooydonk y Olieman, 1982; Kawakami *et al.*, 1992; Fukuda *et al.*, 1994; Nakano y Ozimek, 1999; Ferreira y Oliveira, 2003; Galindo-Amaya *et al.*, 2006; Haasnoot *et al.*, 2006; Bremer *et al.*, 2008; Chávez *et al.*, 2008; Martín-Hernández *et al.*, 2009; Oancea, 2009; Chávez *et al.*, 2012; Neelima *et al.*, 2012). No obstante, México no cuenta con un método de ensayo oficial para detectar adulteración de leche y productos lácteos con suero dulce de quesería de manera rutinaria.

La adición de suero dulce de quesería en leche y productos lácteos representa un problema en el sector alimentario. Se considera adulteración, por buscar mayor rendimiento y ganancia económica, pero también representa un riesgo a la salud debido a la hipersensibilidad que algunas personas pueden presentar a la β -lactoglobulina, la más alergénica de las proteínas lácteas. En ambos casos, el problema radica cuando no se declara su uso en la lista de ingredientes de la etiqueta del producto (Niemi *et al.*, 2007).

Hipótesis

Si el glicomacropéptido sólo se encuentra presente en el suero dulce de quesería, entonces su detección en leche y productos lácteos indicará la adición intencional del suero dulce de quesería en estos alimentos.

Objetivo general

Establecer la metodología analítica para detectar glicomacropéptido como indicador de la adulteración de leche y productos lácteos comerciales con suero dulce de quesería.

Objetivos particulares

Detectar la adulteración de leche con suero dulce de quesería mediante el análisis fisicoquímico por ultrasonido.

Analizar los perfiles proteínicos de mezclas de leche con suero dulce de quesería por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

Aislar y detectar el glicomacropéptido del suero dulce de quesería para ser empleado como referencia durante el fraccionamiento de las proteínas lácteas e indicador de la adulteración de leche con suero dulce de quesería.

Evaluar el efecto de la separación de la caseína isoelectrica y la aplicación de tratamiento térmico combinado con ultrafiltración como etapas previas a la detección del glicomacropéptido por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

Aplicar la metodología optimizada para el fraccionamiento de las proteínas lácteas en muestras comerciales de leche y lácteos a fin de detectar su posible adulteración mediante la determinación de la proporción entre las caseínas y las proteínas de suero.

1.0 Marco teórico

1.1 Fraude en alimentos

La complejidad del suministro de alimentos a nivel mundial y la falta de sanciones hacen que el fraude alimentario sea un problema serio, significativo y creciente desde el punto de vista de salud pública y seguridad alimentaria (Spink y Moyer, 2011). La industria debe elaborar alimentos y ofrecerlos como seguros, genuinos y con la mejor calidad posible hasta su comercialización y consumo (Handford *et al.*, 2016; Manning, 2016).

Existen varios tipos de fraude en alimentos: la adulteración, manipulación, robo, desviación, etiquetado incorrecto y falsificación de alimentos, por mencionar algunos. Con respecto a la adulteración, se puede decir que un alimento adulterado es aquél que se altera intencionalmente añadiendo ilegalmente alguna sustancia ajena al alimento (Spink y Moyer, 2011). Prácticamente todos los alimentos pueden ser adulterados, pero aquéllos que son más costosos o que se producen en condiciones climáticas específicas, son especialmente vulnerables (Sharma y Paradakar, 2010). La adulteración económicamente motivada es una subcategoría del fraude alimentario y es una causa de riesgo de salud pública (Spink y Moyer, 2011). La FDA (2009) la define como la sustitución o adición fraudulenta e intencional de una sustancia en un producto con el fin de aumentar su valor aparente o reducir el costo de producción.

Los alimentos lácteos son componentes importantes en la dieta por su valor nutricional (Borad *et al.*, 2017), por lo que han sido blanco de actividades fraudulentas. La leche es adulterada por dos motivos: ganancia económica o por malas condiciones de procesamiento, almacenamiento y transporte, etc., (Handford *et al.*, 2016). Algunos productores de leche pueden aumentar las ganancias por medio de la dilución, extracción de componentes valiosos, como la grasa butírica, y por la adición de ingredientes de menor costo para aumentar el volumen. Una de las formas más simples y comunes es mediante la adición de agua, esto disminuye el valor nutricional de la leche y si el agua está contaminada existe un riesgo para la salud humana. Otros adulterantes se pueden adicionar a la leche diluida: leche descremada en polvo, leche reconstituida, urea, harina de arroz, sal, almidón, glucosa, aceite

vegetal, grasa animal, melanina, suero en polvo, con el fin de conservar el contenido de los componentes principales y sus propiedades fisicoquímicas: pH, la acidez, el contenido de sólidos totales, contenido de grasa, de proteína, entre otros (Singh y Gandhi, 2015; Handford *et al.*, 2016).

Debido a que la leche es un alimento perecedero, puede sufrir procesos de deterioro durante su almacenamiento, transporte y distribución si el sistema de refrigeración no es efectivo, por lo que se le adiciona agentes antimicrobianos o álcalis para neutralizar la acidez generada, extendiendo su vida útil (Singh y Gandhi, 2015).

La detección de posibles adulterantes es un problema porque a medida que los laboratorios mejoran las técnicas de análisis, los productores fraudulentos introducen nuevas alternativas que no pueden ser detectadas por las técnicas ya establecidas. Los productos lácteos adulterados pueden encontrarse en varias zonas de mundo. Por el contrario, en la Unión Europea, la preocupación por el fraude alimentario es menor debido a que cuenta con altos estándares de seguridad alimentaria y los casos de adulteración de lácteos son escasos (Finete *et al.*, 2013).

1.2 Leche

La leche es el fluido secretado por las hembras de todos los mamíferos cuya función principal es cubrir los requisitos nutricionales del neonato. Agua, lípidos, lactosa y proteínas son los componentes principales (Fox *et al.*, 2015). Desde el punto de vista fisicoquímico, la leche es un fluido complejo; la mayor parte de la leche es considerada una disolución acuosa verdadera de lactosa, sales, vitaminas y otras moléculas en agua, en esta disolución están dispersas las proteínas del suero mientras que las caseínas se encuentran como agregados coloidales y emulsificados los glóbulos de grasa (Fox *et al.*, 2015). Particularmente, las proteínas de la leche se dividen en dos fracciones: las caseínas y las proteínas del suero. Las caseínas constituyen aproximadamente el 80 % de las proteínas de la leche, son fosfoproteínas que precipitan por acidificación a pH 4.6 a 20 °C y se agrupan en cuatro familias de acuerdo a la homología de su estructura primaria: α_{s1} -caseína (α_{s1} -CN), α_{s2} -

caseína (α_{s2} -CN), β -caseína (β -CN), y κ -caseína (κ -CN), cuya abundancia relativa corresponde a 40:10:35:15, respectivamente (Farrell *et al.*, 2004).

Las proteínas del suero representan el 20 % del total de las proteínas lácteas. Están constituidas principalmente por β -lactoglobulina (β -LG) y α -lactoalbúmina (α -LA), cuya abundancia corresponde al 50 % y al 20 % del contenido total de proteínas en el suero, respectivamente. Inmunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidasa, albúmina sérica bovina, lisozima, proteosa peptona, se encuentran en menor concentración (Zadow, 1994).

Las caseínas se encuentran agrupadas con el fosfato de calcio coloidal en forma de estructuras supramoleculares conocidas como micelas de caseínas (Fig. 1.1). Se localiza κ -CN mayoritariamente en la superficie, su extremo más hidrofílico se extiende formando una capa de entre 5 nm a 10 nm llamada “capa pilosa” que evita que las micelas de caseína se acerquen entre sí por impedimento estérico (Horne, 2009). La familia de κ -CN consiste de un componente libre de carbohidratos (aproximadamente 50 %) y se han encontrado al menos seis componentes más con diferente grado de glicosilación y fosforilación (Farrell *et al.*, 2004).

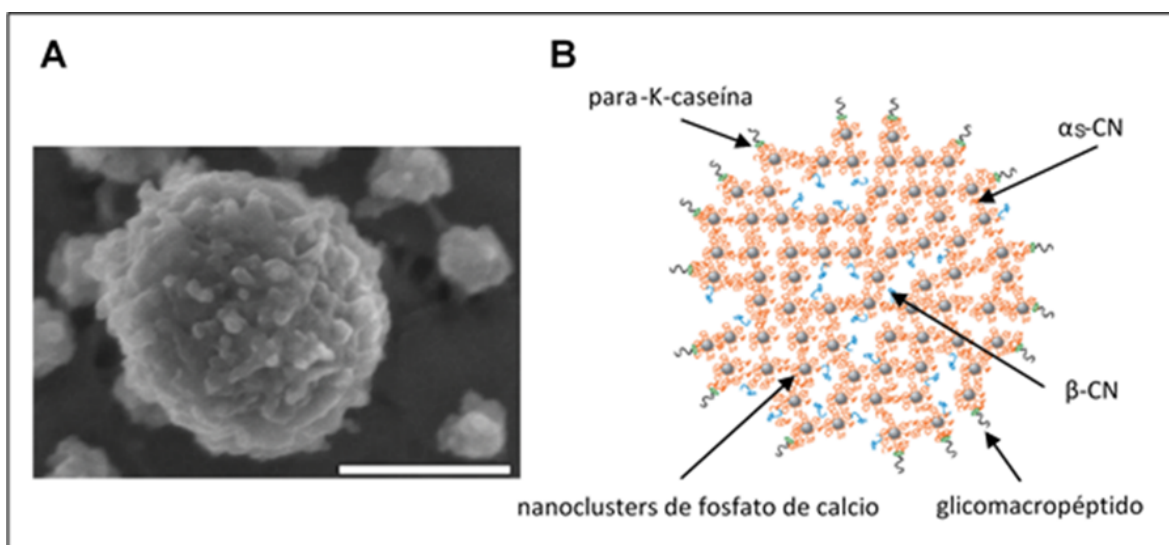


Figura 1.1. Micela de caseína. A: imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido (barra: 200 nm) y B: representación esquemática de la micela de caseína. Naranja: α -caseína (α_s -CN) y β -caseína (β -CN); gris: *nanoclusters* de fosfato de calcio; azul: β -caseína hidrofóticamente unida a otras caseínas; verde: para-kappa-caseína (para- κ -CN) y negro: glicomacropéptido. Adaptado de Dalgleish y Corredig, 2012.

La galactosa (Gal), la N-acetilgalactosamina (GalNAc) y el ácido N-acetilneuramínico (NeuAc) son los principales carbohidratos que se han encontrado covalentemente unidos a determinados residuos de treonina (Thr₁₃₁, Thr₁₃₃, Thr₁₄₂ y Thr₁₆₅) (Farrell *et al.*, 2004), principalmente como tetrasacáridos [NeuAc α (2 \rightarrow 3) Gal β (1 \rightarrow 3) [NeuAc α (2 \rightarrow 6)] GalNAc], trisacáridos [NeuAc α (2 \rightarrow 3) Gal β (1 \rightarrow 3) GalNAc] o [Gal β (1 \rightarrow 3) [NeuAc α (2 \rightarrow 6)] GalNAc] y disacáridos [Gal β (1 \rightarrow 3) GalNAc] (Fig. 1.2). La estructura primaria de la proteína de referencia, κ -CN A-1P consiste de 169 residuos de aminoácidos: Asp (4), Asn (8), Thr (15), Ser (12), SerP (1), Pyroglu (1), Glu (12), Gln (14), Pro (20), Gly (2), Ala (14), Cys (2), Val (11), Met (2), Ile (12), Leu (8), Tyr (9), Phe (4), Lys (9), His (3), Trp (1), y Arg (5), con un peso molecular de 19 kDa (Mollé y Léonil, 1995; Abd El-Salam *et al.*, 1996; Farrel *et al.*, 2004; Holland *et al.*, 2004; Holland, 2009; Casal *et al.*, 2013). Las principales variantes genéticas son A y B, pero se han identificado hasta 16 (O’Riordan *et al.*, 2014).

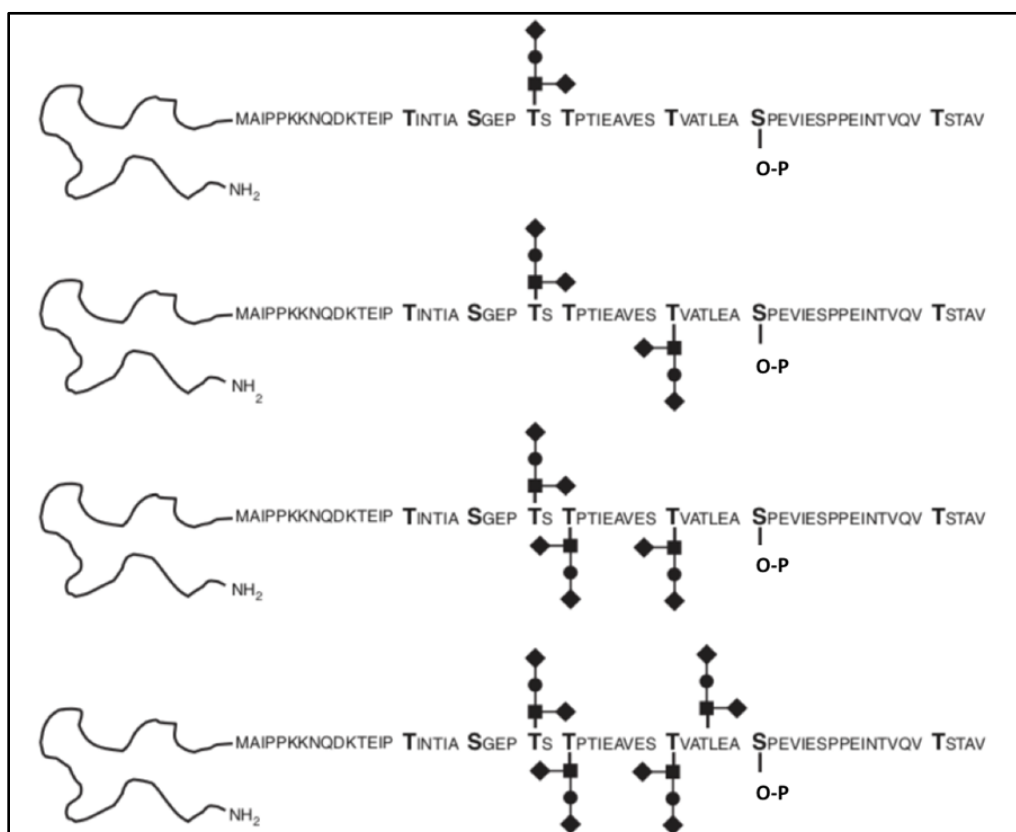


Figura 1.2. Representación esquemática de κ -CN destacando la porción del glicomacropéptido y los posibles sitios de unión de los tetrasacáridos. Símbolos: (■) GalNAc (N-acetilgalactosamina), (●) Gal (galactosa), (◆) NeuAc (ácido N-acetilneuramínico). Adaptado de Holland, 2009.

1.3 Suero de quesería

El suero de quesería es el subproducto generado durante el proceso de elaboración de queso. Es un líquido amarillo verdoso obtenido después de la precipitación de las caseínas usando enzimas o ácidos. El suero retiene aproximadamente el 55 % de los nutrimentos de la leche (lactosa, sales minerales y algunas proteínas residuales) y representa casi el 90 % del volumen de la leche (Green, 1977; González, 1996; Illanes, 2011). En la Tabla 1.1 se muestra la composición química promedio del suero dulce y del suero ácido (Panesar *et al.*, 2007).

Los productores de queso han considerado al suero de quesería como un desperdicio. La cantidad de suero generado en la producción de queso depende de la variedad de queso producido. Aproximadamente, para la producción de un kilogramo de queso, se requieren 10 litros de leche y se obtienen aproximadamente de 8 a 9 litros de suero (Richards, 1997).

Tabla 1.1. Composición química promedio del suero dulce y del suero ácido.

componente (g/L)	suero dulce	suero ácido
Sólidos totales	63 - 70	63 - 70
Lactosa	46 - 52	44 - 67
Proteína	6 - 10	6 - 8
Grasa	0 - 5	0 - 5
Minerales	4 - 6	6 - 8

Fuente: Panesar *et al.*, 2007.

1.4 Glicomacropéptido

El suero dulce de quesería es el derivado del tratamiento de la leche con cuajo en el proceso de elaboración de quesos. La quimosina hidroliza el enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de κ -CN provocando la cuajada de la leche. Este enlace peptídico es el más susceptible a la hidrólisis por proteasas ácidas que cualquier otro de las proteínas lácteas, dando lugar a dos macropéptidos: para-[kappa]-caseína (para- κ -CN), que comprende los residuos de aminoácidos del 1 al 105, de naturaleza catiónica a pH 6.6 e hidrofóbica, que retiene la

cuajada, y el GMP, de naturaleza polar, termoestable y soluble en el suero dulce de quesería a un nivel de concentración de entre 1.2 g/L a 1.5 g/L (Abd El-Salam, 2006; Nakano y Ozimek, 2014), que presenta todas las modificaciones post-traduccionales y las variantes genéticas de κ -CN (Manso y Lopez-Fandino, 2004). Por lo anterior, el GMP puede ser utilizado como indicador de la adulteración de leche cruda e industrializada con suero dulce de quesería (López y Ramos, 1992).

1.4.1 Estructura, composición química e isoformas

El GMP es un péptido de 64 residuos de aminoácidos, se caracteriza por su contenido de aminoácidos de cadena ramificada y de carecer de aminoácidos aromáticos (Oliva *et al.*, 2002), por lo que se administra a pacientes con fenilcetonuria. Puede contener de 1 a 3 grupos fosfato por molécula (Mercier, 1981; Mollé y Léonil, 2005), que corresponden a la Ser₁₂₇, Ser₁₄₉ (Talbo *et al.*, 2001) y a la Thr₁₆₆ (Holland *et al.*, 2006).

La glicosilación del GMP presenta cierto grado de heterogeneidad, tanto por los sitios de unión como por el tipo de carbohidratos unidos al péptido, responsables de la actividad biológica (Li y Mine, 2004). Las variantes genéticas A y B del GMP son las más comunes y se representan como GMPA y GMPB, respectivamente. Estas variantes difieren en dos residuos de aminoácidos: la posición 136 corresponde a una treonina, en la variante A, y a una isoleucina en la variante B; en la posición 148 la variante A tiene un ácido aspártico, mientras que la variante B tiene una alanina (Oliva *et al.*, 2002) y con respecto a la glicosilación el GMP se clasifica en: glicopéptido, que se encuentra glicosilado y monofosforilado (gGMP) y aglicopéptido, no glicosilado pero monofosforilado (aGMP) (Fig. 1.3). Se han encontrado al menos 14 diferentes formas glicosiladas de la variante A del GMP, que pueden contener hasta seis residuos de NeuAc, conocido también como ácido siálico (Mollé y Léonil, 1995). Se han identificado 10 isoformas en la variante B que difieren en el contenido de ácido siálico (Vreeman *et al.*, 1986). El GMP con una pureza del 90 % está glicosilado con un 7 % a 8 % de ácido siálico (Martín *et al.*, 2004).

1.4.2 Punto isoelectrico

Debido a su heterogeneidad en glicosilación y fosforilación, el GMP no tiene un solo punto isoelectrico (pI). Usando cromatografía de intercambio iónico (CII), Nakano y Ozimek (2000) determinaron el valor del pI del GMP completamente sialilado de pH= 3.8, por su parte, Kreuz *et al.* (2009) determinaron mediante microelectroforesis el pI para el gGMP y el aGMP a valores de pH de 3.15 y 4.15, respectivamente.

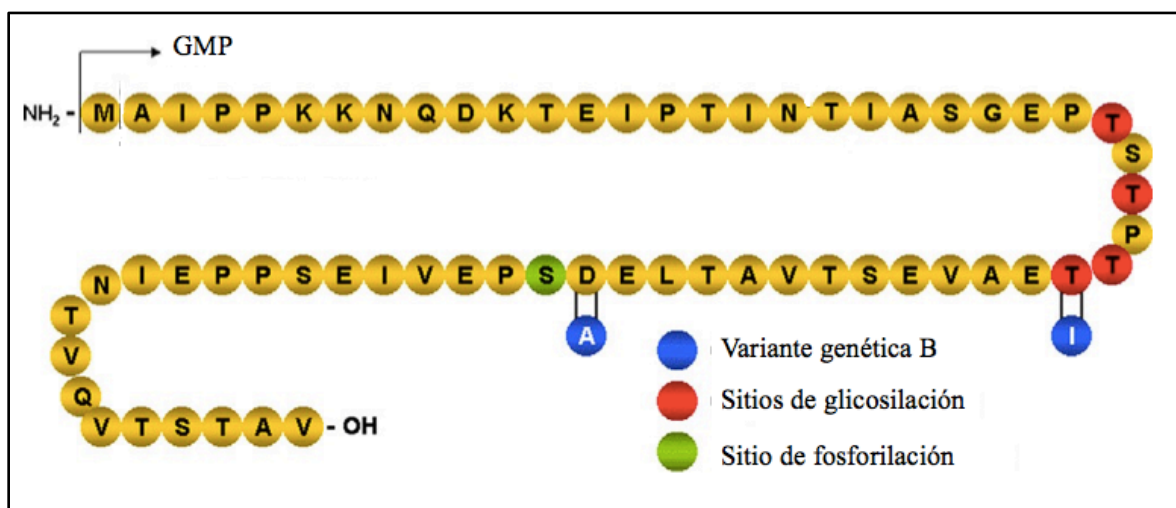


Figura 1.3. Secuencia primaria del glicomacropéptido. Adaptado de Motta *et al.*, 2014.

1.4.3 Peso molecular

Al igual que el pI, el peso molecular del GMP es variable. Su valor promedio es de 7.5 kDa y el de la forma completamente glicosilada de 9.6 kDa (Mollé y Léonil, 1995, 2005), debido a que los monómeros de GMP se asocian para formar agregados (Neelima *et al.*, 2012), incluso las moléculas se asocian y disocian en función del pH (Kawasaki *et al.*, 1993b). Sin embargo, Nakano y Ozimek (1999), usando cromatografía de filtración en gel (CFG), reportaron que el GMP forma agregados de tres monómeros independientemente del pH. La autogregación del GMP representa problemas para su identificación y su uso como marcador en la detección de adulteración de la leche con suero dulce de quesería mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y por inmunoensayos (*Western blot*) (Neelima *et al.*, 2012).

1.4.4 Propiedades funcionales

El GMP es de naturaleza anfipática. La parte glicano de la molécula es hidrofílica y afecta significativamente la actividad superficial, mientras que la cadena peptídica posee propiedades hidrofóbicas (Tolkach y Kulozik, 2005), por lo que presenta capacidad emulsificante, y es diferente para el gGMP con respecto al aGMP. La estabilidad de las emulsiones es 1.4 veces mayor para el aGMP comparado con el gGMP (Kreuß *et al.*, 2009). Kreuß *et al.* (2009) propusieron un modelo teórico de la adsorción del GMP en la interfase agua/aceite en función de la glicosilación y el pH (Fig. 1.4). En el GMP a pH 7.0 las cargas negativas predominan debido a los residuos 118, 129, 137, 144, 148, 151, 155 del ácido glutámico y a los residuos 115, 148 del ácido aspártico, para ambas fracciones (aGMP y gGMP), este efecto es más pronunciado en el gGMP debido a la carga negativa de los residuos sialilados. A pH 7.0 ($\mu=0$), en el N-terminal del aGMP, se localizan tres dominios con carga positiva, por el contrario, el C-terminal posee carga negativa, posiblemente ambas regiones interactúen electrostáticamente, mientras que los dominios hidrofóbicos se orientan hacia la fase no acuosa (Figura 1.4).

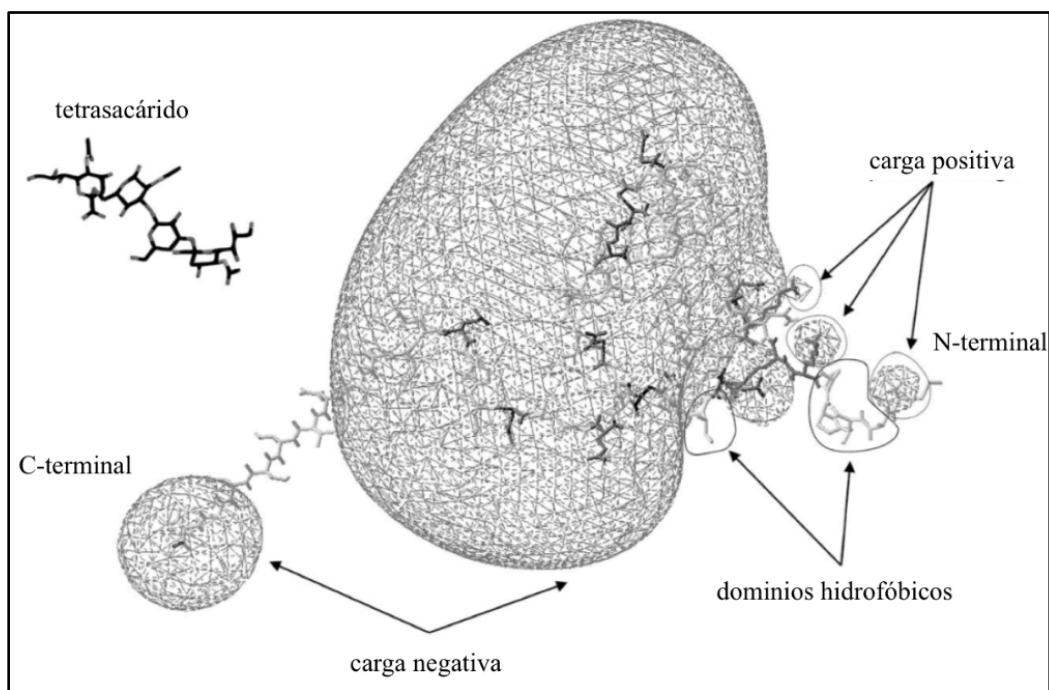


Figura 1.4. Modelo tridimensional del GMP a pH 7.0 ($\mu=0$). Adaptada de Kreuß *et al.*, 2009.

La mayor parte de los residuos iónicos se asocian dentro de la fase acuosa. Esto conduce a la formación de una capa estable y una red de moléculas de aGMP en la superficie (Fig. 1.5a). Los carbohidratos son responsables de la repulsión entre las moléculas del GMP en la superficie debido a la hidratación y a la carga eléctrica negativa. Esta repulsión evita la formación de una red ordenada entre los monómeros de gGMP. Las moléculas de gGMP muestran una tendencia a mantenerse alejadas entre ellas (Fig. 1.5b), este efecto produce mayor coalescencia en emulsiones elaboradas con gGMP (Kreuz *et al.*, 2009).

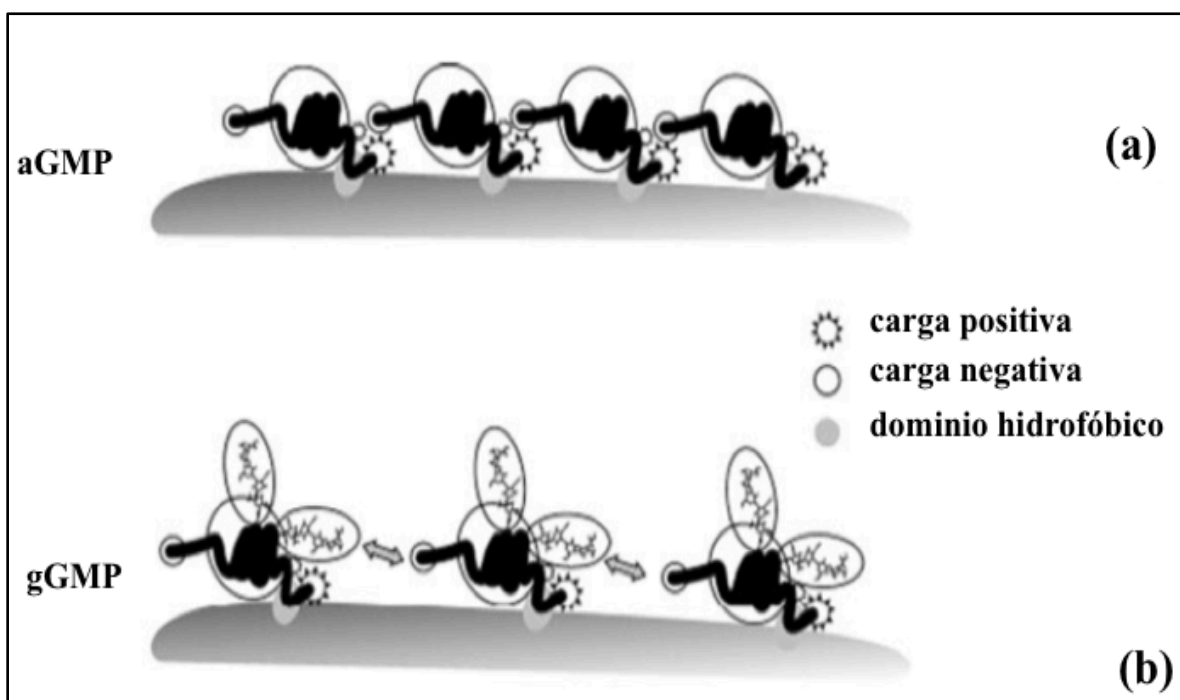


Figura 1.5. Diagrama esquemático de la adsorción del aGMP y gGMP en una interfase hidrofóbica/hidrofílica a pH 7.0. Adaptada de Kreuz *et al.*, 2009.

Se ha propuesto que el GMP tiene la capacidad de formar geles debido a las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas entre los monómeros de la molécula en función del pH (Fig. 1.6). A valores superiores de pH 6.5, los residuos de aminoácidos ácidos se desprotonan, produciendo cargas negativas, que evitan la autoagregación del GMP. A valores menores de pH 6.5, los residuos de aminoácidos ácidos se protonan, permitiendo que los dominios hidrofóbicos interactúen mediante la formación de dímeros, y en una segunda etapa, a pH menores de 4.5, se promueve la autoagregación electrostática que da lugar a la formación de geles (Farías *et al.*, 2010).

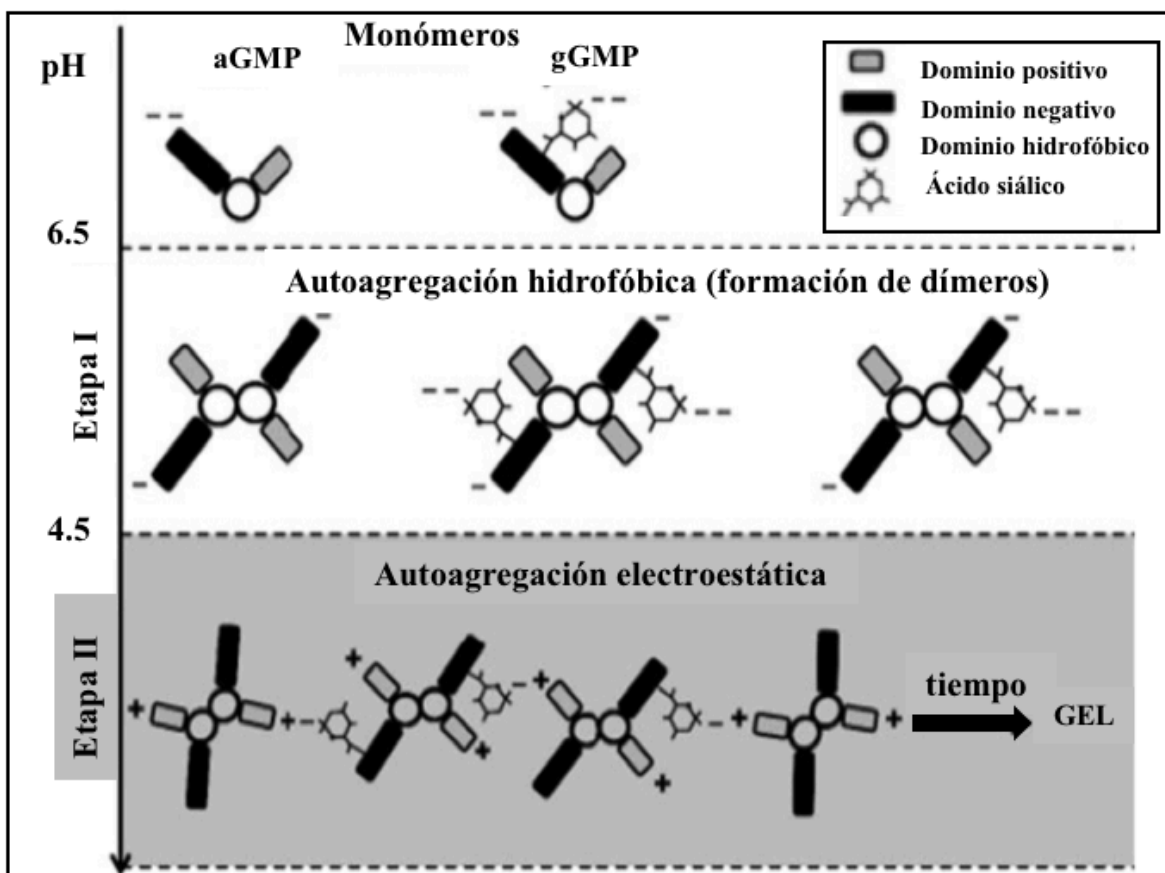


Figura 1.6. Modelo de autoagregación del glicomacropéptido. Adaptado de Farías *et al.*, 2010.

1.4.5 Propiedades biológicas

Algunos péptidos provenientes de proteínas lácteas poseen actividad biológica como reguladores fisiológicos, directamente en forma de neurotransmisores o indirectamente participando en la secreción de hormonas y enzimas de los receptores del intestino. Muchas de las actividades biológicas y fisiológicas se han atribuido al GMP y a fragmentos derivados de él (Abd El-Salam *et al.*, 1996), resaltando que la región de los principales sitios de fosforilación es resistente a la digestión gástrica. Las actividades biológicas que se han estudiado del GMP se enlistan en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Propiedades biológicas del glicomacropéptido.

Propiedad biológica	Usos	Autores
Inhibición de la adhesión de actinomicos y estreptococos orales a eritrocitos y poliestireno	Inhibidor de placas o caries dentales	Neeser, 1987
Reducción de la secreción gástrica	Eficiencia de la asimilación de proteínas lácteas	Chernikov <i>et al.</i> , 1974 Stan <i>et al.</i> 1983 Aleinik <i>et al.</i> 1984
Promotor de crecimiento de bifidobacterias	Factor bífido	Azuma <i>et al.</i> 1984
Inhibición de la toxina de <i>Vibrio cholerae</i>	Ingrediente alimentario dietético para la prevención de trastornos gastrointestinales causados por patógenos	Kawakami <i>et al.</i> , 1992
Inhibición de la hemaglutinación	Inhibición del virus de la influenza	Kawasaki <i>et al.</i> , 1993a
Modulación de la respuesta inmune	Tratamiento de la inflamación intestinal	Otani <i>et al.</i> , 1992 Requena <i>et al.</i> , 2010
Estimulación de la liberación de colescistoquinina	Mejorar la saciedad	Beucher <i>et al.</i> , 1994 Burton-Freeman, 2008
Efecto de inhibición de la adhesión de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	Prevenir infecciones intestinales	Nakajima <i>et al.</i> , 2005
Manejo nutricional de la fenilcetonuria	Suplemento alimenticio	LaClair <i>et al.</i> , 2009 Van Calcar y Ney, 2012

Adaptado de Abd El-Salam *et al.*, 1996 y Neelima *et al.*, 2013.

1.4.6 Técnicas de purificación del glicomacropéptido

El aislamiento del GMP a partir de suero dulce de quesería se ha intentado mediante diversas técnicas tales como precipitación con ácido tricloroacético (TCA) (Lieske y Konrad, 1996), precipitación con alcohol etílico (Saito *et al.*, 1991), ultrafiltración (UF) (Kawasaki *et al.*, 1993b, Robitaille *et al.*, 2012), tratamiento con transglutaminasa seguido de microfiltración (Tolkach y Kulozik, 2005), sistemas acuosos de dos fases (Da Silva *et al.*, 2009) y técnicas cromatográficas como cromatografía por permeación en gel (CPG) (Morr y Seo, 1988,

Nakano y Ozimek, 2000), cromatografía de afinidad (CA) (Saito *et al.*, 1991), cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH) (Silva-Hernandez *et al.*, 2002), cromatografía de intercambio iónico (CII) (Tanimoto *et al.*, 1992), cromatografía de absorción de membrana (Kreuz *et al.*, 2009). La mayoría de las veces, la combinación de técnicas es lo que mejor ha funcionado. Estas combinaciones utilizadas para el aislamiento de GMP se han categorizado en tres diferentes: (1) precipitación selectiva usando calor/alcohol/ácido acético/TCA; (2) UF o microfiltración (MF)/diálisis/ósmosis inversa/electrodiálisis, y (3) adsorción selectiva usando CII /CIH/CA (Tullio *et al.* 2007).

1.4.7 Técnicas de identificación del glicomacropéptido

La detección de suero en leche demanda procedimientos analíticos complejos que suelen incluir varias etapas y análisis instrumental para su identificación y cuantificación, en la Tabla 1.3 se presenta algunas de las técnicas más empleadas para la detección de suero dulce de quesería en leche. En la mayoría de los métodos se parte de la desproteínización de la muestra empleando ácido tricloroacético (TCA), seguido de técnicas de separación (precipitación, cromatografía y electroforesis) y detección mediante la formación de complejos coloridos, fluorescencia e inmunoensayos, por otro lado, el suero es sensorialmente similar a la leche, por lo que las pruebas organolépticas no son adecuadas para tal propósito (Neelima *et al.*, 2013, Puga *et al.*, 2017). Se han reportado varios métodos para detectar la adulteración de la leche y al igual que los métodos de purificación estos se pueden agrupar dependiendo de la medición o no del GMP. Los métodos no basados en el GMP incluyen la determinación de la proporción de caseína y proteína de suero utilizando espectrofotometría (Miralles *et al.* 2000), análisis electroforético (De Souza *et al.* 2000), determinación del índice de fósforo unido a la caseína (Wolfschoon-Pombo y Furtado, 1989) y la cuantificación de la relación cisteína y cistina mediante polarografía (Mrowetz y Klostermeyer, 1976). El otro grupo incluye métodos que se basan principalmente en la presencia del GMP.

Tabla 1.3. Técnicas de identificación del glicomacropéptido

Método	Límite de Detección (% m/m)	Técnica empleada	Principio	Referencia
Colorimétrico	5-10	Reacción entre el ácido siálico con el ácido tiobarbitúrico	Producción del ácido β -formilpirúvico que al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico forma un cromóforo rojo.	Koning <i>et al.</i> , 1966 Nakano y Ozimek, 1999
		Reacción del GMP con ninhidrina ácida	Producción de color por tratamiento térmico. Reacción específica para sialoproteínas.	Fukuda <i>et al.</i> , 1994
Fluorométrico	5	Reacción del GMP con NaIO_4 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$ y acetoacetanilida	Producción de formaldehído, ciclación con acetoacetanilida en presencia de amoníaco. La intensidad de fluorescencia de derivado de dihidropiridina depende de la concentración de ácido siálico.	Neelima <i>et al.</i> , 2012
Cromatográfico	1	HPLC	Detección del GMP	Van Hooydonk y Olieman, 1982
		CPG	Separación del gGMP y aGMP.	Kawakami <i>et al.</i> , 1992
		RP-HPLC	Separación de las variantes genéticas A y B en fase reversa empleando una columna de poliestirendivinil benceno y gradiente de elución con ácido trifluoroacético y acetonitrilo	Ferreira y Oliveira, 2003
Electroforesis	1	CPG y RP-HPLC	Detección por CPG y confirmación por RP-HPLC	<i>Official Journal of the European Communities</i> L 037, 2001
		SDS-PAGE	Precipitación selectiva y secuencial del GMP con TCA	Galindo-Amaya <i>et al.</i> , 2006
		ELISA	Anticuerpos monoclonales que reconocen a κ -CN	Bremer <i>et al.</i> , 2008
Inmunológicos	0.047-1.0	ELISA	Anticuerpo monoclonal anti-GMP de conejo	Chávez <i>et al.</i> , 2012
		<i>Western blot</i>	Anticuerpos policlonales anti-GMP de conejo, y después aplicados en <i>Western blot</i>	Chávez <i>et al.</i> , 2008
		Inmunoensayo de flujo lateral	Detección rápida mediante la unión de dos diferentes anticuerpos monoclonales de κ -CN al GMP	Martín-Hernandez <i>et al.</i> , 2009

Adaptado de Neelima *et al.*, 2013.

1.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis en gel de poliacrilamida es una técnica de separación comúnmente empleada para la identificación y caracterización de proteínas. El uso de la electroforesis para separar proteínas fue reportado por primera vez por Arne Tiselius en 1937. En su técnica introdujo el concepto de frente móvil, y el método recibió el nombre de electroforesis de zona, en donde la muestra migra en un soporte sólido como el papel filtro, celulosa, almidón o un gel de poliacrilamida (Voet y Voet, 2011). La movilidad electroforética depende de la carga neta y el tamaño de la proteína, cada proteína tiene una movilidad electroforética específica (Westermeier, 2012).

Laemmli (1970) desarrolló la técnica para separar a las proteínas con base en su peso molecular. Consiste en la desnaturalización de las proteínas con dodecil sulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés), un detergente iónico que además le confiere carga neta negativa a las proteínas; aproximadamente interacciona 1.4 g de SDS por gramo de proteína, de esta forma, la movilidad del complejo SDS-proteína depende únicamente del peso molecular. Este método se conoce como electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio o bien SDS-PAGE (por sus siglas en inglés). Esta técnica es una de las más utilizadas por varias razones: el SDS solubiliza a casi todas las proteínas, la separación es rápida, se alcanza buena resolución además de que es fácil fijar y teñir el gel para detectar a las proteínas (Westermeier, 2012).

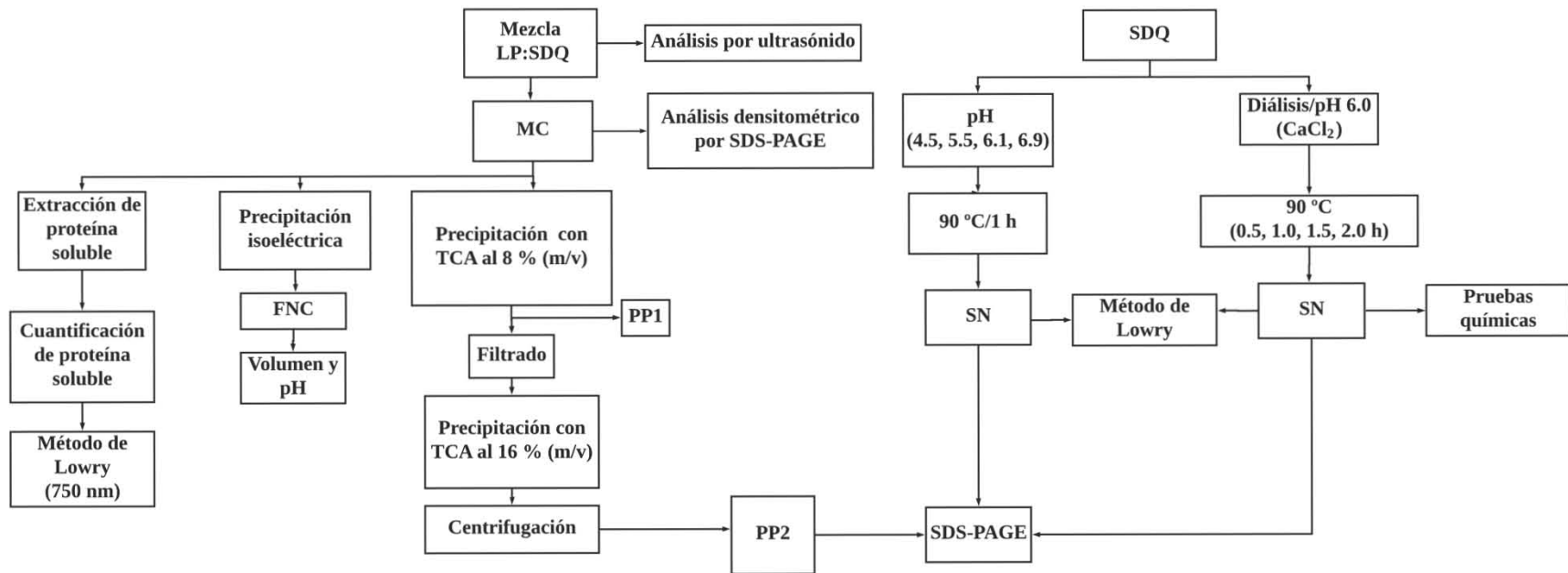
Los geles de poliacrilamida se forman por la reacción de polimerización inducida entre los radicales libres de la acrilamida y la N, N'-metilenbisacrilamida, en presencia de un iniciador y un catalizador. El persulfato de amonio, actúa como iniciador de la polimerización al liberar radicales libres, mientras que el TEMED (N, N, N', N'- tetrametiletildiamina) es el catalizador (Voet y Voet, 2011).

Actualmente el gel se prepara y moldea como un rectángulo (de 0.75 mm a 1.5 mm de espesor) en el que varias muestras pueden ser analizadas simultáneamente en carriles paralelos. Cuando el gel se somete a un campo eléctrico, inmerso dentro de una disolución

amortiguadora, las proteínas migran hacia el ánodo. Las bandas de una mezcla de proteínas se separan mediante una técnica llamada electroforesis discontinua, que requiere de dos geles: el gel separador y el gel concentrador. El gel concentrador se polimeriza en la parte superior del gel separador, las muestras de proteínas se aplican en este gel y migran con la misma velocidad hasta que alcanzan el borde del gel separador, provocando un efecto de apilamiento y concentración, por el menor tamaño de poro, diferente pH y concentración del gel separador. La separación se logra por el retraso de la migración de las moléculas de proteína relativamente grandes, pero no de las proteínas pequeñas (Westermeier, 2012). Las bandas resultantes son visualizadas generalmente mediante la tinción con azul de *Coomassie*, donde el gel es sumergido en una disolución ácida-alcohólica que contiene el colorante, las proteínas forman complejos con el colorante y se fijan en el gel, al mismo tiempo, después el exceso de colorante se elimina por medio de lavados con una disolución ácida (Smejkal, 2006).

2.0 Metodología

2.1 Esquema de bloques de la estrategia experimental



2.2 Materiales

Leche entera pasteurizada (**LP**), suero dulce de quesería (**SDQ**), donado por los alumnos del laboratorio de tecnología de alimentos (**LABTEC**) de la Facultad de Química, y suero ácido (**SA**), obtenido por acidificación de leche entera pasteurizada con una disolución de ácido acético al 30 % (v/v), se empleó como control negativo. Para prevenir la contaminación microbiológica a ambos sueros se les adicionó azida de sodio (NaN_3) al 0.14 % (m/v) y se mantuvieron en refrigeración hasta su uso.

2.3 Preparación de las disoluciones amortiguadoras

Para la elaboración de las disoluciones amortiguadoras, cuya composición se indica en el anexo A, se empleó agua Tipo I (18.2 M Ω /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.

2.4 Preparación de mezclas de leche pasteurizada con suero dulce de quesería

Se prepararon, por triplicado, mezclas de leche entera pasteurizada con suero dulce de quesería **LP:SDQ**, en las siguientes proporciones: 97:3, 95:5, 90:10, 80:20 y 60:40 (v/v).

2.4.1 Análisis fisicoquímico por ultrasonido de las mezclas compuestas

A cada mezcla LP:SDQ se le determinó el contenido de grasa, proteína, sólidos no grasos, densidad, agua agregada y punto crioscópico por ultrasonido (*LactiCheck™*). De las 3 réplicas independientes de cada mezcla LP:SDQ se preparó una mezcla compuesta (**MC**). A manera de control, se realizó las mezclas de leche entera pasteurizada con agua (LP:agua): 90:10, 80:20, 70:30, 60:40 y 50:50 (v/v). El análisis fisicoquímico por ultrasonido se presenta en el anexo B.

2.4.2 Cuantificación de proteína soluble de las mezclas compuestas

Se utilizaron dos disoluciones amortiguadoras para extraer y solubilizar las proteínas de las MCs: disolución amortiguadora de muestra (urea, 6 M; hidroxipropilmetilcelulosa, 0.05 %, m/v, sal disódica del ácido etilendiamino tetracético, 65 mM; Tris-base, 167 mM y ácido 3-morfolino-4-il-propano-1-sulfónico, 42 mM) (pH 8.5), y disolución amortiguadora de solubilidad (tetraborato de sodio, 30 mM y EDTA, 40 mM) (pH 8.3). Se determinó la concentración de la proteína soluble por triplicado mediante el método de Lowry (Peterson, 1977), utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar de la curva de calibración (Anexo C).

2.4.3 Precipitación isoelectrica de las caseínas de las mezclas compuestas

En cada MC, las caseínas (CN) se precipitaron por acidificación del medio a pH 4.6 de acuerdo a la Norma Internacional ISO 17997-1 (2004). El precipitado se separó por filtración (papel filtro 1001-150, *Whatman*TM), se lavó dos veces con agua y se secó a 45 °C (Horno DX300, *Yamato Scientific Co.*). Se midió el volumen y el pH del filtrado (fracción no caseínica, FNC). A un volumen de la FNC se le adicionó un volumen equivalente de una disolución de ácido tricloroacético (TCA) al 24 % (m/v) y se almacenó a 4 °C toda la noche. La fracción insoluble se separó por centrifugación a 5 000 rpm, por 10 min a 4 °C (Centrífuga 5430 R, *Eppendorf*) y el precipitado se resuspendió en la disolución amortiguadora de urea, 8 M y 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato (CHAPS) al 4.0 % m/v.

2.5 Aislamiento de glicomacropéptido del suero dulce de quesería por precipitación secuencial con ácido tricloroacético

El aislamiento del GMP del SDQ, de las MCs y de la LP se realizó mediante la precipitación secuencial de las proteínas lácteas con TCA. Por triplicado, a 50 mL de cada MC se adicionaron 25 mL de una disolución de TCA al 24 % (m/v), se agitó durante 2 min, y se dejó en reposo 1 h. La fracción insoluble (PP₁), se separó por filtración y se tomó una alícuota de 30 mL del filtrado y se le adicionaron 8 mL de una disolución de TCA al 50 % (m/v). Las

muestras fueron almacenadas a 4 °C por 20 h. La fracción insoluble (**PP₂**) se separó por centrifugación (7000 rpm, 10 min, 4 °C), y se lavó dos veces con 10 mL de etanol:éter dietílico (1:1), el disolvente se eliminó por evaporación, y los sólidos se resuspendieron en disolución amortiguadora de Tris-HCl (0.05 M, pH 6.9) (Galindo-Amaya *et al.*, 2006).

2.6 Aislamiento del glicomacropéptido del suero dulce de quesería por tratamiento térmico

2.6.1 Efecto del pH durante el tratamiento térmico

Las proteínas de suero (30 mL) se precipitaron térmicamente (90 °C, 1 h) a cuatro diferentes valores de pH: 4.5, 5.5, 6.1 y 6.9. La fracción insoluble se separó por centrifugación (5000 rpm, 30 min, 4 °C), se cuantificó la proteína soluble en el sobrenadante por el método de Lowry, se obtuvo y se caracterizó el perfil proteínico por SDS-PAGE.

2.6.2 Efecto del tiempo y el cloruro de calcio durante el tratamiento térmico

Para evaluar el efecto del tiempo en la precipitación de las proteínas del suero (**PS**) durante la purificación del GMP, el SDQ y el SA se dializaron con una disolución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 6.0, durante 22 h a 4 °C. Se determinó el contenido de carbohidratos totales (Dubois *et al.*, 1956), utilizando glucosa como estándar de calibración (Anexo C), a las muestras de suero antes y después de dializar. Se ajustó el pH a 6.0 con NaOH 1M al SDQ dializado (SDQ_D) y se adicionó CaCl₂ al 0.15 % (m/v). Cuatro muestras de 30 mL de SDQ_D se mantuvieron a 90 °C durante 0.5, 1.0, 1.5, y 2.0 h, en un baño de agua en ebullición. La fracción insoluble se separó por centrifugación (5000 rpm, 30 min, 4 °C), se cuantificó la proteína soluble, se obtuvo el perfil proteínico y se realizaron diferentes pruebas químicas para su caracterización.

2.6.3 Pruebas químicas para identificar el glicomacropéptido

SDQ_D, S_{AD} y los sobrenadantes obtenidos por tratamiento térmico, se analizaron mediante la aplicación de tres pruebas químicas: 1) prueba de molibdato-vanadato; 2) prueba de azufre y

3) reacción xantoproteínica para la detección de grupos fosfato, azufre y anillos aromáticos de acuerdo a la metodología de Rojas y Torres (2013).

2.7 Optimización de la metodología

2.7.1 Optimización del aislamiento de glicomacropéptido por precipitación secuencial con ácido tricloroacético

Evaluar el efecto de la separación isoelectrica de la caseína seguido de la precipitación secuencial de las proteínas del suero con ácido tricloroacético siguiendo las metodologías descritas anteriormente en los apartados 2.4.3 y 2.5.

2.7.2 Combinación del tratamiento térmico con ultrafiltración

Se tomaron 30 mL (pH 3.5) de la FNC de cada muestra y se mantuvieron a 90 °C durante 1 h. Las muestras se enfriaron rápidamente en hielo y se les adicionó 30 mL de alcohol etílico frío. Después de una hora el material insoluble se separó por centrifugación (7000 rpm, 10 min, 4 °C). La fracción soluble se ultrafiltró (*Amicon® Ultra-15*, MWCO 10 000, *Millipore*) y el retenido se caracterizó por SDS-PAGE.

2.8 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

La separación electroforética en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio de las proteínas y péptidos de las diferentes fracciones obtenidas (CN, FNC, PP₁ y PP₂), de la LP, SDQ y de los sobrenadantes obtenidos a partir de la purificación del GMP, se realizaron de acuerdo a Laemmli (1970), en una cámara Mini-PROTEAN® (*Tetra Cell System*, *Bio-Rad Laboratories*) aplicando una diferencia de potencial (100 V). La visualización de las bandas de proteínas se realizó mediante tinción con azul de *Coomassie*. Caseína calidad *Hammarsten (CAS)* (*Research Organics*) y concentrado de proteína de suero (**WPC**) (*LACPRODAN 80*, *Latin Foods International S.A. de C.V.*) se utilizaron como referencia de la separación. Se realizó la adquisición de las imágenes, la estimación de los pesos moleculares y el análisis densitométrico empleando un fotodocumentador (*Gel Doc™ XR+ ImagingSystem*, *software ImageLab™ ver 3.0*, *Bio-Rad*).

2.9 Análisis estadístico

Se realizó la comparación de las medias experimentales de los resultados del análisis fisicoquímico por ultrasonido y de la cuantificación de proteína soluble, mediante la prueba de *t* de *student*, a un nivel de confianza del 95 %.

3.0 Resultados y discusión

3.1 Análisis fisicoquímico por ultrasonido de las mezclas compuestas por ultrasonido

El análisis por ultrasonido no es un método oficial para el análisis fisicoquímico de la leche, pero es empleado como un método rápido que permite obtener el contenido porcentual de grasa, proteína, sólidos no grasos (SNG), agua agregada, así como densidad (g/L) y punto crioscópico en grados Horvet (°H).

Al preparar las mezclas, la de mayor proporción de suero dulce de quesería 60:40 (LP:SDQ) coaguló a temperatura ambiente, por lo que se decidió repetir el experimento aplicando un tratamiento térmico al suero dulce de quesería con el fin de disminuir la actividad enzimática residual del cuajo, sin desnaturalizar a las proteínas del suero, y ajustando el intervalo de la composición de las mezclas: 95:5, 90:10, 85:15, 80:20 y 70:30 (v/v) (LP:SDQ).

Para la elaboración de las mezclas, se partió de una muestra de LP, que cumplió con las especificaciones de la normatividad (NOM-155-SCFI-2012). El contenido de grasa en la leche fue del 3.55 % (Fig. 3.1A), 4 % más que el mínimo declarado en el etiquetado cuantitativo de los ingredientes, y fue el único que correspondió prácticamente al valor esperado por efecto de la dilución de la leche: 3.37 % (95:5), 3.20 % (90:10), 3.02 % (85:15), 2.84 % (80:20) y 2.48 % (70:30). Se encontró diferencia estadísticamente significativa en el contenido de grasa en todas las muestras, aplicando la prueba de *t* de *student*, a un nivel de confianza del 95 %.

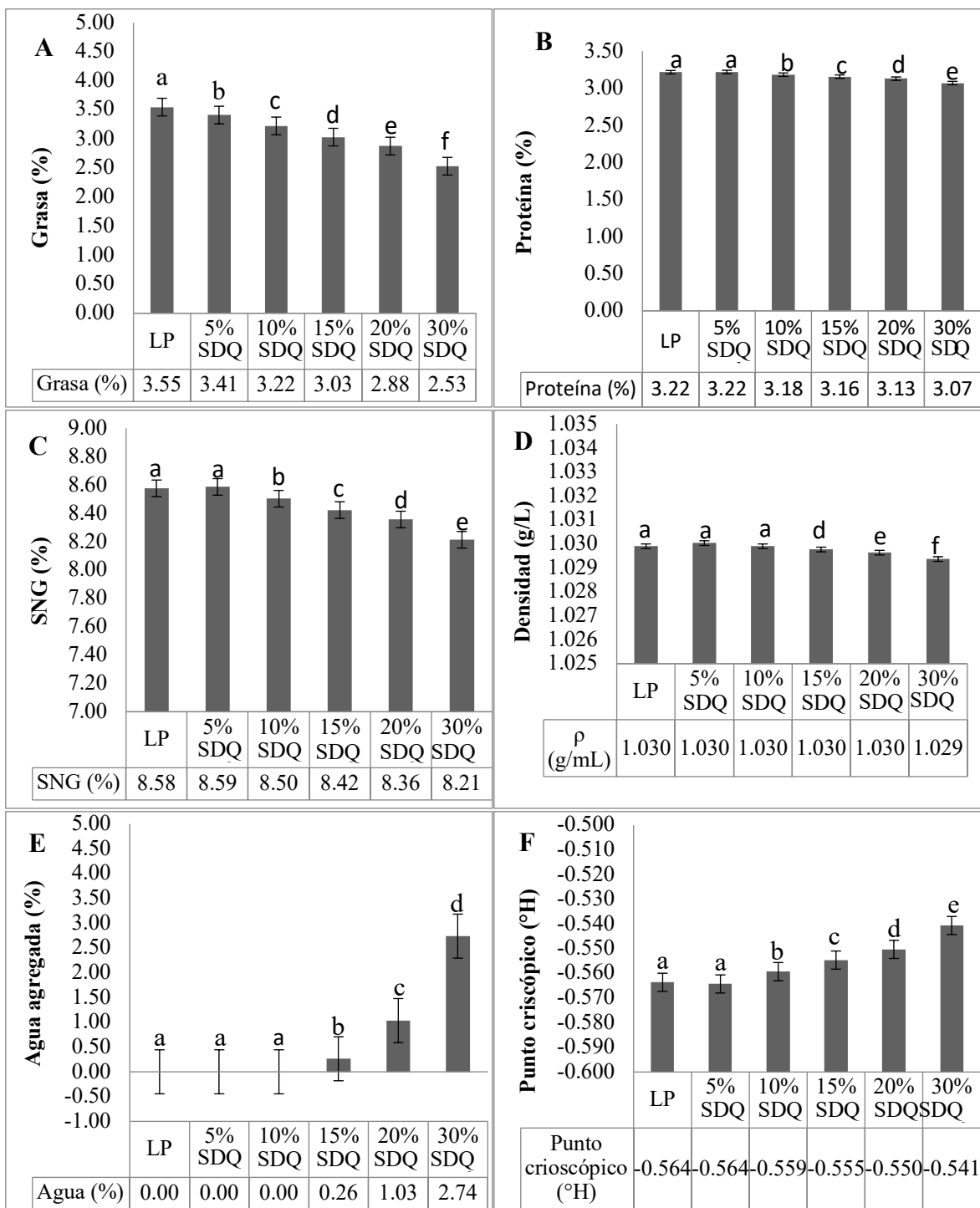


Figura 3.1. Análisis fisicoquímico de la leche pasteurizada y de las mezclas de leche entera pasteurizada con suero dulce de quesería: 95:5, 90:10, 85:15, 80:20 y 70:30 (v/v) (LP:SDQ), determinados por ultrasonido (*LactiCheck™*). Valores promedio de tres réplicas independientes. Letras iguales no presentan diferencia significativa (*t* de *student*) ($p=0.05$). Abreviaturas: LP: leche pasteurizada; SDQ: suero dulce de quesería; SNG: sólidos no grasos; ρ : densidad; °H: grados Horvet.

Los valores promedio del contenido de proteína (Fig. 3.1B) y SNG (Fig. 3.1C) disminuyeron conforme las mezclas se enriquecieron con SDQ, pero la reducción correspondió solo a un 4.65 % y 4.31 %, en la muestra con 70 % de leche, respectivamente. Lo anterior es debido a que el SDQ aporta a cada mezcla, proteínas y otros SNG (lactosa y minerales), pero no contiene grasa, y a diferencia del valor obtenido de cada parámetro de las mezclas de leche con agua, en donde es claro el efecto de dilución en todos los demás componentes (Anexo B). El contenido de proteína en la LP fue de 3.2 %, 4 % más que el mínimo declarado en la información nutrimental. El valor obtenido en la mezcla 90:10 fue significativamente diferente al valor de la LP y de la mezcla 95:5 (Fig. 3.1B). De igual forma se encontró diferencia estadísticamente significativa en el contenido de SNG hasta un nivel de adición del SDQ del 10% (Fig. 3.1C).

La densidad (Fig. 1D) es un indicador tanto del aguado como de un contenido superior de grasa en leche. En este estudio no se encontró diferencia significativa en este parámetro hasta un nivel de adición del SDQ del 30 % (1.029 g/L) (Fig. 3.1D). Se detectó 0.26 %, 1.03 % y 2.74 % de agua agregada (Fig. 3.1E) a niveles de adición de SDQ del 15 %, 20 % y 30 %, respectivamente. Los resultados del análisis fisicoquímico son diferentes de los valores experimentales obtenidos de la dilución de leche con agua debido a que el contenido de SNG del SDQ enmascara el efecto de dilución. La respuesta es lineal para todos los parámetros evaluados y corresponden prácticamente al valor calculado por el efecto de dilución (Tabla B.1 del Anexo B). Al comparar los resultados fisicoquímicos obtenidos por ultrasonido, de la dilución de la leche con SDQ y con agua, se encontró que el SDQ puede ser adicionado hasta un 15 % sin ser detectado mientras que el aguado de la leche se detectó a un nivel del 10 % de adición.

Todos los parámetros fisicoquímicos, excepto el contenido de proteína, de la mezcla 70:30 están fuera de especificación, el valor del punto crioscópico aumentó de -0.564 °H en la LP a -0.541 °H (Fig. 3.1F) y no coaguló, a simple vista, por lo que el tratamiento térmico que se aplicó al suero dulce (a 60 °C por 40 s) fue suficiente para disminuir la actividad residual del cuajo, lo que se pudo comprobar con el perfil proteínico y como se explica más adelante.

Por lo anterior, se estableció el límite de detección de suero dulce de quesería en leche por ultrasonido, a un nivel de adición del 15 %, debido a que el equipo detectó agua agregada en la mezcla 85:15 (v/v) LP:SDQ.

3.2 Cuantificación de proteína soluble de las mezclas compuestas

Los valores promedio de proteína soluble determinados por ultrasonido y espectrofotometría se muestran en la Tabla 3.1. El contenido de proteína teórico fue calculado considerando el contenido de proteína mínimo declarado en el etiquetado cuantitativo de los ingredientes de la LP y el valor promedio del suero dulce de quesería. La concentración de proteína soluble disminuyó conforme se enriqueció el SDQ en las muestras, que es lo esperado. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los valores promedio de concentración de proteína obtenido por ambos métodos, a excepción del valor obtenido para la mezcla 80:20 con respecto amortiguador de muestra y en la mezcla 70:30, para ambos amortiguadores.

Por su composición química, la disolución amortiguadora de muestra presenta un poder disolvente mayor que la segunda, que es selectiva para la extracción de las proteínas lácteas (Scholl *et al.*, 2014). Sin embargo, mediante el estadístico *t*, al comparar las medias experimentales, a un nivel de significancia del 1 %, no se encontró diferencia significativa entre ambas disoluciones (Tabla 3.1), para la disolución amortiguadora de muestra y para la disolución amortiguadora de solubilidad, respectivamente. Lo anterior indicaría que la extracción de las proteínas fue cuantitativa además de que a simple vista todas las muestras fueron solubles.

Tabla 3.1. Concentración promedio de proteína en leche pasteurizada y en las mezclas de leche y suero dulce de quesería determinada por espectrofotometría y ultrasonido.

muestra (LP:SDQ)	concentración de proteína (%)			
	teórico	amortiguador 1	amortiguador 2	ultrasonido (<i>LactiCheck™</i>)
100:0	3.1	3.44	3.25	3.22
95:5	3.0	3.20	3.27	3.22
90:10	2.9	3.10	3.20	3.18
85:15	2.7	2.98	3.06	3.16
80:20	2.6	3.05	2.93	3.13
70:30	2.4	2.54	2.58	3.07

1: Disolución amortiguadora de solubilidad. 2: Disolución amortiguadora de muestra. CV \leq 8 %

3.3 Perfil electroforético de las mezclas compuestas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

Se obtuvo el perfil electroforético de la fracción proteínica de las MCs bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras (Fig. 3.2). Se identificaron las bandas correspondientes a las CNs y a las PS, por comparación con las muestras de referencia y que, de manera natural, se encuentran en una relación 80:20. Las proteínas del suero más abundantes, se detectaron en la parte inferior del gel: β -LG y α -LA, de 17 kDa y 13 kDa, respectivamente. Al centro migran las CNs, de mayor a menor peso molecular se identificaron a las caseínas α , las cuales no se resuelven y aparecen como una banda ancha (α s-CN, 38 kDa), seguida de β -CN (30 kDa) y por último κ -CN de 28 kDa. El peso molecular calculado de las CNs fue superior al teórico, por la diferente capacidad de unión de las caseínas al dodecil sulfato de sodio (SDS) (Creamer y Richardson, 1984) debido a los residuos de serinas fosforiladas, residuos de treonina glicosilados en κ -CN, al alto contenido de prolina y por zonas de hidrofobicidad en β -CN. Las proteínas del suero menos abundantes, pero de mayor peso molecular se detectaron en la parte superior del gel: lactoferrina (LF), albúmina sérica bovina (BSA) e inmunoglobulinas (Igs). A simple vista se detectó una menor intensidad de las bandas correspondientes a las CNs debido al efecto de dilución de la leche con SDQ. La abundancia

relativa de las principales fracciones proteínicas (CN:PS) correspondientes a cada muestra fueron: 74.9:25.1 en la LP (Fig. 3.2B, carril 1); 75.7:24.3 en la mezcla 95:5 (carril 2); 76.8:23.2 en la mezcla 90:10 (carril 3); 67.9:32.1 en la mezcla 85:15 (carril 4); 67.2:32.8 en la mezcla 80:20 (carril 5) y 66.5:33.5 en la mezcla 70:30 (carril 6).

Aunque al preparar las mezclas sólo se percibió la formación de la cuajada en la mezcla 60:40, la detección de una banda entre β -LG y α -LA, que no está presente en la LP (Fig. 3.2A, carril 1), y que aumentó de intensidad conforme se incrementó el nivel de adición de SDQ, sugiere la presencia de para- κ -CN, ya que a mayor adición de SDQ hay mayor actividad enzimática. Al disminuir la actividad enzimática por medio de la aplicación de calor y al repetir el experimento apenas se detectó este macropéptido en las mezclas: 80:20 y 70:30 (Fig. 3.2B, carril 5 y 6, respectivamente) y se detectó κ -CN.

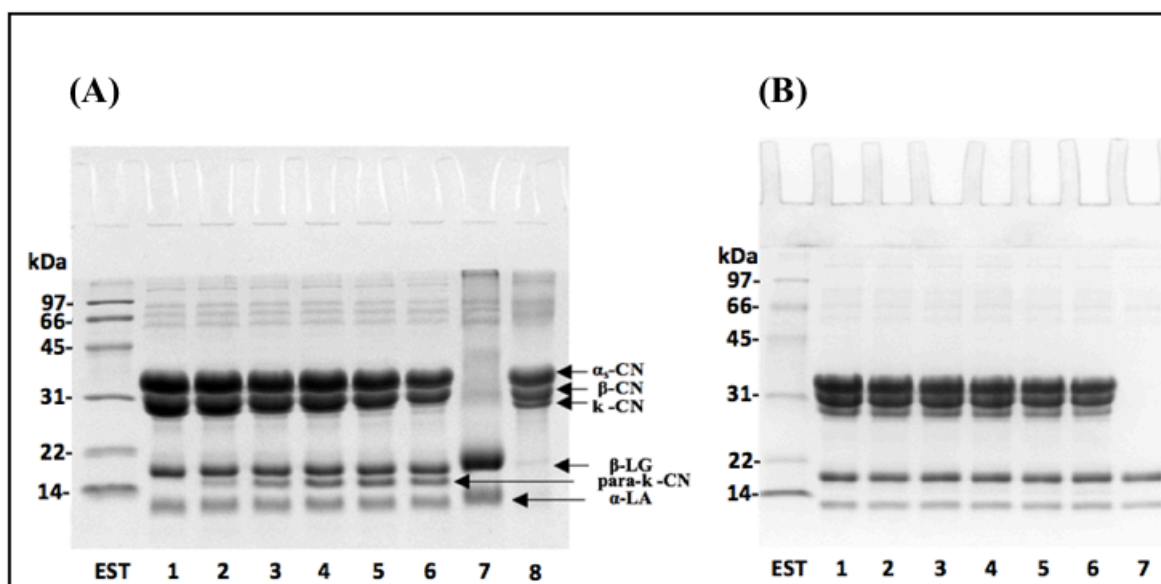


Figura 3.2. Perfiles electroforéticos de las mezclas de leche pasteurizada con suero dulce de quesería. (SDS-PAGE, 12.5 % T). A. Mezclas de leche pasteurizada adicionada de suero dulce de quesería: 97:3 (carril 2); 95:5 (carril 3); 90:10 (carril 4); 80:20 (carril 5) y 60:40 (carril 6); concentrado de proteína de suero (LACPRODAN 80) (carril 7) y caseína calidad *Hammarsten* (carril 8). B. Mezclas de leche pasteurizada adicionada de suero dulce de quesería: 95:5 (carril 2); 90:10 (carril 3); 85:15 (carril 4); 80:20 (carril 5) y 70:30 (carril 6); SDQ (carril 7). LP (carril 1 en ambos geles). Estándares de peso molecular (EST). Tinción con azul de *Coomassie* R-250. *Gel DocTM XR+ ImagingSystem* (Bio Rad).

3.4 Precipitación isoelectrica de las caseínas

Las CNs se separaron de las proteínas del suero dulce empleando la mezcla de ácido acético (1.75 M) y acetato de sodio (1.0 M). En todas las muestras se alcanzó el pH de 4.6 en la FNC. En esta fracción se detectaron las PS y CNs residuales, pero también se detectó una banda entre κ -CN y β -LG que puede corresponder al GMP (resultado que no se muestra). Las proteínas lácteas son insolubles en TCA al 12 %, sin tener efecto sobre los péptidos y nitrógeno no proteínico (ISO 17997-1, 2004). Varios autores coinciden en que el peso molecular del GMP es de 21 kDa por la formación de trímeros (Farías *et al.*, 2010; Galindo-Amaya *et al.*, 2006), por lo que es posible la autoagregación del GMP a valores menores de pH 6.5.

3.5 Aislamiento del glicomacropéptido a partir del suero dulce de quesería por precipitación secuencial con ácido tricloroacético

Al analizar el primer precipitado obtenido a una concentración final de TCA al 8 % (PP₁) se detectaron únicamente las principales proteínas del suero por electroforesis en gel (Figura 3.3, carriles 7-9). El GMP (PP₂) se aisló de la fracción soluble por una posterior precipitación con TCA hasta alcanzar una concentración final del 16 % con un peso estimado de 28 kDa (Figura 3.3, carriles 4-6). La banda se tiñó de un color diferente a las proteínas, lo que sugiere la presencia de carbohidratos en la molécula, debido a que la tinción con azul de *Coomassie* es menos sensible con proteínas glicosiladas y fosforiladas, y como resultado se obtiene una tinción débil (Møller y Poulsen, 2009). Se detectó el glicomacropéptido como un agregado de aproximadamente 28 kDa a partir de leche adicionada con 5 % de suero dulce de quesería mediante SDS-PAGE, estableciendo este como el límite de detección por precipitación secuencial con TCA.

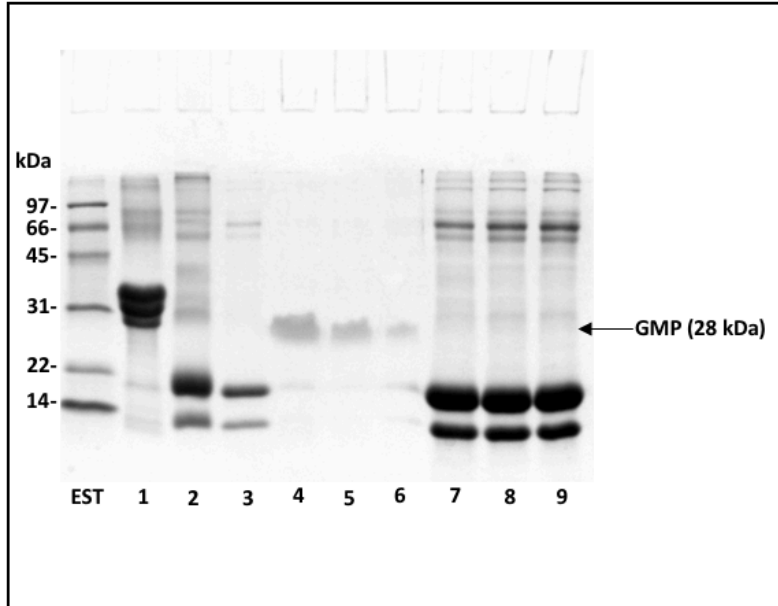


Figura 3.3. Aislamiento del glicomacropéptido del suero dulce de quesería. (SDS-PAGE, 12.5 % T). Caseína calidad *Hammarsten* (carril 1); concentrado de proteína de suero (LACPRODAN 80) (carril 2); SDQ (carril 3); GMP (PP₂) (carriles 4-6); PP₁ (carriles 7-9). Estándar de peso molecular (EST). Tinción con azul de *Coomassie* R-250. *Gel DocTM XR+ ImagingSystem* (Bio-Rad).

El fraccionamiento de las proteínas de la LP y de cada MC se analizó por SDS-PAGE. A manera de ejemplo, sólo se muestra el análisis comparativo entre la LP y la mezcla 80:20 (LP:SDQ) (Figura 3.4). En los carriles 2 y 8 se visualizan las bandas correspondientes a las CNs, sin embargo, también se detectaron las bandas de las PS, más abundantes en la mezcla debido a que el tratamiento térmico que se aplicó al SDQ, desnaturalizó a las proteínas provocando que coprecipitaran con las CNs, al formar complejos entre, α -LA – β -LG, α -LA – κ -CN y β -LG – κ -CN, conocidos como coprecipitados de proteínas lácteas (Jovanovic *et al.*, 2007). En la FNC se detectaron principalmente las proteínas del suero de alto y bajo peso molecular (Figura 3.4, carriles 3 y 9). La desproteinización de la LP y de la mezcla 80:20 (LP:SDQ) con TCA al 8 % (m/v) no fue eficiente ya que se detectó β -LG (carriles 5 y 11). La banda con un peso molecular de aproximadamente 28 kDa (PP₂, carril 11) en la mezcla coincide con la migración del GMP aislado del SDQ (carril 6 y 12) y no está presente en la leche (PP₂, carril 5).

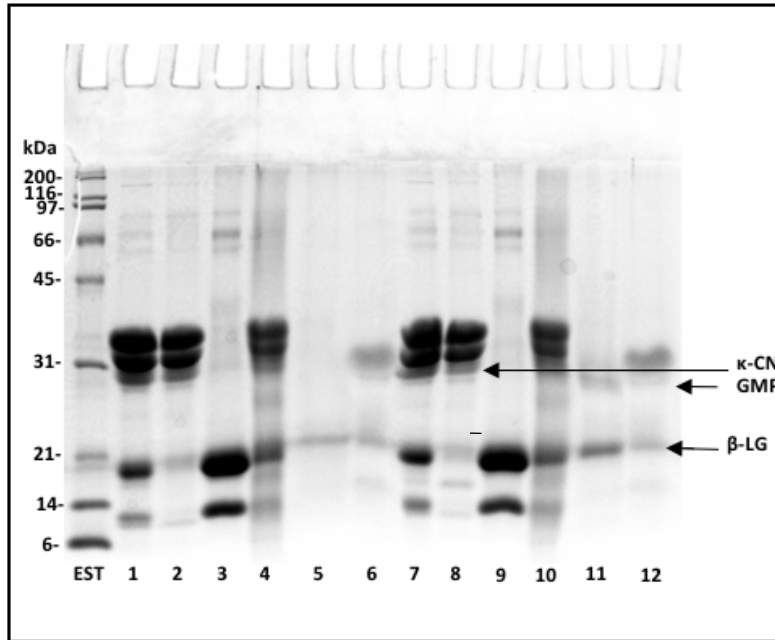


Figura 3.4. Perfiles proteínicos del fraccionamiento de la LP y mezcla de leche adicionada de suero dulce de quesería 80:20. (SDS-PAGE, 12.5 % T). LP (carril 1); CN (carril 2); FNC (carril 3); PP₁ (carril 4); PP₂ (carril 5); GMP aislado del SDQ (carril 6 y 12); MC 80:20 (carril 7); CN (carril 8); FNC (carril 9); PP₁ (carril 10); PP₂ (carril 11). Estándares de peso molecular (EST). Tinción con azul de *Coomassie* R-250. *Gel DocTM XR+* *ImagingSystem* (Bio-Rad).

3.6 Aislamiento del glicomacropéptido a partir del suero dulce de quesería por tratamiento térmico

3.6.1 Efecto del pH

En el aislamiento del GMP, las proteínas de suero se precipitaron térmicamente (90 °C, 1 h) a cuatro diferentes valores de pH: 4.5, 5.5, 6.1 y 6.9, se determinó el contenido de proteína soluble en los sobrenadantes obtenidos y mediante el análisis estadístico *t*, al comparar las medias experimentales no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las muestras excepto la de pH 6.9 los resultados se muestran en la Fig. 3.5A. Aunque basta acidificar ligeramente el SDQ para favorecer la precipitación de las proteínas del suero, sólo se logró precipitar aproximadamente el 50 % de las PS del SDQ.

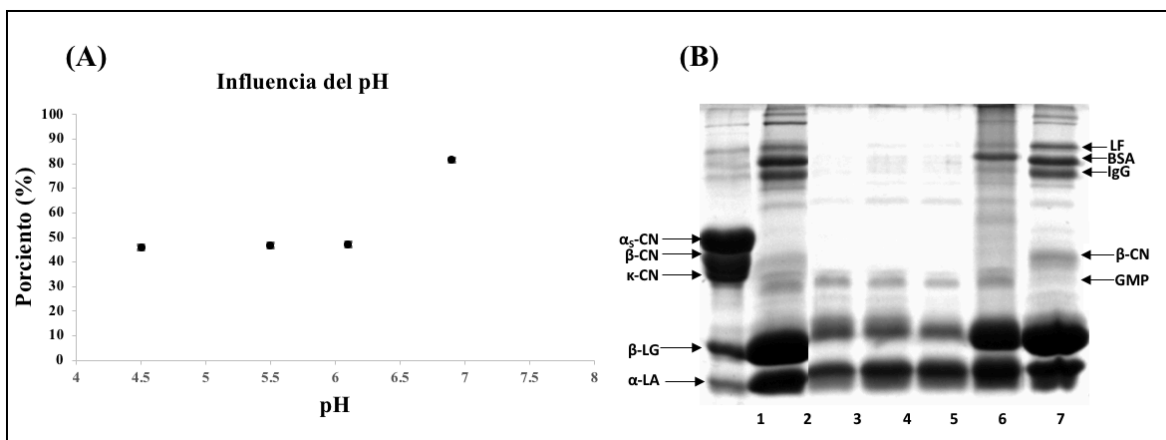


Figura 3.5. Efecto del pH en el tratamiento térmico aplicado al suero dulce de quesería. (A): Valores relativos del contenido de proteína en los sobrenadantes (SN) en función del pH (el 100 % corresponde al contenido de proteína en el suero dulce de quesería, SDQ); (B): Perfil proteínico de SDQ tratado térmicamente. (SDS-PAGE, 12.5 % T). LP (carril 1); SDQ (carril 2); SN pH: 4.5 (carril 3); 5.5 (carril 4); 6.1 (carril 5); 6.9 (carril 6); SA_D (carril 7). Tinción con azul de *Coomassie* G-250. *Gel DocTM XR+ ImagingSystem* (Bio-Rad).

Los sobrenadantes obtenidos se analizaron por SDS-PAGE y los resultados se muestran en la Figura 3.5B. Las bandas de β -LG y α -LA se observan en todos los carriles, son abundantes y su ensanchamiento indica la lactosilación, debido a la interacción de los residuos de lisina con la lactosa presente en el medio por medio de la reacción de Maillard, siendo esta una de las alteraciones más importante que sufren las proteínas del suero a causa del tratamiento térmico (Losito *et al.*, 2007); las PS de menor abundancia (LF, BSA e Igs) se separaron completamente con el tratamiento térmico (carriles 3-5) y sólo pueden observarse en la LP (carril 1), el SDQ (carril 2) y en el SA_D (carril 7) en la parte superior del gel. Tanto en el SDQ (carril 2) como en los sobrenadantes a los diferentes pH's (carriles 3, 4, 5 y 6) se observa una banda debajo de κ -CN que corresponde al GMP. El SA dializado (SA_D) (carril 7), no presenta la banda del GMP, pero sí otra banda que corresponde probablemente a β -CN, posiblemente se arrastró una fracción de caseínas en el SA_D durante la separación por filtración.

3.6.2 Efecto del tiempo y el cloruro de calcio

Se encontró diferencia estadísticamente significativa en el contenido de proteína cuantificado en el sobrenadante a las 0.5 h, por lo que fue necesario mantener el SDQ a 90 °C al menos una hora, con lo que se logró precipitar más del 60 % de las proteínas del suero (Fig. 3.6A).

El análisis por SDS-PAGE (Figura 3.6B) muestra un comparativo entre los sobrenadantes a diferentes pH (carriles 2-5) y los obtenidos por la aplicación del tratamiento térmico a diferentes tiempos partiendo del SDQ dializado (carriles 6-9).

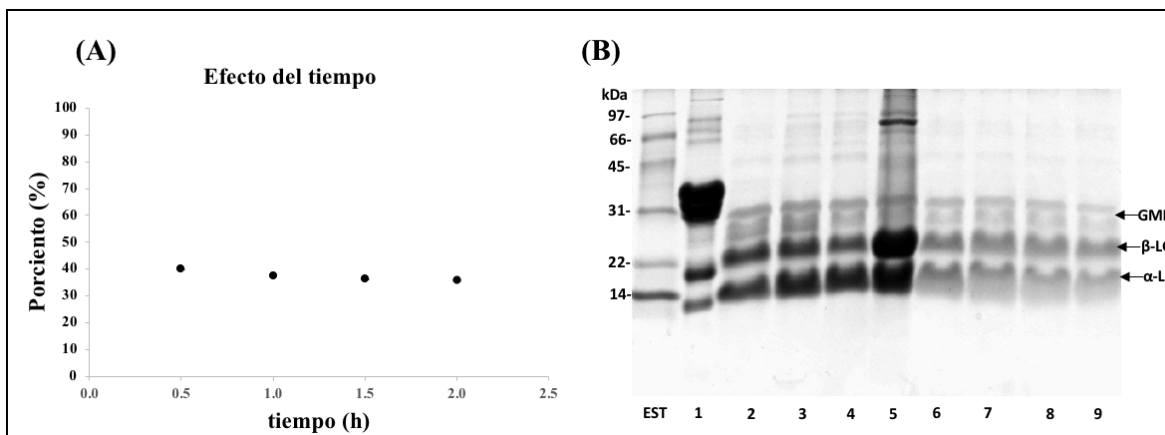


Figura 3.6. Efecto del tiempo en el tratamiento térmico aplicado al suero dulce de quesería. (A): Valores relativos del contenido de proteína en los sobrenadantes en función del tiempo. El 100 % corresponde al contenido de proteína en el suero dulce de quesería dializado (SDQ_D); (B): Efecto del pH y del tiempo en los perfiles proteínico de SDQ_D tratado térmicamente. SDS-PAGE, 12.5 % T. LP (carril 1); SN pH: 4.5 (carril 2); 5.5 (carril 3); 6.1 (carril 4); 6.9 (carril 5); SN tiempo: 0.5 h (carril 6); 1.0 h (carril 7); 1.5 h (carril 8); 2.0 h (carril 9). Estándares de peso molecular (EST). Tinción con azul de *Coomassie* G-250. *Gel DocTM XR+ ImagingSystem* (Bio-Rad).

En todas las muestras se detectaron dos bandas de 33 kDa y 29 kDa que podrían corresponder a agregados del GMP. Es evidente la disminución de la intensidad de las bandas de las proteínas del suero cuando se parte de suero dulce dializado (se redujo en 82% el contenido de lactosa). Los cambios irreversibles en la estructura de las proteínas pueden ocurrir a temperaturas superiores a las de la desnaturalización y están influenciados por el pH, la fuerza iónica y la concentración de proteína (Ersson *et al.*, 2012). El incremento de los iones de calcio contribuye a la agregación de las proteínas a través de la formación de enlaces iónicos, al promover la interacción entre los residuos de aminoácidos ácidos se reduce la repulsión electrostática entre éstos disminuyendo el tamaño aparente de los agregados formados (Britten y Giroux, 2001). El efecto de la adición de CaCl₂ al suero para promover la separación de las proteínas del suero no fue evidente debido a la interacción de las proteínas del suero con la lactosa.

3.6.3 Pruebas químicas

A fin de detectar cualitativamente la presencia de ciertos grupos químicos en la estructura del GMP, se evaluó el cambio en la intensidad del color generado en cada ensayo, a cada uno de los sobrenadantes obtenidos a partir del SDQ dializado y tratado térmicamente a diferentes tiempos y a ambos sueros dializados (SDQ_D y al SA_D). Los resultados se muestran en la Figura 3.7.

La prueba de molibdato-vanadato se basa en la formación de un heteropoliácido con el reactivo e indica la presencia de fosfatos al desarrollar un color amarillo. Al analizar las muestras la intensidad de color disminuyó conforme aumento el tiempo de exposición al tratamiento térmico (Fig. 3.7C).

Los aminoácidos azufrados se reconocen por la formación de precipitados de sulfuro de plomo de color gris oscuro o negro que se forman cuando reacciona con acetato de plomo en medio alcalino. Se visualiza una disminución importante del color en los sobrenadantes analizados conforme aumentó el tiempo de exposición al tratamiento térmico (Fig. 3.7D).

Por último, la reacción xantoprotéinica indica la presencia de grupos aromáticos, que reaccionan con el ácido nítrico concentrado dando lugar a la nitración del anillo aromático, formándose nitroderivados de color amarillo. La prueba se considera positiva al desarrollar color amarillo, y en este caso fue negativa para todos los sobrenadantes analizados (Fig. 3.7E), confirmando la disminución importante de las proteínas de suero, pues el GMP contiene un único grupo sulfuro y ningún grupo aromático en su estructura.

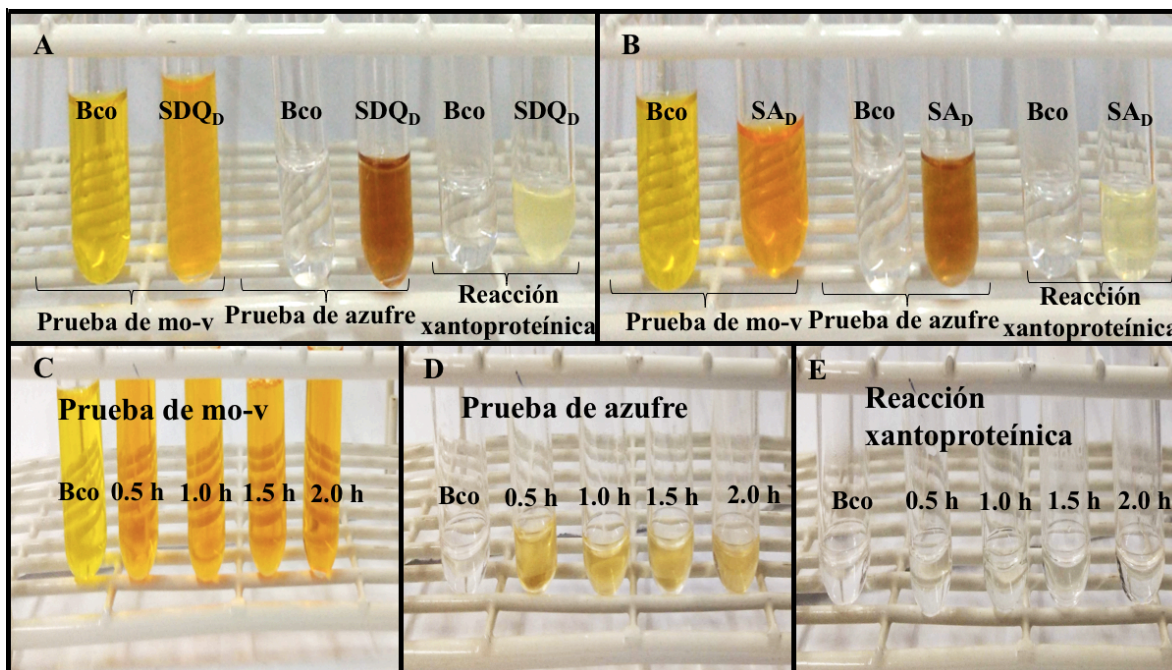


Figura 3.7. Caracterización química del SDQ_D, SA_D y los sobrenadantes a diferentes tiempos de análisis. A: Comparativo entre SDQ_D y blanco; B: Comparativo entre SA_D y blanco; C: Prueba de mo-v aplicada a los sobrenadantes y al blanco de reactivos; D: Prueba de azufre aplicada a los sobrenadantes y al blanco de reactivos; E: Reacción xantoproteínica aplicada a los sobrenadantes y al blanco de reactivos.

Abreviaturas: Bco: blanco de reactivos; SDQ_D: Suero dulce de quesería dializado, SA_D: Suero ácido dializado; mo-v: molibdato-vanadato.

3.7 Optimización de la metodología

Debido a que el suero dulce de quesería en leche se detectó a partir de un nivel de adición del 15 % por análisis fisicoquímico por ultrasonido, se estudió el intervalo de análisis de las mezclas en las siguientes proporciones: 95:5; 90:10 y 85:15. Se prepararon cuatro réplicas independientes de cada mezcla, y cada réplica se analizó por ultrasonido. Los resultados obtenidos del análisis fisicoquímico se muestran en la Figura 3.8.

De igual forma, por efecto de dilución, los valores promedio de grasa (Fig. 3.8A), proteína (Fig. 3.8B) y SNG (Fig. 3.8C) disminuyeron, la densidad (Fig. 3.8D) se mantuvo constante, mientras que, el agua agregada (Fig. 3.8E) y el punto crioscópico (Fig. 3.8F) aumentaron conforme la leche se enriqueció con SDQ.

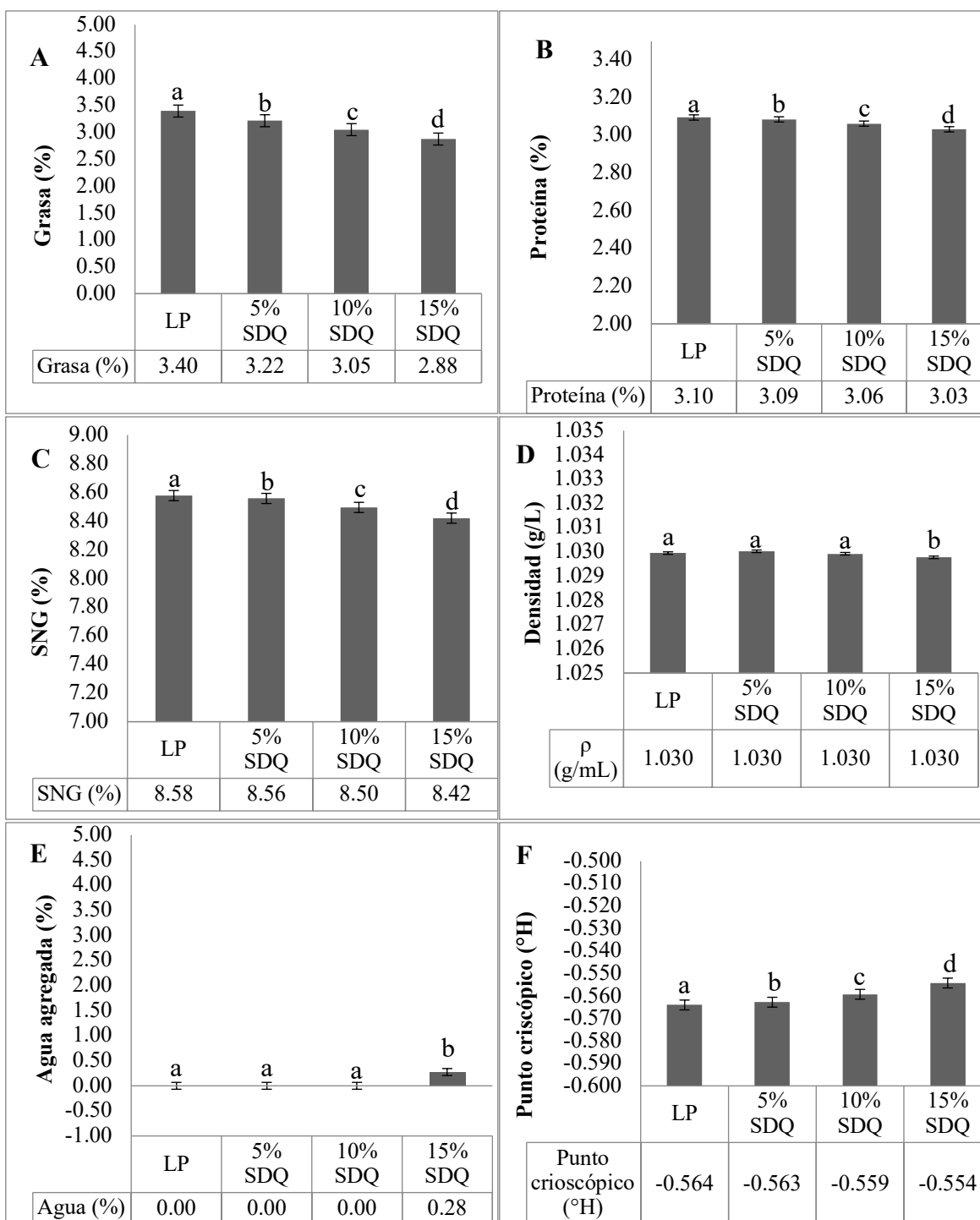


Figura 3.8. Análisis fisicoquímico de la leche entera pasteurizada y de las mezclas de leche entera pasteurizada con suero dulce de quesería: 95:5, 90:10 y 85:15 (LP:SDQ), determinados por ultrasonido (*LactiCheck™*). Valores promedio de cuatro réplicas independientes. Letras iguales no presentan diferencia significativa (*t* de *student*) ($p = 0.05$). Abreviaturas: LP: leche pasteurizada; SDQ: suero dulce de quesería; SNG: sólidos no grasos; ρ : densidad; °H: grados Horvet.

Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre todas las muestras para los parámetros de grasa, proteína, SNG y punto crioscópico. Mientras que, para la densidad y el nivel de agua agregada, la única muestra estadísticamente diferente fue la mezcla 85:15, confirmando el límite de detección del 15 % de adición de suero dulce de quesería. El contenido de grasa de la muestra de LP fue de 3.4 %, que corresponde al etiquetado cuantitativo de los ingredientes, y el calculado en las mezclas de: 3.23 (95:5); 3.06 (90:10); 2.89 (90:10), prácticamente igual al contenido de grasa obtenido por ultrasonido (Fig. 3.8A).

A partir de las 4 réplicas independientes de cada mezcla se preparó una mezcla compuesta y se obtuvo el perfil electroforético de las MCs y la LP bajo condiciones reductoras, en la Figura 3.9 se observa un comparativo de la LP, seguida de las mezclas de menor a mayor concentración de suero. Se apreciaron las bandas de las CNs (α -CN, 33 kDa; β -CN, 28 kDa y κ -CN, 27 kDa) y de las PS (β -LG, 15 kDa y α -LA, 12 kDa). Debido al efecto de dilución de la leche se espera una menor intensidad de las bandas correspondientes a las CNs y, por el contrario, para las PS un aumento en la intensidad de sus bandas, pero esto no fue notorio en el gel (carriles 2-5). La disminución de la banda correspondiente a κ -CN se debe a que fue hidrolizada por la quimosina que se comprobó por la presencia de para- κ -CN (14 kDa) en la mezcla 85:15 y en la mezcla 95:5 (carriles 3-5). En este caso el SDQ no recibió un tratamiento térmico para evitar la formación de agregados entre las PS y las CN y por cuestiones prácticas ya que se reduce el tiempo de ensayo. Además, se trabajó a menor temperatura para reducir la actividad enzimática residual del cuajo.

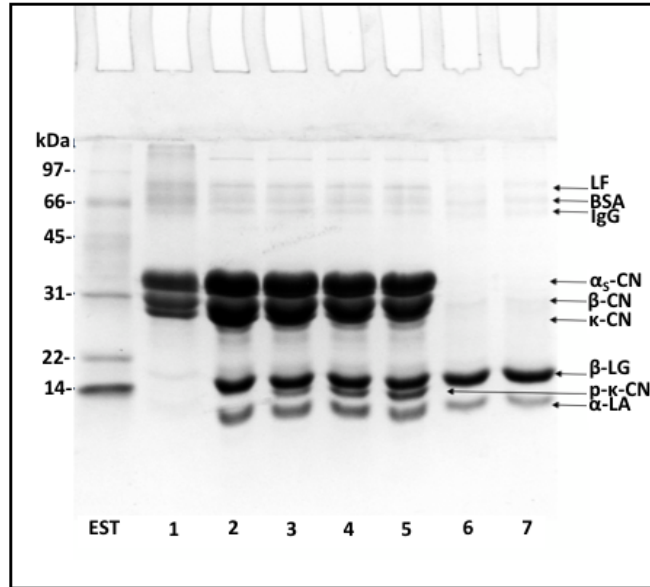


Figura 3.9. Perfiles electroforéticos de mezcla de leche pasteurizada y suero dulce de quesería. SDS-PAGE, 12.5 % T. Estándares de peso molecular (EST); caseína calidad *Hammarsten* (carril 1); LP (carril 2); mezclas de leche pasteurizada adicionada de suero dulce de quesería: 95:5 (carril 3); 90:10 (carril 4); 85:15 (carril 5); SDQ (carril 6); SA (carril 7). Tinción con azul de *Coomassie R-250*. *Gel Doc™ XR+ ImagingSystem (Bio Rad)*.

Cada MC se trató con la metodología de aislamiento del GMP por precipitación secuencial con TCA. Se hicieron dos ensayos modificando la concentración de TCA (8 % y 12 %) para la desproteización de las muestras y manteniendo la concentración de TCA para precipitar al GMP (PP2). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.10. Se obtuvo una mayor cantidad del GMP al desproteizar las muestras con una concentración de TCA al 8 % (m/v) (Fig. 3.10A) con respecto al ensayo con TCA al 12 %, aunque se encontró que bajas concentraciones de TCA (< 8 %) no fueron suficientes para precipitar a todas las proteínas lácteas, altas concentraciones de TCA causa la precipitación de mayores cantidades del GMP debido a que la variabilidad de la composición en la fracción glicosídica es responsable de las variaciones de la solubilidad del GMP en TCA (Fukuda *et al.*, 2004).

En términos de la solubilidad del GMP en el TCA, el macropéptido soluble en TCA al 2.0 % (m/v) corresponde al GMP que incluye todas las formas glicosiladas y también las no glicosiladas (si están presentes), mientras que el macropéptido soluble en TCA al 12 % (m/v) se refiere a aquel que se encuentra totalmente glicosilado (Lieske y Konrad, 1996). Sin

embargo, no se observó la banda del GMP al precipitar con TCA al 12 % (m/v) (Fig. 3.10 B), lo que coincide con los resultados obtenidos por Yvon *et al.* (1989).

De cada mezcla compuesta se tomaron 200 mL, se precipitaron isoelectricamente las caseínas y se separaron por centrifugación (5000 rpm, 30 min, 4 °C). Se aisló el GMP del sobrenadante por precipitación secuencial con TCA al 8 % y 16 %. Se obtuvo mayor precipitado del GMP partiendo de las muestras sin caseínas (Fig. 3.10 C), con respecto a los dos ensayos anteriores, además se detectaron dos bandas adicionales: de 37 kDa y de 7 kDa. Estas bandas podrían corresponder al tetrámero y al monómero del GMP, respectivamente. En los tres geles se observa la presencia de β -LG debido a que es parcialmente soluble en TCA (Lieske y Konrad, 1996).

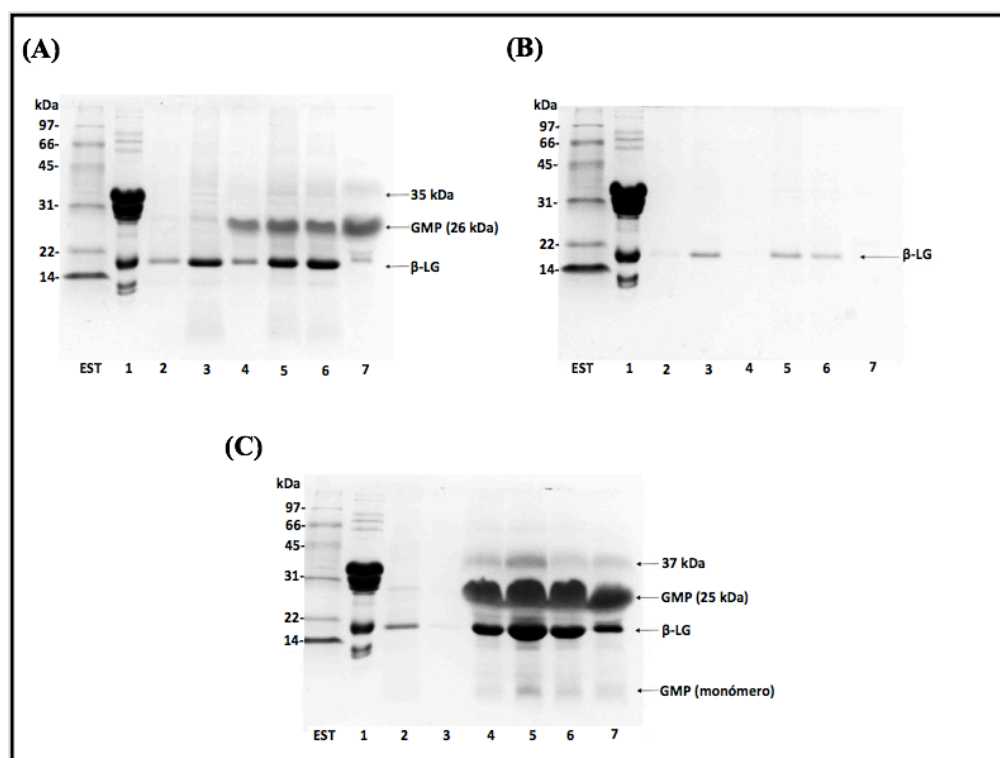


Figura 3.10. Detección del glicomacropéptido de mezclas de leche adicionada de suero dulce de quesería por precipitación secuencial con TCA. (SDS-PAGE, 12.5 % T). (A) Desproteinización al 8 % (m/v) de TCA; (B) Desproteinización al 12 % (m/v) de TCA; (C) Precipitación isoelectrica de caseínas y precipitación secuencial al 8 % y 16 % (m/v) de TCA. Para los tres geles: GMP aislado del SA (carril 2); LP (carril 3); Mezclas LP:SDQ: 95:5 (carril 4); 90:10 (carril 5); 85:15 (carril 6); SDQ (carril 7). LP (carril 1). Estándares de peso molecular (EST). Tinción con azul de *Coomassie R-250*. *Gel DocTM XR+ ImagingSystem* (*Bio-Rad*).

Por último, se estudió el efecto del tratamiento térmico para aislar el GMP, para lo cual se tomaron 30 mL (pH 3.5) de la FNC de cada mezcla compuesta y del SDQ y se mantuvieron a 90 °C durante 1 h. Las muestras se enfriaron rápidamente en hielo y se les adicionó 30 mL de alcohol etílico frío con el fin de disminuir la solubilidad de las proteínas del suero en su estado nativo (Yoshikawa *et al.*, 2012). Después de una hora el material insoluble se separó por centrifugación (7000 rpm, 10 min, 4 °C). La fracción soluble se ultrafiltró (*Amicon® Ultra-15*, 10 000 kDa, *Millipore*) y el retenido se caracterizó por SDS-PAGE (Fig. 3.11).

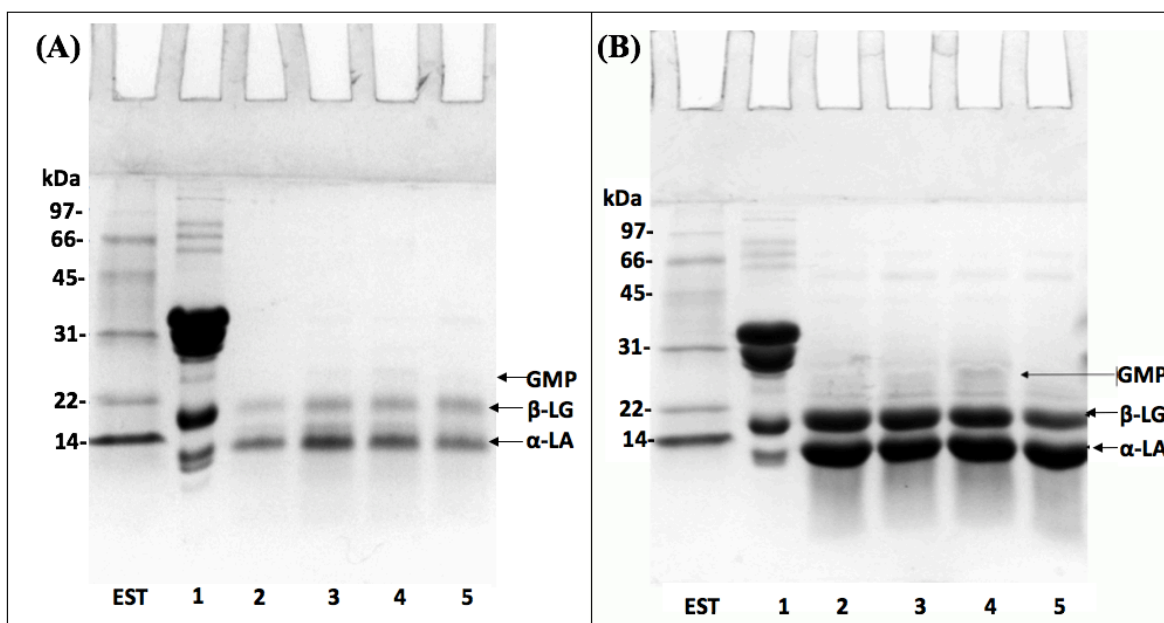


Figura 3.11. Perfil proteínico de la fracción concentrada por ultrafiltración obtenidas de la fracción soluble después del tratamiento térmico. (SDS-PAGE, 12.5 % T). A: Fracción retenida por ultrafiltración proveniente de la fracción soluble después del tratamiento térmico: 95:5 (carril 2); 90:10 (carril 3); 85:15 (carril 4); SDQ concentrado por UF (carril 5). B: Precipitado generado durante el almacenamiento: 95:5 (carril 2); 90:10 (carril 3); 85:15 (carril 4); SDQ (carril 5). Ambos geles: LP (carril 1). Estándares de peso molecular (EST). Tinción con azul de *Coomassie R-250*. *Gel Doc™ XR+ ImagingSystem (Bio-Rad)*.

Se esperaba encontrar mayoritariamente al GMP en la fracción retenida por ultrafiltración después del tratamiento térmico, con el que pretendía separar cuantitativamente a las PS, sin embargo, se detectaron β -LG y α -LA en todas las muestras (Fig. 3.11 A, carriles 2-5) y una banda de menor intensidad de (24 kDa) que podría tratarse del GMP en la mezcla 85:15 v/v (LP:SDQ) y en el SDQ (Fig. 3.11A, carriles 4 y 5). Probablemente el GMP coprecipitó con las PS.

Es importante mencionar que el sobrenadante obtenido después del tratamiento térmico no se analizó inmediatamente por electroforesis y se generó un segundo precipitado durante su almacenamiento (Fig. 3.11B, carriles 2-5), en el gel se observan dos bandas de 25 kDa y 22 kDa, sugiriendo la presencia del GMP, sobre todo en la muestra proveniente de la mezcla 85:15 v/v (LP:SDQ) (carril 4) y se observan las bandas de β -LG y α -LA. El GMP forma agregados con β -LG mediante interacciones electrostáticas y/o puentes de hidrógeno (Martínez *et al.*, 2009) y de la misma manera forma agregados con α -LA, esto podría explicar porque estas proteínas se encuentran presentes en todas las fracciones analizadas.

3.8 Selección de muestras comerciales

Se empleó la metodología de precipitación isoeléctrica de las caseínas y la precipitación secuencial del GMP con TCA para el análisis de diversos productos lácteos. La selección de las muestras comerciales se enfocó en leche, productos lácteos y productos lácteos combinados en polvo, aunque se espera que eventualmente pueda ser empleada en leche en polvo, yogur para beber y leches saborizadas, pues resulta económicamente atractivo elaborar estos productos con suero debido a su menor costo, y como ya se mencionó anteriormente, el SDQ es sensorialmente similar a la leche (Neelima *et al.*, 2013), por lo que es fácil enmascarar su uso. Algunos productores han reportado problemas con la adulteración de la leche en polvo (Chávez *et al.*, 2008) y, por otro lado, las propiedades de gelificación de los polímeros de proteína de suero de leche los convierten en ingredientes adecuados para aplicaciones en yogur (Britten y Giroux, 2001). De Souza *et al.* (2000), analizaron bebidas lácteas saborizadas, repartidas por el gobierno brasileño, para el programa de desayunos escolares encontrando adulteración con suero de quesería en un poco menos de la mitad de las muestras analizadas. Debido a la complejidad de las mezclas que componen los ingredientes de este tipo de bebidas resulta atractivo adulterarlas además el uso del suero de quesería tiene como fin alcanzar la concentración total de proteína. Aunque las proteínas del suero poseen un valor nutricional similar a las caseínas, la sustitución de la leche cruda por suero de quesería debería ser declarado en la lista de ingredientes del producto, debido a que el suero de quesería tiene un costo considerablemente menor al de la leche cruda, los productos modificados en su composición deberían ser vendidos a un menor costo.

3.8.1 Análisis fisicoquímico de muestras de leche y lácteos por ultrasonido

Se seleccionaron ocho muestras comerciales, cinco marcas de los productos seleccionados son elaborados por empresas ampliamente reconocidas entre los mexicanos, dos son marcas propias y una marca menos reconocida: dos leches enteras (I, II), una leche semidescremada (III), tres productos lácteos (IV, V, VI) y dos productos lácteos combinados en polvo (VII, VIII), y se aplicó la metodología descrita.

De cada muestra se obtuvo los valores promedio de grasa (A), proteína (B), SNG (C), densidad (D), el agua agregada (E) y el punto crioscópico (F) por ultrasonido (Fig. 3.12).

La leche entera y la leche semidescremada, muestras I y III, cumplen con lo reportado en el etiquetado cuantitativo de sus ingredientes y con las especificaciones de la normatividad (NOM-155-SCFI-2012). Sin embargo, para la muestra II se detectó 1.83 % de agua agregada y los demás parámetros fisicoquímicos están por debajo de lo establecido.

La Norma NOM-183-SCFI-2012 establece las especificaciones del contenido de grasa (lo declarado en la etiqueta), proteína (2.2%), densidad (1.020 g/mL) y SNG (8.3 %) para el producto lácteo y el contenido de proteína (1.5 %) y grasa (lo declarado en la etiqueta) para el producto lácteo combinado en polvo (Tabla 3.2).

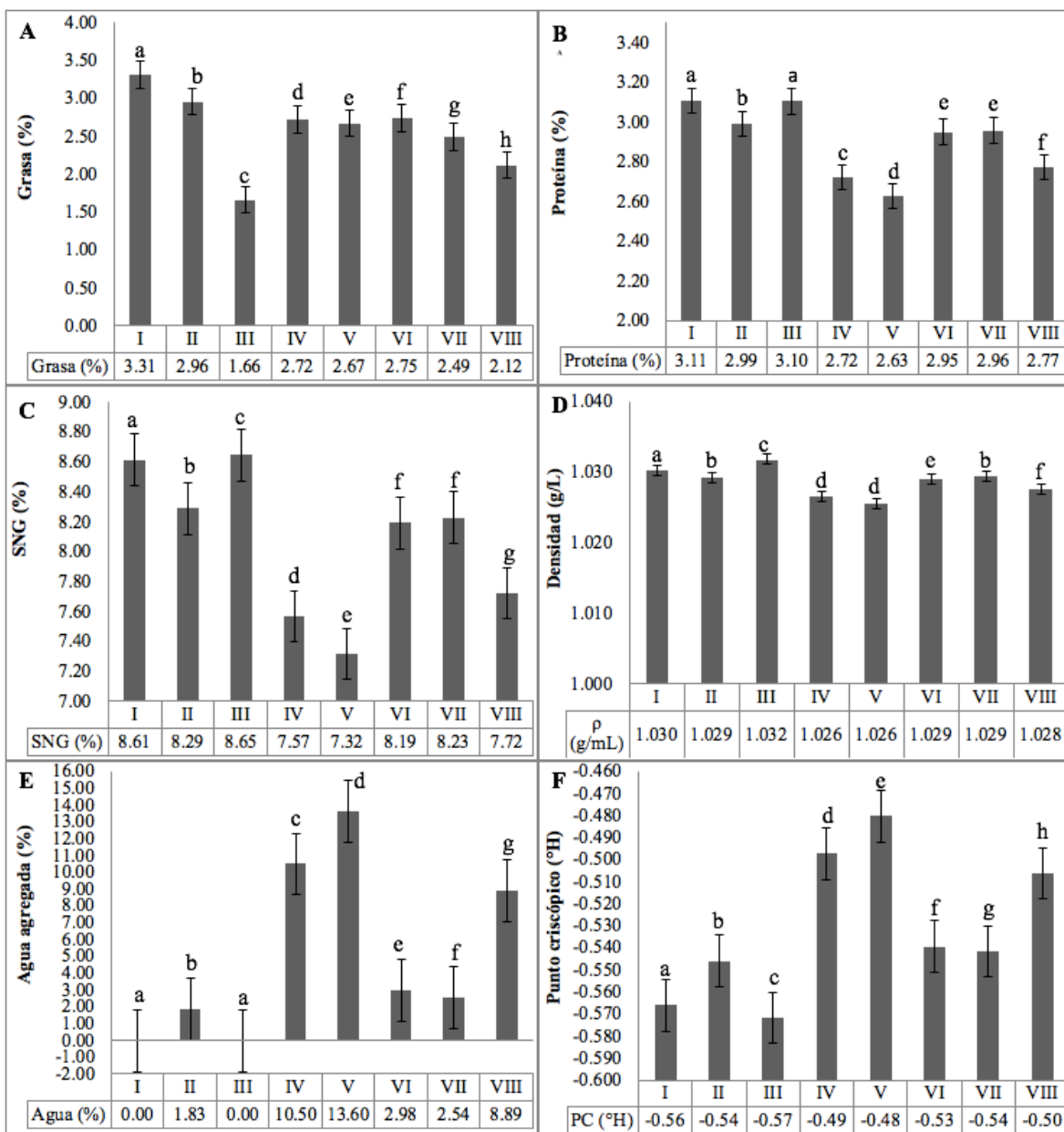


Figura 3.12. Análisis fisicoquímico de las muestras lácteas comerciales, determinados por ultrasonido (*LactiCheck™*). Valores promedio de tres réplicas independientes. Letras iguales no presentan diferencia significativa (*t* de *student*) ($p= 0.05$).

Abreviaturas: LP: leche pasteurizada; SDQ: suero dulce de quesería; SNG: sólidos no grasos; ρ : densidad; °H: grados Horvet.

Para los productos lácteos (muestras IV, V, VI), el equipo cuantificó el contenido de grasa debajo del 3.0 % (Fig. 3.12, A) y contenido de proteína superiores al 2.2 % (Fig. 3.12, B), en cuanto a la densidad, la muestra VI es la única que cumpliría con la especificación. Los productos lácteos combinados (muestras VII y VIII) se hidrataron en agua destilada, y debido a la baja concentración de proteína en el producto, se ajustó la concentración al 3.0 % al momento de rehidratar; se detectó un contenido de proteína 2.96 % y 2.77 % para las muestras VII y VIII respectivamente. Se detectó agua agregada en la leche II y en todas las muestras lácteas. El equipo detectó un incremento significativo en el punto crioscópico alcanzando un valor de -0.48 en el producto lácteo V.

Tabla 3.2. Especificaciones fisicoquímicas del producto lácteo y del producto lácteo combinado e información del etiquetado cuantitativo de los ingredientes.

parámetro	NOM ¹		etiquetado cuantitativo de los ingredientes				
	PL	PLC _p	IV	V	VI	VII	VIII
Proteína (%)	2.2	15	2.2	2.2	2.2	15	15
Grasa (%)	Lo declarado en la etiqueta		3.0	3.0	3.0	23.0	20.6
ρ (g/L)	1.029	-	-	-	-	-	-
SNG (%)	8.3	-	-	-	-	-	-

1: NOM-183-SCFI-2012. Producto lácteo y producto lácteo combinado - Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.

Abreviaturas: SNG: sólidos no grasos; ρ : densidad; PL: producto lácteo; PLC_p: producto lácteo combinado en polvo.

3.8.2 Detección de la adulteración de muestras lácteas con suero dulce de quesería por densitometría

El perfil electroforético de las muestras comerciales se muestra en la Figura 3.13. En la parte superior del gel se observan bandas que corresponden a agregados de alto peso molecular (AAPM) mayoritariamente en los tres productos lácteos analizados. Cuando las proteínas del suero se desnaturalizan por calor, forman complejos insolubles debido a la interacción entre κ -CN y β -LG y/o α -LA. En todas las muestras, se detectó a las gamma caseínas (γ -CNs): γ_1 -

CN (24 kDa), γ_2 -CN y γ_3 -CN, comigran, y corresponde a la banda de menor peso molecular que α -LA, productos de la actividad de plasmina sobre β -CN. En la muestra III (Fig. 3.13, carril 3), se observa una banda entre β -LG y α -LA, anteriormente se obtuvo una banda similar indicando la presencia de para- κ -CN por la actividad de la quimosina, presente en el suero dulce, sobre κ -CN. No se logró identificar a dos proteínas.

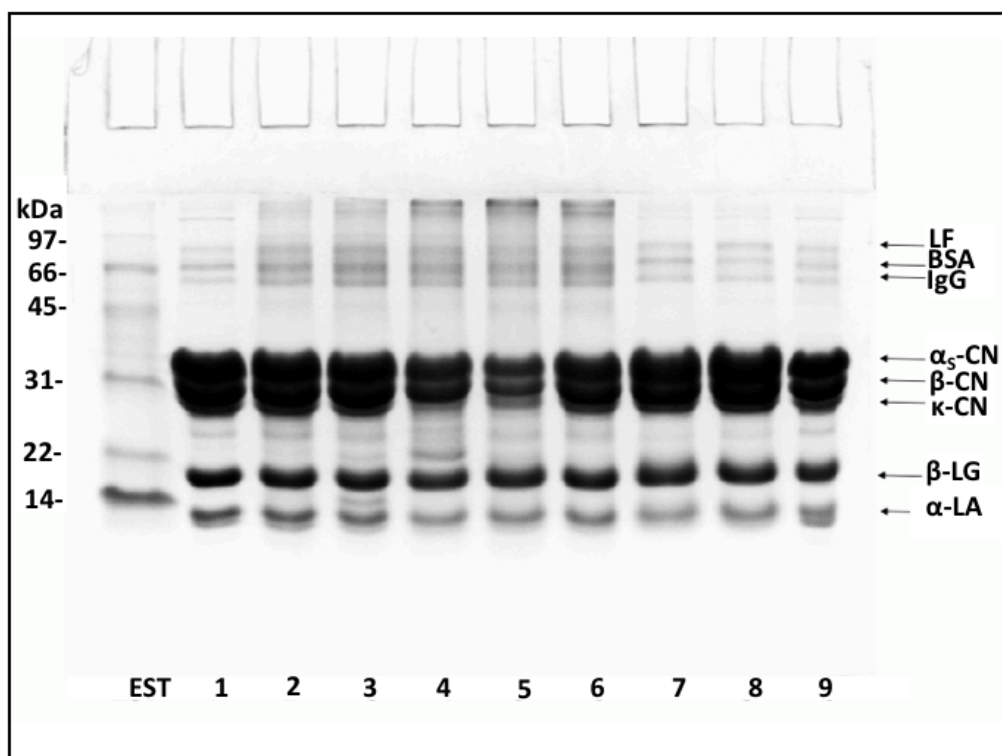


Figura 3.13. Perfiles electroforéticos de las muestras comerciales. (SDS-PAGE, 12.5 % T). Muestras comerciales: I (carril 1); II (carril 2); III (carril 3); IV (carril 4); V (carril 5); VI (carril 6); VII (carril 7); VIII (carril 8). Leche genuina de vaca, Material de Referencia Certificado (carril 9). Estándares de peso molecular (EST). Tinción con azul de *Coomassie* R-250. *Gel DocTM XR+ ImagingSystem* (Bio Rad).

Por medio de un análisis densitométrico se calculó la proporción CN:PS de cada muestra, debido a que la normatividad indica que se debe cumplir la relación natural entre las caseínas y las proteínas del suero (80:20), tanto en leche como en los productos lácteos, se empleó leche genuina de vaca, Material de Referencia Certificado (MRC) en su contenido de proteína (3.57 %), grasa (3.52 %), cenizas (0.73 %), humedad (87.89 %) y lactosa (4.82 %). Se hidrató de acuerdo a las indicaciones del Centro Nacional de Metrología (CENAM), y se utilizó como referencia del análisis.

Con base en el análisis de los perfiles de SDS-PAGE de las muestras de leche y lácteos comerciales se calculó la concentración relativa de las principales proteínas lácteas (Programa *ImageLab*TM; Tabla 3.3). Es notorio la mayor abundancia de las proteínas del suero de alto peso molecular: LF, BSA e Igs. Su contenido fue del 2 % en la muestra de leche entera pasteurizada utilizada en la preparación de las mezclas LP:SDQ, encontrando la proporción entre las caseínas y las proteínas del suero de 74.9:25.1. Las muestras con contenido porcentual de caseínas igual o mayor al 72 % pueden ser consideradas libres de suero de quesería de acuerdo a De Souza *et al.*, (2000).

La formación de los AAPM fue más evidente en los productos ultrapasteurizados que en los productos en polvo, debido a la mayor intensidad del tratamiento térmico aplicado. La detección de los AAPM y la mayor abundancia de LF, BSA e Igs, hace que se modifique significativamente la relación entre las principales fracciones proteínicas.

El contenido de caseínas fue de 67.7 % para la leche entera pasteurizada (I), 64.2 % para la leche entera ultrapasteurizada (II); 64.6 % para la leche semidescremada ultrapasteurizada (III); 55.1 % para el producto lácteo con grasa vegetal ultrapasteurizado (IV); 52.3 % para el producto lácteo con grasa vegetal ultrapasteurizado (V); 59.2 % para el producto lácteo con grasa vegetal ultrapasteurizado (VI); 62.3 % para el producto lácteo combinado en polvo (VII) y 65.2 % para el producto lácteo combinado en polvo. Por lo que ninguna muestra láctea cumplió con la relación que establece la normatividad vigente en México.

El MRC (66.4 % CN) se obtuvo bajo condiciones especiales de sanitización directamente de la línea de ordeño en un contenedor de acero inoxidable. Sin embargo, el material no puede considerarse representativo debido a que se obtuvo de la ordeña de dos animales.

Tabla 3.3 Concentración relativa de las proteínas en las muestras comerciales.

muestras		concentración relativa (%)								MRC
		L		PL			PLC			
perfil proteínico		P	UHT					D		
banda	proteína	I	II	III	IV	V	VI	VII		VIII
1	AAPM	0.9	1.5	1.1	3.6	7.1	3.5	0.9	0.5	0.9
2	AAPM	0.6	0.6	2.3	3.6		2.9	0.4	0.3	0.5
3	LF	1.6	3.9	4.1	3.5	2.9	4.3	2.7	2.6	2.0
4	BSA	2.9	4.0	5.1	3.8	3.7	2.9	1.6	2.0	2.5
5	IgG	2.2	3.0	2.9	4.2	1.8	2.3	3.5	2.2	2.5
6	ni	0.3	1.3	1.0	0.7	1.0	0.8	0.4	0.4	0.0
7	CN	65.2	60.8	60.5	51.4	49.4	56.8	61.6	64.0	64.4
8	γ_1 -CN	1.5	1.9	1.5	0.5	1.9	1.7	0.3	0.8	1.6
9	ni	0.2	0.1	0.5	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10	β -LG	13.9	13.3	11.8	15.0	20.8	15.7	18.5	16.5	15.2
11	κ -CN	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
12	α -LA	10.3	9.5	8.1	11.2	11.4	9.2	10.1	10.7	10.0
13	$\gamma_{2,3}$ -CN	0.4	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5
Σ AAPM=		1.5	2.1	3.4	7.2	7.1	6.4	1.3	0.8	1.4
Σ PSAPM=		6.7	10.9	12.1	11.5	8.4	9.5	7.8	6.8	7.0
$\Sigma \beta$ -LG + α -LA =		24.2	22.8	19.9	26.2	32.2	24.9	28.6	27.2	25.2
Σ CN=		67.6	64.2	64.6	55.1	52.3	59.2	62.3	65.2	66.4
Total		100	100	100	100	100	100	100	100	100

Abreviaturas. L: leche; PL: producto lácteo; PLC: producto lácteo combinado; P: pasteurizado; UHT: ultra alta temperatura; D: deshidratado; AAPM: agregado de alto peso molecular; PSAPM: proteínas del suero de alto peso molecular; LF: lactoferrina; BSA: albúmina sérica bovina; IgG: inmunoglobulina G, CN: caseínas (α -CN; β -CN y κ -CN); α_{S1} -CN β -LG: β -lactoglobulina; α -LA: α -lactoalbúmina; ni: no identificado.

La detección de los AAPM supone la disminución de la intensidad de las proteínas que participan en la formación de los coprecipitados lácteos, lo que no sucedió, por lo que se puede inferir que para la formulación de los productos analizados se emplearon materias primas deshidratadas.

Por último, se analizaron las muestras comerciales con la metodología de precipitación secuencial con TCA, separando previamente a las caseínas, el resultado puede verse en la Figura 3.14. Se detectó al GMP en las muestras III (27 kDa), V (25 kDa), VI (24 kDa), VII (25 kDa), y en menor abundancia en las muestras II (24 kDa) y IV (23 kDa), adicionalmente se detectó una banda de 19 kDa entre β -LG y el GMP en las muestras IV, VI y VII, y que puede tratarse del dímero del GMP. En todos los perfiles proteínicos se detectó β -LG.

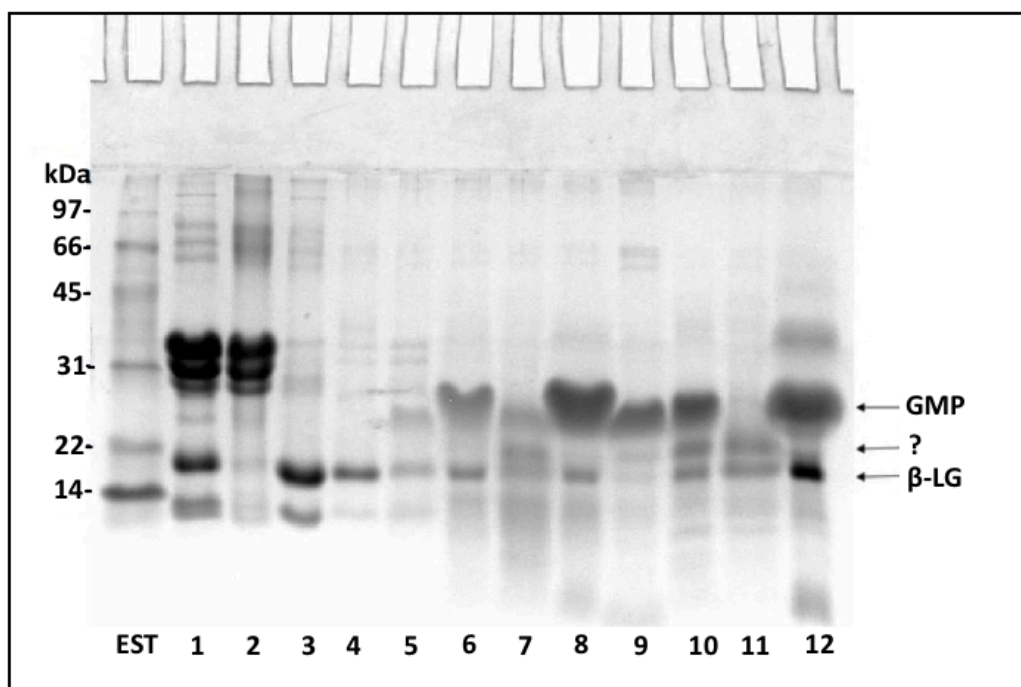


Figura 3.14. Detección del GMP por precipitación isoelectrica de las caseínas seguido de la precipitación secuencial con TCA en muestras de leche y lácteos comerciales. SDS-PAGE, 12.5% T. Material de Referencia Certificado (carril 1); caseína calidad *Hammarsten* (carril 2); SDQ (carril 3); Muestras comerciales: I, leche entera (carril 4); II, leche entera (carril 5); III, leche semidescremada (carril 6); IV, producto lácteo (carril 7); V, producto lácteo (carril 8); VI, producto lácteo (carril 9); VII, producto lácteo combinado (carril 10); VIII, producto lácteo combinado (carril 11); GMP de SDQ (carril 12). Estándares de peso molecular (EST). Tinción con azul de *Coomassie R-250*. *Gel DocTM XR+ ImagingSystem (Bio-Rad)*.

No se detectó GMP en la muestra I, la única muestra pasteurizada analizada “100 % leche fresca de vaca”, pero la detección de los AAPM y mayor abundancia de LF, BSA e Igs, podría deberse al empleo de sólidos de la leche (suero de leche, concentrado de proteína de leche o proteína de suero) sin declarar con fines de estandarización. Las otras dos muestras de leche tampoco declaran sólidos de la leche. Los tres productos lácteos y los productos lácteos combinados en polvo emplean en su formulación sólidos de la leche.

Si bien existe la denominación “rehidratado” y “reconstituido”, tanto para la leche como los lácteos, la confirmación de la presencia de suero dulce de quesería sin respetar la proporción entre las caseínas y las proteínas de suero, independientemente de la denominación comercial del producto, y en consecuencia del contenido de proteína, resulta en un engaño al consumidor.

4.0 Conclusiones

Se logró detectar suero dulce de quesería en leche hasta un nivel de adición del 15 % (v/v) que correspondió a un contenido del 0.26 % de agua agregada. El aporte de sólidos no grasos del suero de quesería interfirió en la mayoría de los parámetros fisicoquímicos evaluados por ultrasonido.

Se logró aislar el glicomacropéptido del suero dulce de quesería por precipitación secuencial con ácido tricloroacético.

Se analizaron los perfiles proteínicos del fraccionamiento de la leche, identificando a las principales proteínas lácteas por comparación con las muestras control, con las de referencia y mediante la estimación de su peso molecular.

Se detectó el glicomacropéptido como un agregado de aproximadamente 28 kDa en leche adicionada con 5 % de suero dulce de quesería mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

Se pudo comprobar, por electroforesis en gel de poliacrilamida, que la separación de la caseína isoeléctrica, seguido de la precipitación secuencial de las proteínas del suero y del glicomacropéptido con ácido tricloroacético generó los mejores resultados.

No se logró la separación cuantitativa de las proteínas del suero dulce de quesería del glicomacropéptido debido a la interacción entre las proteínas y el péptido promovida por el calor, interacciones iónicas e hidrofóbicas y la acidez del medio.

Se detectó suero dulce de quesería por la presencia del glicomacropéptido en dos muestras de leche (II y III), en los tres productos lácteos (IV, V y VI) y en un producto lácteo combinado (VII). La confirmación de la presencia del SDQ sin respetar la proporción entre las caseínas y las proteínas de suero resulta en un engaño al consumidor.

5.0 Referencias

1. Abd El-Salam, M. A., El-Shibiny, S., Buchheim, W. (1996). Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. *International Dairy Journal*, 6(4), 327-341.
2. Abd El-Salam, M. H. (2006). Separation of casein glycomacropeptide from whey: methods of potential industrial application. *International Journal of Dairy Science*, 1(1), 93-99.
3. Aleinik, S. I., Stan, E. Y., Chernikov, M. P. (1984). A glycopeptide from k-casein and its effect on protein assimilation. *Voprosy Pitaniya*, 2, 47-50.
4. Azuma, N., Yamauchi, K., Mitsuoka, T. (1984). Bifidus growth-promoting activity of a glycomacropeptide derived from human K-casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48(8), 2159-2162.
5. Beucher, S., Levenez, F., Yvon, M., Corring, T. (1994). Effects of gastric digestive products from casein on CCK release by intestinal cells in rat. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 5(12), 578-584.
6. Borad, S. G., Kumar, A., Singh, A. K. (2017). Effect of processing on nutritive values of milk protein. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(17), 3690-3702.
7. Bremer, M. G., Kemmers-Voncken, A. E., Boers, E. A., Frankhuizen, R., Haasnoot, W. (2008). Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine rennet whey powder in milk powder and buttermilk powder. *International Dairy Journal*, 18(3), 294-302.
8. Britten, M., y Giroux, H. J. (2001). Acid-induced gelation of whey protein polymers: effects of pH and calcium concentration during polymerization. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 609-617.
9. Burton-Freeman, B. M. (2008). Glycomacropeptide (GMP) is not critical to whey-induced satiety, but may have a unique role in energy intake regulation through cholecystokinin (CCK). *Physiology and Behavior*, 93(1-2), 379-387.
10. Casal, E., Lebrón-Aguilar, R., Chuan-Lee, Y., Noboru, T., Quintanilla-López, J. E. (2013). Identification of sialylated oligosaccharides derived from ovine and caprine caseinomacropeptide by graphitized carbon liquid chromatography–electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 6(3), 814-825.

11. Chávez, N. A., Salinas, E., Jauregui, J., Palomares, L. A., Macías, K. (2008). Detection of bovine milk adulterated with cheese whey by western blot immunoassay. *Food and Agricultural Immunology*, 19(4), 265-272.
12. Chávez, N. A., Jauregui, J., Palomares, L. A., Macías, K. E., Jiménez, M., Salinas, E. (2012). A highly sensitive sandwich ELISA for the determination of glycomacropeptide to detect liquid whey in raw milk. *Dairy Science and Technology*, 92(2), 121-132.
13. Chernikov, M. P., Nikolskaya, G. V., Stan, E. Y., Shlygin, G. K., Vasilevskaya, U. S. (1974). Biological significance of casein glycomacropeptide. *Voprosy Pitaniia*, 2, 21-25.
14. Creamer, L. K., y Richardson, T. (1984). Anomalous behavior of bovine α 1- and β -caseins on gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate buffers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 234(2), 476-486.
15. Da Silva, C. A. S., Coimbra, J. S. D. R., Rojas, E. E. G., Teixeira, J. A. C. (2009). Partitioning of glycomacropeptide in aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, 44(11), 1213-1216.
16. Dalgleish, D. G., 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.
17. De Souza, E. M. T. D., Arruda, S. F., Brandão, P. O., Siqueira, E. M. D. A. (2000). Electrophoretic analysis to detect and quantify additional whey in milk and dairy beverages. *Food Science and Technology*, 20(3), 314-317.
18. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
19. Ersson, B., Rydén, L., Janson, J. C. (2012). Introduction to protein purification. En: Janson, J. C. Ed. Protein purification: principles, high resolution methods, and applications (Vol. 151). New Jersey: John Wiley & Sons. 3-23
20. Farías, M. E., Martínez, M. J., Pilosof, A. M. R. (2010). Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. *International Dairy Journal*, 20(2), 79-88.

21. Farrell Jr, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1641-1674.
22. FDA. 2009. Public meeting on economically motivated adulteration. Disponible en: https://www.aboutseafood.com/sites/all/files/share/NFI_Comment_May_1_2009_Public_Meeting_on_Economically_Motivated_Adulteration.pdf. Último acceso: 09/10/19
23. Ferreira, I. M., y Oliveira, M. B. P. P. (2003). Determination of caseinomacropeptide by an RP-HPLC method and monitoring of the addition of rennet whey to powdered milk. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 26(1), 99-107.
24. Finete, V. D. L. M., Gouvêa, M. M., de Carvalho Marques, F. F., Netto, A. D. P. (2013). Is it possible to screen for milk or whey protein adulteration with melamine, urea and ammonium sulphate, combining Kjeldahl and classical spectrophotometric methods? *Food Chemistry*, 141(4), 3649-3655.
25. Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., O'Mahony, J. A. (2015). *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Second edition. New York: Springer.
26. Fox, P. F. (2009). Milk: an overview. En: Thompson, A., Boland, M., Singh, H. Eds. *Milk proteins: from expression to food*. Londres: Academic Press. 1-44.
27. Fukuda P., Röig M., Prata L. F. (1994). Metodologia quantitativa para determinação espectrofotométrica de ácido siálico em leite (Quantitative methodology for the spectrophotometric determination of sialic acid in milk). Anais do XII Congresso Nacional de Laticínios, Juiz de Fora, MG, Brasil. Proceedings of the XII National Congress of Dairy Products, Juiz de Fora, MG, Brazil.
28. Fukuda, S. P., Roig, S. M., Prata, L. F. (2004). Correlation between acidic ninhydrin and HPLC methods to evaluate fraudulent addition of whey in milk. *Le Lait*, 84(5), 501-512.
29. Galindo- Amaya, L. M., Valbuena, E., Rojas, E. (2006). Estandarización de la detección del glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche. *Revista Científica de Veterinaria*, 16(3), 308-314.
30. Green, M. L. (1977). Milk coagulants. *Journal of Dairy Research*, 44(1), 159-188.
31. González, S. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, 57(1), 1-11.

32. Haasnoot, W., Marchesini, G. R., Koopal, K. (2006). Spreeta-based biosensor immunoassays to detect fraudulent adulteration in milk and milk powder. *Journal of AOAC International*, 89(3), 849-855.
33. Handford, C. E., Campbell, K., Elliott, C. T. (2016). Impacts of milk fraud on food safety and nutrition with special emphasis on developing countries. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 130-142.
34. Holland, J. W., Deeth, H. C., Alewood, P. F. (2004). Proteomic analysis of κ -casein micro-heterogeneity. *Proteomics*, 4(3), 743-752.
35. Holland, J. W., Deeth, H. C., Alewood, P. F. (2006). Resolution and characterization of multiple isoforms of bovine κ -casein by 2-DE following a reversible cysteine-tagging enrichment strategy. *Proteomics*, 6(10), 3087-3095.
36. Holland, J. W. (2009). Post-translational modifications of caseins. En: Thompson, A., Boland, M., Singh, H. Eds. Milk proteins: from expression to food. Londres: Academic Press. 107-124.
37. Horne, D. S. (2009). Casein micelle structure and stability. En: Thompson, A., Boland, M., Singh, H. Eds. Milk proteins: from expression to food. Londres: Academic Press. 133-157.
38. Illanes, A. (2011). Whey upgrading by enzyme biocatalysis. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(6), 9-9.
39. Jovanovic, S., Barac, M., Macej, O., Vucic, T., Lacnjevac, C. (2007). SDS-PAGE analysis of soluble proteins in reconstituted milk exposed to different heat treatments. *Sensors*, 7(3), 371-383.
40. Kawakami, H., Kawasaki, Y., Dosako, S., Tanimoto, M., Nakajima, I. (1992). Determination of κ -casein glycomacropeptide by high performance liquid chromatography without trichloroacetic acid pretreatment. *Milchwissenschaft (Germany)*, 47(11), 688-693.
41. Kawasaki, Y., Isoda, H., Shinmoto, H., Tanimoto, M., Dosako, S. I., Idota, T., Nakajima, I. (1993a). Inhibition by κ -casein glycomacropeptide and lactoferrin of influenza virus hemagglutination. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57, 1214-1215.

42. Kawasaki, Y., Kawakani, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Tomizawa, A., Kotaka, M., Nakajima, I. (1993b). pH-Dependent molecular weight changes of kappa-casein glycomacropeptide and its preparation by ultrafiltration. *Milchwissenschaft*, 48(4), 191-196.
43. Kreuß, M., Strixner, T., Kulozik, U. (2009). The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1818-1826.
44. Koning P., Elisses J., De Vries H. (1966) A method for the detection of small percentages of whey powder in milk powder. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 20(3), 204.
45. Laloux, L. (2006). Leche y productos lácteos en Ducauze, C. J. Ed. Fraudes alimentarios: legislación y metodología analítica. Zaragoza: Acribia, 187-213.
46. LaClair, C. E., Ney, D. M., MacLeod, E. L., Etzel, M. R. (2009). Purification and use of glycomacropeptide for nutritional management of phenylketonuria. *Journal of Food Science*, 74(4), 199-206.
47. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
48. Li, E. W., y Mine, Y. (2004). Comparison of chromatographic profile of glycomacropeptide from cheese whey isolated using different methods. *Journal of Dairy Science*, 87(1), 174-177.
49. Lieske, B., y Konrad, G. (1996). A new method to estimate caseinomacropeptide and glycomacropeptide from trichloroacetic acid filtrates. *Milchwissenschaft*, 51(8), 431-434.
50. Lopez, R., y Ramos, M. (1992). Revisión: El caseinomacropéptido bovino. 1. Características fisicoquímicas y actividad biológica. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 32(6), 575-588.
51. Losito, I., Carbonara, T., Monaci, L., Palmisano, F. (2007). Evaluation of the thermal history of bovine milk from the lactosylation of whey proteins: an investigation by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(7-8), 2065-2074.
52. Manning, L. (2016). Food fraud: Policy and food chain. *Current Opinion in Food Science*, 10, 16-21.

53. Manso, M. A., Lopez-Fandino, R. (2004). κ -Casein macropeptides from cheese whey: Physicochemical, biological, nutritional, and technological features for possible uses. *Food Reviews International*, 20(4), 329-355.
54. Martín, A. B., Peláez, C., y Requena, T. (2004). Rheological and structural properties of fermented goat's milk supplemented with caseinomacropeptide and whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science*, 86 (5), 1535-1540.
55. Martín-Hernández, C., Muñoz, M., Daury, C., Weymuth, H., Kemmers-Voncken, A. E., Corbatón, V., Bremer, M. G. (2009). Immunochromatographic lateral-flow test strip for the rapid detection of added bovine rennet whey in milk and milk powder. *International Dairy Journal*, 19(4), 205-208.
56. Martinez, M. J., Sánchez, C. C., Patino, J. M. R., Pilosof, A. M. (2009). Interactions in the aqueous phase and adsorption at the air–water interface of caseinoglycomacropeptide (GMP) and β -lactoglobulin mixed systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68(1), 39-47.
57. Mercier, J. C. (1981). Phosphorylation of caseins, present evidence for an amino acid triplet code posttranslationally recognized by specific kinases. *Biochimie*, 63(1), 1-17.
58. Miralles, B., Bartolomé, B., Amigo, L., y Ramos, M. (2000). Comparison of three methods to determine the whey protein to total protein ratio in milk. *Journal of Dairy Science*, 83(12), 2759-2765.
59. Mollé, D., y Léonil, J. (1995). Heterogeneity of the bovine κ -casein caseinomacropeptide, resolved by liquid chromatography on-line with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 708(2), 223-230.
60. Mollé, D., y Léonil, J. (2005). Quantitative determination of bovine κ -casein macropeptide in dairy products by liquid chromatography/electrospray coupled to mass spectrometry (LC-ESI/MS) and liquid chromatography/electrospray coupled to tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS). *International Dairy Journal*, 15(5), 419-428.
61. Motta, T. C., Hoff, R. B., Barreto, F., Andrade, R. B. S., Lorenzini, D. M., Meneghini, L. Z., Pizzolato, T. M. (2014). Detection and confirmation of milk adulteration with cheese whey using proteomic-like sample preparation and liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry analysis. *Talanta*, 120, 498-505.

62. Morr, C. V., y Seo, A. (1988). Fractionation and characterization of glycomacropeptide from caseinate and skim milk hydrolysates. *Journal of Food Science*, 53(1), 80-87.
63. Mrowetz, G., y Klostermeyer, H. (1976). Polarographic determination of the whey protein percentage in dried milks. *Milchwissenschaft*, 31(6), 346-349.
64. Møller, H. J., y Poulsen, J. H. (2009). Staining of glycoproteins/proteoglycans on SDS-gels. En: *The protein protocols handbook* (pp. 569-574). Humana Press, Totowa, NJ.
65. Nakano, T., y Ozimek, L. (1999). Determination of sialic acid by the thiobarbituric acid reaction in sweet whey and its fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(7), 2613-2616.
66. Nakano, T., y Ozimek, L. (2000). Purification of glycomacropeptide from caseinate hydrolysate by gel chromatography and treatment with acidic solution. *Journal of Food Science*, 65(4), 588-590.
67. Nakano, T., R. Silva-Hernandez, E., Ikawa, N., Ozimek, L. (2002). Purification of κ -Casien Glycomacropeptide from Sweet Whey with Undetectable Level of Phenylalanine. *Biotechnology Progress*, 18(2), 409-412.
68. Nakano, T., y Ozimek, L. (2014). A sialic acid assay in isolation and purification of bovine κ -casein glycomacropeptide: A review. *Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture*, 6(1), 38-44.
69. Neelima, R. P., Sharma, R., Rajput, Y. (2012). Direct estimation of sialic acid in milk and milk products by fluorimetry and its application in detection of sweet whey adulteration in milk. *Journal of Dairy Research*, 79(4), 495-501.
70. Neelima R., Sharma, R., Rajput, Y. S., Mann, B. (2013). Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: a review. *Dairy Science and Technology*, 93(1), 21-43.
71. Neeser, J. R. (1987). Caseinoglycopeptides as dental plaque and dental caries inhibiting agents. *European Patent Applications*. EP. 283, 675.
72. Niemi, M., Jylhä, S., Laukkanen, M. L., Söderlund, H., Mäkinen-Kiljunen, S., Kallio, J. M., Rouvinen, J. (2007). Molecular interactions between a recombinant IgE antibody and the β -lactoglobulin allergen. *Structure*, 15(11), 1413-1421.
73. 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. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 19 de julio de 2012.
74. NOM-155-SCFI-2012. Leche, denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 3 de mayo de 2012.
 75. NOM-183-SCFI-2012. Producto lácteo y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 15 de marzo de 2012.
 76. Oancea, S. (2009). Identification of glycomacropeptide as indicator of milk and dairy drinks adulteration with whey by immunochromatographic assay. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(1), 4146-4151.
 77. Official Journal of the European Communities L 037 (2001) Regulation No. 213/2001, 07/02/2001, 1-99.
 78. Oliva, Y., Escobar, A., Ponce, P. (2002). Caseinomacropéptido bovino: una alternativa para la salud. *Revista de Salud Animal*, 24(2), 73-82.
 79. O'Riordan, N., Kane, M., Joshi, L., Hickey, R. M. (2014). Structural and functional characteristics of bovine milk protein glycosylation. *Glycobiology*, 24(3), 220-236.
 80. Otani, H., Monnai, M., Hosono, A. (1992). Bovine k-casein as inhibitor of the proliferation of mouse splenocytes induced by lipopolysaccharide stimulation. *Milchwissenschaft*, 47 (8), 512-515.
 81. Page & Pedersen International, Ltd. Guía de usuario. Revisión 1.2.
 82. Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N., Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105(1), 1-14.
 83. Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83(2), 346-356.
 84. Puga Torres, B. H., Morales Arciniega, S. M., Núñez Naranjo, L. F., De la Torre Duque, D. I., Campos Vallejo, R. M., Santander Parra, S. H., Vayas Machado, E. C. (2017). Detection of glucomacropeptide in raw milk adulterated with cheese whey in Ecuador. *Food and Nutrition Sciences*, 8, 579-590.
 85. Richards, N. (1997). Uso racional de suero lácteo. *Revista Industria de Laticínios*, 2(9), 67-69.

86. Requena, P., González, R., López-Posadas, R., Abadía-Molina, A., Suárez, M. D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O. (2010). The intestinal antiinflammatory agent glycomacropeptide has immunomodulatory actions on rat splenocytes. *Biochemical Pharmacology*, 79(12), 1797-1804.
87. Robitaille, G., Lapointe, C., Leclerc, D., Britten, M. (2012). Effect of pepsin-treated bovine and goat caseinomacropeptide on *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* in acidic conditions. *Journal of Dairy Science*, 95(1), 1-8.
88. Rojas, E. y Torres, G. (2013). Isolation and recovery of glycomacropeptide from milk whey by means of thermal treatment. *Food Science and Technology*, 33(1), 14-20.
89. Saito, T., Yamaji, A., Itoh, T. (1991). A new isolation method of caseinoglycopeptide from sweet cheese whey. *Journal of Dairy Science*, 74(9), 2831-2837.
90. Schmidt, R. H., Illingworth, B. L., Ahmed, E. M., Richter, R. L. (1978). the effect of dialysis on heat-induced gelation of whey protein concentrate. *Journal of food processing and preservation*, 2(2), 111-120.
91. Scholl, P. F., Farris, S. M., Mossoba, M. M. (2014). Rapid turbidimetric detection of milk powder adulteration with plant proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 62, 1498–1505.
92. Sharma, K. y Paradakar, M. (2010). The melamine adulteration scandal. *Food security*, 2(1), 97-107.
93. Silva-Hernandez, E. R., Nakano, T., Ozimek, L. (2002). Isolation and analysis of κ -casein glycomacropeptide from goat sweet whey. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(7), 2034-2038.
94. Singh, P. y Gandhi, N. (2015). Milk preservatives and adulterants: processing, regulatory and safety issues. *Food Reviews International*, 31(3), 236-261.
95. Smejkal, G. B., 2006. Proteins staining in polyacrylamide gels. En G. B. Smejkal y A. Lazarev. Eds. Separation methods in proteomics. London: Taylor & Francis, 439-452.
96. Spink, J. y Moyer, D. C. (2011). Defining the public health threat of food fraud. *Journal of Food Science*, 76(9), R157-R163.
97. Stan, E. Y., Groisman, S. D., Krasil'Shchikov, K. B., Chernikov, M. P. (1983). Effect of χ -casein glycomacropeptide on gastrointestinal motility in dogs. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 96(1), 889-891

98. Talbo, G. H., Suckau, D., Malkoski, M., Reynolds, E. C. (2001). MALDI-PSD-MS analysis of the phosphorylation sites of caseinomacropeptide. *Peptides*, 22(7), 1093-1098.
99. Tanimoto, M., Kawasaki, Y., Dosako, S. I., Ahiko, K., Nakajima, I. (1992). Large-scale preparation of κ -casein glycomacropeptide from rennet casein whey. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56(1), 140-141.
100. Tolkach, A., y Kulozik, U. (2005). Fractionation of whey proteins and caseinomacropeptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), 13-20.
101. Tullio, L. T., Lazzari Karkle, E. N., Cândido, L. M. B. (2007). Revisão: isolamento e purificação do glicomacropeptídeo do soro de leite. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 25(1), 456-457.
102. Van Hooydonk, A. C. M., y Olieman, C. (1982). A rapid and sensitive high-performance liquid chromatography method of following the action of chymosin in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 36(2), 153-158.
103. Van Calcar, S. C., y Ney, D. M. (2012). Food products made with glycomacropeptide, a low-phenylalanine whey protein, provide a new alternative to amino acid-based medical foods for nutrition management of phenylketonuria. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 112(8), 1201-1210.
104. Voet, D. y Voet, J. G. (2011). *Biochemistry*. 4th Edition. New York: John Wiley & Sons Inc, 146-149.
105. Vreeman, H. J., Visser, S., Slangen, C. J., Van Riel, J. A. (1986). Characterization of bovine κ -casein fractions and the kinetics of chymosin-induced macropeptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-containing fractions determined by high-performance gel-permeation chromatography, *Biochemical Journal*, 240(1), 87-97.
106. Westermeier R. (2012). Electrophoresis in gels. En: Janson, J. C. Ed. *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications* (Vol. 151). New Jersey: John Wiley & Sons. 365-379.
107. Wolfschoon-Pombo, A. F., y Furtado, M. A. M. (1989). Detection of adulteration of pasteurised milk with whey by determination of the casein-bound phosphorus and

- protein nitrogen content. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 188(1), 16-21.
108. Yoshikawa, H., Hirano, A., Arakawa, T., Shiraki, K. (2012). Mechanistic insights into protein precipitation by alcohol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(3), 865-871.
109. Yvon, M., Chabanet, C., Pélissier, J. P. (1989). Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions hypothesis on the precipitation mechanism. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 34(3), 166-176.
110. Zadow, J. G. (1994). Utilisation of milk components: Whey. En: Robinson, R. K. Ed. *Modern Dairy Technology*. Boston: Springer, 313-373.

6.0 Anexos

Anexo A. Preparación de las disoluciones

Disolución amortiguadora de solubilidad (pH 8.3)

Sal disódica del ácido del ácido etilendiamino tetraacético (**EDTA**) (40 mM) y tetraborato de sodio (30 Mm). De cada reactivo se pesó la cantidad requerida para preparar 100 mL de la disolución y se diluyeron en un vaso de precipitados de 150 mL con aproximadamente 85 mL de agua. La solución se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y aforo con agua. Se midió el pH de la disolución y se conservó en refrigeración hasta su uso.

Disolución amortiguadora de muestra (pH 8.4)

Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) (0.05 %, m/v), Tris-base (167 mM), ácido 3-morfolino-4-il-propano-1-sulfónico (MOPS) (42 mM), EDTA (67 mM) y urea (6 M). Se pesaron los reactivos y se disolvieron en aproximadamente 50 mL de agua en un vaso de precipitados de 250 mL. La disolución se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforo con agua. Se midió el pH de la disolución y se conservó en refrigeración hasta su uso (NMX-F-736/1-COFOCALEC-2012).

Disolución amortiguadora 4x (C)

Tris-HCl. Se pesó 3.0 g de Tris-base (0.5 M) y se disolvió en un vaso de precipitados de 100 mL con aproximadamente 30 mL de agua. Se adicionó poco a poco HCl (1:1) hasta alcanzar un valor de pH de 6.8. Se llevó a la marca de aforo a 50 mL. La disolución se conservó en refrigeración en un frasco de vidrio.

Disolución amortiguadora 4x (S)

Tris-HCl. Se pesó 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, para preparar 100 mL de la disolución. Se ajustó el pH a un valor de 8.8 con HCl (1:1). Finalmente, se llevó a la marca de aforo a 100 mL y se almacenó en refrigeración.

Disolución amortiguadora 2x

Para preparar 10 mL de la disolución, se emplearon 2.5 mL de la disolución amortiguadora 4x (C), 4 mL de la solución de SDS al 10 % (m/v), 2 mL de glicerol, 1 mL de azul de bromofenol al 0.5 % (m/v) y 0.5 mL de agua. La disolución se mantuvo a temperatura ambiente en un recipiente de plástico (Laemmli, 1970).

Disolución amortiguadora de tanque 5x

Se pesó 15.3 g, 72.065 g de glicina y 2.5 g de SDS, y se disolvieron en aproximadamente 850 mL de agua, una vez disuelto la disolución se aforó a 1 L. Por cada corrida de electroforesis se tomaron 50 mL de disolución y 200 mL de agua.

Disolución amortiguadora de fosfatos (0.05 M) (pH 6.0)

Fosfato de sodio y fosfato diácido de sodio. De cada reactivo se pesó la cantidad necesaria para preparar 5 L de disolución y se disolvieron en aproximadamente 400 mL de agua en un vaso de precipitados de 500 mL. La disolución se transfirió a un matraz volumétrico de 1 L y se aforó. Se transfirió a un recipiente de vidrio y se conservó en refrigeración. Al momento de su uso se agregó 4 L de agua fría.

Disolución de ácido acético (1.75 M)

Con pipeta graduada se midió 10 mL de ácido acético glacial y se diluyó con aproximadamente 70 mL de agua en un vaso de precipitados de 250 mL. La disolución se aforó a 100 mL y se almacenó en un frasco de vidrio a temperatura ambiente (ISO 17997-1, 2004).

Disolución de acetato de sodio (1 M)

Se pesó 13.60 g de acetato de sodio trihidratado y se disolvió en un vaso de precipitados de 250 mL con aproximadamente 50 mL de agua. La disolución se aforó a 100 mL y se almacenó a temperatura ambiente en un frasco de vidrio (ISO 17997-1, 2004).

Disolución de ácido tricloroacético al 8 % (m/v)

Se pesó 8.0 gramos de ácido tricloroacético en un vaso de precipitados de 100 mL y se disolvió con cuidado en aproximadamente 50 mL de agua. Se transfirió la disolución a un matraz aforado de 100 mL y se aforó con agua. La disolución se almacenó en un recipiente de plástico y se almacenó en refrigeración (Galindo-Amaya *et al.*, 2006).

Disolución de ácido tricloroacético al 12 % (m/v)

Se pesó 12.0 gramos de ácido tricloroacético en un vaso de precipitados de 100 mL y se disolvió con cuidado en aproximadamente 50 mL de agua. Se transfirió la disolución a un matraz aforado de 100 mL y se aforó con agua. La disolución se almacenó en un recipiente de plástico en refrigeración (ISO 17997-1, 2004).

Disolución de ácido tricloroacético al 50 % (m/v)

Se pesó 50.0 gramos de ácido tricloroacético en un vaso de precipitados de 100 mL y se disolvió con cuidado en aproximadamente 80 mL de agua. Se transfirió la disolución a un matraz aforado de 100 mL y se aforó con agua. La disolución se almacenó en un recipiente de plástico y se almacenó en refrigeración (Galindo-Amaya *et al.*, 2006).

Mezcla etanol-éter etílico (1:1)

El éter etílico y el alcohol etílico se mantuvieron en refrigeración en recipientes de vidrio y al momento de su uso con ayuda de una probeta de vidrio de 10 mL se agregaron 5 mL de cada reactivo. La manipulación de los disolventes se hizo en la campana y con ayuda de hielo (Galindo-Amaya *et al.*, 2006).

Disolución de NaOH 30 % (m/v)

Se pesó 3.0 g de NaOH y se disolvieron en aproximadamente 5 mL de agua. Se transfirió la disolución a un matraz aforado de 10 mL y se aforó. La disolución se conservó en un tubo de plástico a temperatura ambiente (Rojas y Torres, 2013).

Disolución de acetato de plomo 10 % (m/v)

Se pesó 1.0 g de acetato de plomo y se disolvieron en aproximadamente 5 mL de agua. Se transfirió la disolución a un matraz aforado de 10 mL y se aforó. La disolución se conservó en un vial de vidrio a temperatura ambiente (Rojas y Torres, 2013).

Disolución de molibdato de amonio 5 % (m/v)

Se pesó 0.5 g de molibdato de amonio y se disolvieron en aproximadamente 5 mL de agua. Se transfirió la disolución a un matraz aforado de 10 mL y se aforó. La disolución se conservó en un vial de vidrio a temperatura ambiente (Rojas y Torres, 2013).

Disolución de metavanadato de amonio 0.025 % (m/v)

Se pesó 2.5 mg de vanadato de amonio y se disolvieron en aproximadamente 5 mL de agua. Se transfirió la disolución a un matraz aforado de 10 mL y se aforó. La disolución se conservó en un vial de vidrio a temperatura ambiente (Rojas y Torres, 2013).

Disolución de fenol 5 % (m/v)

Se pesó 5.0 g de fenol y se disolvieron en aproximadamente en 70 mL de agua. La disolución se transfirió a un matraz de aforado de 100 mL y se llevó a la marca de aforo con agua. La disolución se conservó en un frasco ámbar a temperatura ambiente hasta su uso (Dubois *et al.*, 1956).

Reactivos para el método de Lowry

Se preparó la disolución de CTC (cobre-tartrato-carbonato), sulfato de cobre al 0.1 % (m/v), tartrato de sodio al 0.2 % (m/v) y carbonato de sodio al 10.0 % (m/v). Esta disolución se mezcla en partes iguales con una disolución de NaOH 0.8 N y con agua destilada al momento de uso. El reactivo de Folin-fenol se diluye con agua destilada al momento de uso (Peterson, 1977).

Anexo B. Análisis fisicoquímico de la leche pasteurizada y de las mezclas de leche entera pasteurizada con agua

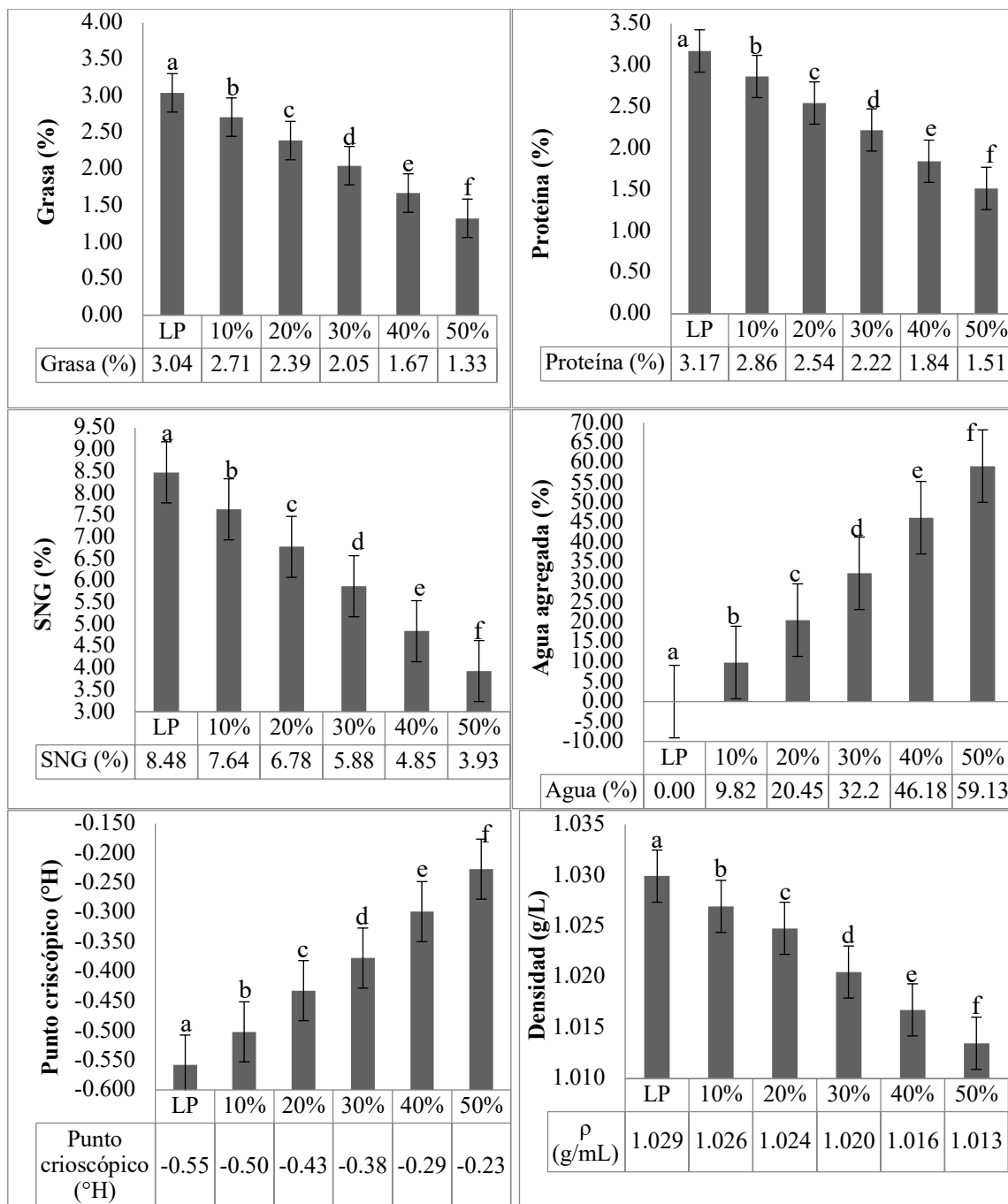


Figura B1. Análisis fisicoquímico de la leche pasteurizada y de las mezclas de leche entera pasteurizada con agua: 90:10; 80:20; 70:30; 60:40; 50:50 (v/v) (LP:agua), determinados por ultrasonido (*LactiCheck™*). Valores promedio de cuatro réplicas independientes. Letras iguales no presentan diferencia significativa (*t* de *student*) ($p= 0.05$).

Abreviaturas: LP: leche pasteurizada; SDQ: suero dulce de quesería; SNG: sólidos no grasos; ρ : densidad; °H: grados Horvet.

Anexo C. Curvas de calibración

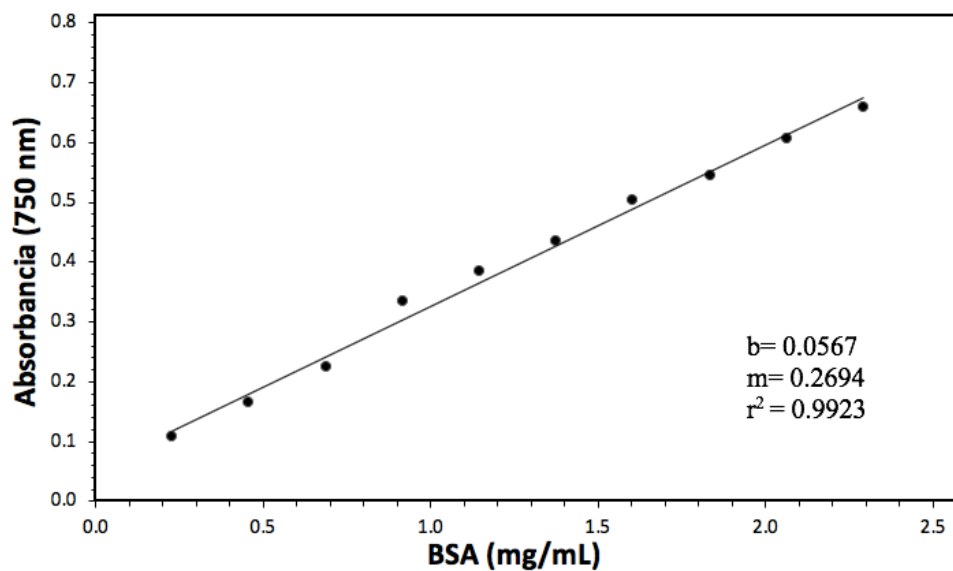


Figura C1. Curva de calibración Lowry

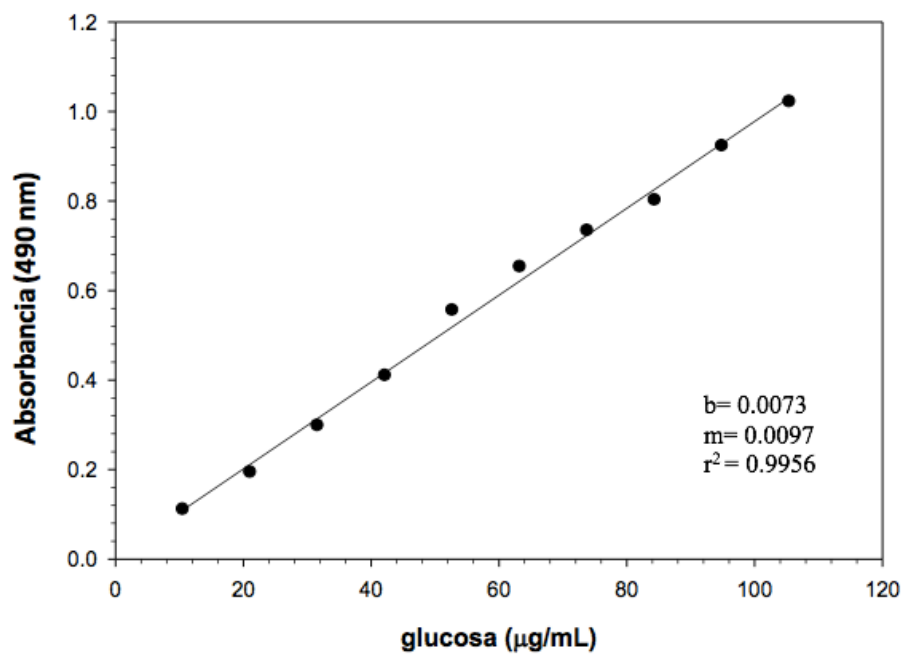


Figura C2. Curva de calibración fenol sulfúrico

Anexo D. Fundamento del método rápido para determinar la composición de la leche por ultrasonido

Existen diversos métodos rápidos para determinar los parámetros de calidad de la leche (análisis fisicoquímicos y microbiológicos), tienen como ventaja la disminución del tiempo de análisis, reducción de costo y sobretodo hacen posible tomar una rápida decisión para la aceptación o rechazo del lote de producción. Para este trabajo se utilizó un analizador de leche que proporciona un perfil de la composición de la leche en 40 s. Se basa en la tecnología de espectrofotometría de ultrasonido y es un sistema automatizado, fácil de usar, mide composición de grasa, sólidos no grasos, densidad, agua añadida, punto crioscópico y proteína.

El análisis de materiales por ultrasonido está basado en que el movimiento de cualquier onda se verá afectado por el medio a través del cual viaja. Se producen cambios en uno y hasta más de cuatro parámetros fácilmente medibles asociados con el paso de una onda de sonido de alta frecuencia a través de un material: tiempo de tránsito, atenuación, dispersión y la frecuencia de contacto, estos cambios pueden correlacionarse con ciertos parámetros composicionales de la leche (*Page & Pedersen International, Ltd.*).

El analizador de leche por ultrasonido emite una onda de sonido de alta frecuencia que viaja a través de la muestra. El *software* del analizador predice la magnitud de cada uno de los mecanismos de absorción y dispersión. La velocidad del pulso ultrasónico y el cambio de temperatura de la muestra son medidas con precisión, debido a que la velocidad del sonido y la temperatura están directamente relacionadas con las partículas de la muestra, el analizador puede proveer análisis confiables de componentes críticos al valorar cambios de manera precisa en estos parámetros. Los parámetros de grasa y sólidos no grasos son cuantificados y a partir de estos valores, por medio de un algoritmo matemático, se determina el contenido de proteína y agua agregada así como la densidad (*Page & Pedersen International, Ltd.*).