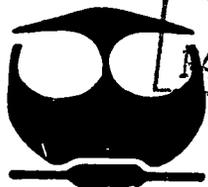


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACION DE CASEINA, CASEINATOS O  
FRACCIONES PROTEICAS ADICIONADOS A MEZCLAS DE  
LECHE EN POLVO IMPORTADA.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A :  
MARIA ANEL OLVERA MONTIEL



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



MEXICO, D. F.

REGISTROS PROFESIONALES  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN

2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Olivera Montiel Anel

FECHA: 28 Noviembre 2002

FIRMA: Olivera Montiel Anel

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

ESTAMPADO  
WRE...

## JURADO ASIGNADO

Presidente	Galdeano Bienzobas Federico
Vocal	Iturbe Chinas Francisca
Secretario	Amelia Ma de Gpe. Farrés González Saravia
1er. Suplente	Amanda Gálvez Mariscal
2do. Suplente	Juan Guzmán Calderón

El trabajo se desarrolló en el:

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA  
LAB 312 CONJUNTO "E" FACULTAD DE QUÍMICA.  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

  
Asesora.

**Dra. Amelia Ma de Gpe. Farrés González Saravia**

  
Supervisora Técnica  
**M. en C. Idalia Flores Argüello.**

*María Anel Olvera Montiel*  
Sustentante.  
**María Anel Olvera Montiel**

## DEDICATORIAS

A lo largo de mi vida, he aprendido que siempre hay que ver el camino y no los atajos y que no importa cuanto tengas, sino... a quien tengas para lograr tus objetivos.

Por lo que tengo la bendición de contar con grandes apoyos, a los que quiero agradecer, gente que ha estado a mi lado, apoyandome con su presencia, amistad y palabras de aliento.

A mi mamá:

Porque sin su apoyo y su sola presencia no hubiera logrado nada, GRACIAS doy a Dios!!! por darme la bendición de tener una Gran Madre!!!. Gracias a ella soy una persona feliz, TÚ ESFUERZO A VALIDO LA PENA.

A ti mamá este logro de las dos.

A mi tío Moy:

Que el tiempo es efímero y los logros son permanentes. Gracias!!! por ser parte de mi vida. Por las veces que recurro a tí y me das la mano para apoyarme y por ser un pilar en mi vida. QUE DIOS TE BENDIGA!!!.

A Edgar:

Esta es la culminación de uno de mis sueños... atrévete a soñar!!!.

## AGRADECIMIENTOS

A mi Alma Mater

Por ser forjadora de grandes profesionistas, Gracias por ser mi casa en todo este tiempo

A la Dra Amelia Farrés:

Por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo y por el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

A la M en C Idalia Flores:

Por tú tiempo y paciencia.

A la Q.F.B Julieta Sandoval:

Por tú amistad, tú tiempo, apoyo y ayuda desinteresada.

A la Q. Georgina Duarte:

Por el apoyo y la confianza que me ha brindado.

Al Ing. Fernando Jauregui:

Por ofrecerme un tema que me ha generado muchas satisfacciones.

A Vanessa Cabra y Carlos Cornejo:

Por ser mis exclusivos!!! asesores técnicos, esta tesis es también suya.

A la Familia Olvera Lozornio:

Por estar cerca de mí en todo este tiempo.

A la familia Villada Hernández:

En especial a Sergio, porque tú amistad es una gran Bendición!!!

A Miguel Angel Ramirez:

Por ser mi ángel... que me enseñó que de todos necesitamos y que mejor ayuda que la brindada de los verdaderos cuates!!! GRACIAS!!!

A: Eduardo Vázquez, Uriel Hernández, José Chávez, Oscar Isius, Ernesto Laguna, Saúl, Lisset y muchos más, por estar conmigo y crecer juntos y confirmar que la unión hace la fuerza.

A todos los integrantes del laboratorio 312, que me soportaron e hicieron de mí estancia una experiencia muy agradable, pero ante todo por su amistad.

A Pocho, Carmen y Adriana:  
En recuerdo de los momentos tan padres!! que vivimos.

Pero ante todo al ser que dirige mi vida... porque la hoja del árbol no se mueve sin tu voluntad y todo lo que pasa en mí tiene un tiempo y un porque.

GRACIAS SEÑOR!!!!!!!!!!!!

## Índice General

Introducción.....	1
1.0 Composición de la leche .....	1
1.1 Proteínas.....	1
1.1.1 Caseínas.....	3
Alfas caseínas.....	3
Beta caseínas.....	4
Kappa caseínas.....	5
1.1.2 Proteínas del suero.....	6
Albúmina sérica bovina.....	6
Alfa lactoalbúmina.....	6
Beta lactoglobulina.....	7
Inmunoglobulinas.....	7
Fracción proteosa.....	7
1.1.3 Sustancias nitrogenadas no proteicas.....	8
1.2 Carbohidratos.....	8
1.3 Lípidos.....	9
1.4 Agua.....	10
1.5 Estabilidad de las proteínas en la leche.....	10
1.5.1 Formación del sistema micelar.....	10
1.5.2 Factores que afectan la estabilidad micelar.....	11
1.5.3 Coagulación micelar.....	11
1.6 Calidad.....	12
1.6.1 Normas.....	12
1.6.2 Nueva normatividad.....	13
1.7 Producción de leche.....	14
1.7.1 Producción mundial.....	14
1.7.2 Producción nacional.....	15
1.7.2.1 Carencias del sector.....	16
1.7.2.2 México como país importador de leche.....	16
1.7.2.3 Comercialización mundial de la leche.....	17
1.8 Especificaciones normativas en México.....	18
1.9 Técnicas de secado de leche.....	19
1.10 Clasificación de leche en polvo.....	20
1.10.1 Leche en polvo de baja temperatura.....	21
1.10.2 Leche en polvo de mediana temperatura.....	21
1.10.3 Leche en polvo de alta temperatura.....	21
1.11 Principales características funcionales de la leche en polvo .....	21
1.11.1 Solubilidad.....	22
1.11.2 Viscosidad.....	22
1.11.3 Color.....	23
1.11.4 Acidez.....	23
1.12 Usos de la leche en polvo en la industria alimenticia.....	24
1.12.1 Avances en la producción de caseínas y caseinatos.....	24
1.12.2 Suero de leche.....	25
1.12.2 Obtención de las proteínas del suero de leche.....	25

1.12.3 Cambios conformacionales de las proteínas del suero .....	26
1.13 Técnicas de monitoreo de calidad.....	28
justificación.....	32
2.0 Objetivo General.....	33
2.1 Objetivos particulares.....	33
3.0 Metodología.....	34
3.1 Muestras de analizadas.....	34
3.2 Estrategia experimental.....	36
3.3 Caracterización de la materia prima.....	37
3.3.1 Determinación de humedad.....	37
3.3.2 Determinación de cenizas.....	37
3.3.3 Determinación de grasa.....	37
3.3.4 Determinación de proteína total.....	38
3.3.5 Determinación de carbohidratos totales.....	38
3.3.6 Determinación de azúcares reductores.....	38
3.4 Caracterización fisicoquímica .....	38
3.4.1 Determinación de viscosidad.....	38
3.4.2 Determinación de pH.....	38
3.4.3 Determinación de acidez.....	38
3.5 Determinación de proteína soluble.....	39
3.6 Solubilidad de proteínas.....	39
3.7 Precipitación con ácido tricloro acético.....	40
3.8 Perfiles electroforéticos.....	40
3.8.1 Método SDS – PAGE electroforesis en gel de poliacrilamida.....	40
3.8.2 Análisis electroforético.....	40
4.0 Resultados y Discusión.....	41
4.1 Composición de las muestras.....	
4.1.1 Contenido de humedad.....	44
4.1.2 Contenido de cenizas.....	45
4.1.3 Contenido de grasa.....	45
4.1.4 Contenido de proteína.....	47
4.1.5 Contenido de carbohidratos.....	48
4.1.6 Contenido de pH.....	49
4.1.7 Contenido de ácido láctico.....	50
4.1.8 Viscosidad.....	51
4.2 Análisis de solubilidad y perfil electroforético de muestras de aislados proteicos.....	54
4.2.1 Análisis de solubilidad y perfil electroforético de muestras de caseína.....	54
4.2.2 Análisis de solubilidad y perfil electroforético de muestras de caseinatos.....	55
4.2.3 Análisis de solubilidad y perfil electroforético de muestras de suero de leche y WPC.....	61
4.2.4 Análisis de solubilidad y perfil electroforético de leches enteras de referencia.....	68
4.2.5 Análisis de solubilidad y perfil electroforético de muestras problema.....	75
5.0 Conclusiones.....	97
6.0 Recomendaciones.....	98
7.0 Bibliografía.....	99

Cuadro 1 Principales componentes de la leche.....	1
Cuadro 2 Proteínas de la leche.....	1
Cuadro 3 Producción mundial de la leche de vaca.....	15
Cuadro 4 Crecimiento anual.....	16
Cuadro 5 Principales productores de la leche fluida.....	16
Cuadro 6 Países exportadores de leche descremada en polvo.....	17
Cuadro 7 Países importadores de leche descremada.....	17
Cuadro 8 Fracciones arancelarias.....	18
Cuadro 9 Especificaciones de la NMX-F-026-1997-SCFI.....	19
Cuadro 10 Métodos de elaboración de leche en polvo.....	20
Cuadro 11 Utilización de leche en polvo.....	21
Cuadro 12 Tipos de lactosuero.....	26
Cuadro 13 Características de las proteínas del suero.....	27
Diagrama I Obtención de los subproductos lácteos.....	28
Cuadro 14 Análisis proximal realizado por la DGA.....	35
Cuadro 15 Análisis químico proximal de muestras de referencia y muestras problema.....	43
Cuadro 16 Tabla de caracterización fisicoquímica de muestras de referencia y muestras problema.....	44
Grafica 1 Porcentaje de proteína soluble de muestras de referencia.....	54
Cuadro 17 Resultados del perfil electroforético y porcentaje de solubilidad para caseína.....	56
Figura 4 Perfil electroforético de caseína en función del pH.....	57
Cuadro 18 Resultados del perfil electroforético y porcentaje de solubilidad de caseinato de sodio.....	58
Figura 5 Perfil electroforético de caseinato de sodio en función del pH.....	59
Cuadro 19 Resultados del perfil electroforético y porcentaje de solubilidad de caseinato de calcio.....	60
Figura 6 Perfil electroforético de caseinato de calcio en función del pH.....	61
Cuadro 20 Resultados del perfil electroforético y porcentaje de solubilidad de suero de leche.....	64
Figura 7 Perfil electroforético de suero de leche en función del pH.....	65
Cuadro 21 Resultados del perfil electroforético y porcentaje de solubilidad de WPC.....	66
Figura 8 Perfil electroforético de WPC en función del pH.....	67
Grafica 2 Porcentaje de solubilidad de leches enteras.....	69
Cuadro 22 Resultados del perfil electroforético y porcentaje de solubilidad de leche comercial.....	70

Figura 9 Perfil electroforético de leche comercial en función del pH.....	71
Cuadro 23 Resultados del perfil electroforético y porcentaje de solubilidad de leche bronca.....	72
Figura 10 Perfil electroforético de leche bronca en función del pH.....	74
Grafica 3 Porcentaje de solubilidad de muestras problema.....	77
Cuadro 24 Resultados del perfil electroforético y porcentaje de muestra f-38.....	78
Figura 11 Perfil electroforético de muestra f-38 en función del pH.....	80
Cuadro 25 Resultados del perfil electroforético y porcentaje de 39.....	81
Figura 12 Perfil electroforético de muestra f-39 en función del pH.....	83
Cuadro 26 Resultados del perfil electroforético y porcentaje de 40.....	84
Figura 13 Perfil electroforético de muestra f-40 en función del pH.....	86
Cuadro 27 Resultados del perfil electroforético y porcentaje de f-41.....	87
Figura 14 Perfil electroforético de muestra f-41 en función del pH.....	89
Cuadro 28 Resultados del perfil electroforético y porcentaje de 42.....	90
Figura 15 Perfil electroforético de muestra f-42 en función del pH.....	92
Cuadro 29 Resultados del perfil electroforético y porcentaje de 43.....	93
Figura 16 Perfil electroforético de muestra f-43 en función del pH.....	94
Cuadro 30 Resultados del perfil electroforético y porcentaje de f-44.....	95
Figura 17 Perfil electroforético de muestra f-44 en función del pH.....	96

# INTRODUCCIÓN

---

## INTRODUCCIÓN

Los países que tienen excedentes en su producción lechera y, por tanto son los principales exportadores, han desarrollado también numerosos subproductos que presentan un precio muy atractivo, como caseinatos y aislados proteicos del suero de leche. Resulta económicamente atractivo incorporarlos a la leche fluida y leche en polvo porque pueden incidir en mejorar la funcionalidad de las preparaciones. Esto ha provocado que el diseño de formulaciones sea una práctica común en muchos países. Su presencia no influye en la percepción sensorial del producto por el consumidor, pero puede afectar la calidad nutricional y desatar problemas de alergias en personas sensibles. Por lo tanto, el control de calidad en el mercado internacional de leches en todas sus presentaciones, especialmente en la leche en polvo, debe realizarse bajo normas estrictas, que garanticen una competencia sana entre productores, así como la oferta de un producto de mayor calidad para el consumidor.

La apertura económica que ha tenido México en los últimos años ha propiciado la firma de tratados de libre comercio con países como E.U.A, Canadá y la Unión Europea, entre otros. Estos mecanismos favorecen el ingreso al país de diversos productos, cuya naturaleza debe ser verificada a fin de aplicarles los créditos fiscales y de que cumplan con restricciones arancelarias establecidas. En este contexto, el órgano responsable de verificar la información que el importador proporciona en el caso de mercancías de difícil identificación es la Administración General de Aduanas (AGA), a través de la Administración Central de Laboratorios y Servicios Centrales. Esta verificación se realiza por medio de análisis cualitativos y cuantitativos tradicionales, pero aun a nivel internacional existe controversia sobre la metodología idónea, rápida y suficiente para verificar la identidad de las fracciones proteicas de la leche en polvo que ingresa al país. Hasta el momento no existe una técnica oficial que permita determinar con certeza la adición de diferentes tipos de aislados proteicos a la leche. Ante esta situación, es prioritario desarrollar una metodología que logre identificar y cuantificar la naturaleza de la misma. Por tanto, en este trabajo se explorarán metodologías basadas en los análisis químicos tradicionales, en el análisis del comportamiento fisicoquímico, como las pruebas de solubilidad, así como la electroforesis unidimensional SDS, acoplada al análisis molecular mediante software especializado. Se tratará de proponer una metodología única o la combinación de varias para monitorear la calidad de leches comerciales o fórmulas lácteas

ANTECEDENTES

## ANTECEDENTES

La leche se define como el producto que se obtiene de la secreción de las glándulas mamarias de los mamíferos. En términos normativos, se conoce como tal a la leche de vaca, sin calostro y sin sustracción alguna de sus componentes naturales. Está constituida por proteínas (caseína y proteínas del suero), carbohidratos (lactosa), lípidos y sales minerales (Alais,1990). Es un producto alimenticio que se consume en numerosos países por su alto valor nutritivo y la calidad de su proteína, por lo que contribuye en forma importante en el diseño de la dieta diaria.

### 1.0 Composición de la leche

#### 1.1 Proteínas

La mayor parte del nitrógeno de la leche se encuentra como proteína en forma de micelas dispersas en suspensión coloidal. En las proteínas se encuentran comúnmente 20 aminoácidos, cuyo orden es establecido por la información genética y le otorga a la proteína una conformación única que le permite llevar a cabo una función específica.

La concentración de proteína en la leche varía de 3.0 a 4.0% (30-40 gramos por litro, ver el Cuadro 1), depende de la raza de la vaca y la alimentación. Frecuentemente se encuentra relacionada con la cantidad de grasa presente. Las proteínas de la leche se distribuyen en dos grupos principales, caseínas y proteínas del suero, que se pueden separar por precipitación de las primeras a pH 4.5-4.6, a 20 °C (Spreer, 1991).

Cuadro 1. Componentes principales de la Leche

Composición de la leche de vaca	Porcentaje
Agua	87.0
Proteínas	3.2
Lípidos	3.5
Carbohidratos	4.7
Minerales	0.7

(Alais,1990)

Del total de las proteínas de la leche, las caseínas corresponden a la fracción insoluble ( 80%) , la fracción soluble son las proteínas del suero de leche (15%) y el 5% restante lo ocupa la fracción de nitrógeno no proteico. En el cuadro 2 se presenta el porcentaje y clasificación de cada fracción.

Cuadro 2. Composición de la Fracción Nitrogenada de las Proteínas de la Leche

Proteínas de la Leche	Porcentaje
<b>Fracción insoluble</b>	<b>80</b>
caseína $\alpha$	45-55
caseína $\beta$	23-35
caseína $\gamma$	8-15
caseína $\kappa$	3-7
<b>Fracción soluble</b>	<b>15</b>
$\alpha$ - lactoalbúmina	2-5
$\beta$ -lactoglobulina	7-12
seroalbúmina	0.7-1.3
inmunoglobulina	1.99-3.3
proteasa-peptona	2.6
<b>Nitrógeno no proteico</b>	<b>5</b>
aminoácidos libres	0.3-0.4
nucleótidos, urea	
<b>Nitrógeno total</b>	<b>100</b>

(Varnam y Sutherland,1994).

### 1.1.1 Caseínas.

Las caseínas son fosfoproteínas (0.85% P) asociadas al calcio que forman un coágulo cuando precipitan a partir de la leche descremada o entera. Esta propiedad se emplea prácticamente para la elaboración de quesos y leches fermentadas. Las proteínas del suero no presentan enlaces éster fosfato (Walstra y Jenness, 1984). Casi toda la caseína de la leche se encuentra en las micelas, estructuras supramoleculares que adoptan una forma globular en el espacio y se estabilizan por la k caseína y la interacción con iones calcio. Los diversos tipos de caseínas se distinguen por sus pesos moleculares, su capacidad de ligar fósforo y calcio, punto isoeléctrico, entre otras propiedades. La movilidad electroforética en geles de almidón o acrilamida es la técnica empleada rutinariamente para asignar pesos moleculares, que se expresa en Kilo Daltones (KDa), y para tener un valor preciso deben emplearse metodologías que consideren el número de aminoácidos y de residuos glicosilados que estén presentes.

De acuerdo a los criterios mencionados, las caseínas se clasifican en alfa, beta, k y gamma caseínas. Estas, a su vez, presentan el fenómeno de microheterogeneidad, de acuerdo a la variabilidad en fosforilación, formación de puentes disulfuro, hidrólisis por las proteasas de la leche, variaciones en glicosilación y polimorfismo genético. Las caseínas son proteínas muy resistentes a desnaturalización por calor, puesto que la leche puede permanecer 24 h a 100°C sin que se presente coagulación. Sin embargo, el efecto de la temperatura en otros parámetros, como pH y balance de sales, puede causar su precipitación (Fox y McSweeney, 1998).

### Alfa caseína.

La  $\alpha$ -caseína es la más abundante de las caseínas y constituye del 38 a 42% de las caseínas micelares; los péptidos resultantes de su hidrólisis contribuyen al sabor en productos lácteos (Madrid, 1990). Está compuesta por dos fracciones:  $\alpha_{s1}$  y  $\alpha_{s2}$ . La primera se encuentra en mayor proporción, tiene un peso molecular de 23 KDa y un grupo fosfato adicional localizado en el residuo Ser 41, consta de cuatro variantes genéticas: A, B, C y D, de acuerdo a un orden decreciente en su movilidad en geles de almidón a pH 8.6 y 7M de urea por diferencias en el número de aminoácidos. Su carga neta es el resultado de una distribución de cargas que no permite la formación de  $\alpha$ -hélices en forma aleatoria. La  $\alpha_{s0}$  parece ser una microvariante de la  $\alpha_{s1}$ , tiene un peso molecular de 22 KDa, precipita con 0.4 M de cloruro de calcio a pH 7.0 y 4 °C. Ambas son capaces de estabilizarse por la  $\kappa$ -caseína contra la precipitación por calcio. Debe señalarse que en la literatura se encuentran diferencias en cuanto a la asignación de pesos moleculares por variaciones en la metodología empleada para calcularlos, así como en la nomenclatura de las variantes genéticas. En tanto, la  $\alpha_{s2}$  es la más hidrofílica de todas las caseínas debido a que contiene en mayor número residuos catiónicos, lo que la hace sensible a los iones calcio. Su estructura sugiere interacciones electrostáticas que dependen del pH y su peso es de 25 KDa. Posee 207 aminoácidos y tiene de 10 a 13 grupos fosfatos unidos por molécula. Se caracteriza por el bajo contenido de prolina y, al igual que la  $\kappa$ -caseína, contiene dos residuos de cisteína por molécula (Fox y McSweeney, 1998).

## Beta caseína y Gama caseína

La  $\beta$  caseína se rompe en péptidos de sabor amargo y constituye del 34 al 36% de las proteínas micelares. (Amiot, 1994). Esta es la más hidrófoba de todas las caseínas y se compone de ocho fracciones polimórficas: A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, B, B<sub>2</sub>, C, D y E. La  $\beta$ -caseína está formada por 209 residuos de aminoácidos, en donde arginina se encuentra en el extremo N-terminal y valina en el C-terminal. Tiene un peso molecular de 24 KDa y un punto isoelectrónico de 5.0. Estudios posteriores han demostrado la existencia de la  $\gamma$ -caseína, resultado del rompimiento de la  $\beta$  caseína en el enlace Lys<sub>28</sub>- Lys<sub>29</sub>. La  $\gamma$ -caseína tiene un punto isoelectrónico de 5.8 y tiene un peso molecular de 11 KDa. También existen diferentes formas polimórficas (A<sup>4</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, B<sub>1</sub>) que van del residuo 29 al 209. Las variantes de ambas caseínas corresponden entre sí.

La presencia de los átomos de fósforo altera significativamente las características de la  $\beta$ -caseína, y genera una concentración de grupos cargados en la región del N-terminal, mientras que la porción C-terminal es altamente hidrofóbica. Los numerosos residuos de prolina distribuidos a lo largo de la molécula ejercen un efecto conformacional, evitando la formación de la  $\alpha$  hélice. La carga neta de la  $\beta$ -caseína se encuentra contenida en su totalidad en el péptido N-terminal de 25 aminoácidos con 4 de los 5 grupos fosfato, 7 carboxilos y sólo dos cargas positivas a cada extremo de este péptido (Fox y McSweeney, 1998).

## K caseína.

Contiene un solo residuo fosforilado que permite fijar sólo algunos iones calcio y su solubilidad no resulta afectada por su presencia, lo que le confiere estabilidad a la micela frente a estos iones calcio. Durante las primeras investigaciones sobre la composición de las proteínas de la leche, la caseína completa se pudo separar en dos fracciones:

- 1) la fracción sensible al calcio
- 2) la fracción insensible a la precipitación del calcio.

Estas dos fracciones fueron designadas como  $\alpha_{s1}$  y  $\kappa$ -caseínas, respectivamente. La  $\kappa$ -caseína tiene propiedades químicas y físicas únicas al compararse con otras proteínas de la leche. Algunas propiedades tienen consecuencias inmediatas en el estado físico de la leche como son:

- 1) se mantiene soluble cuando las demás proteínas precipitan; 2) tiene la capacidad de estabilizar a otras caseínas contra la precipitación en presencia de calcio, por la formación de micelas coloidales; 3) es la única de las caseínas que contiene cadenas laterales de carbohidratos; 4) es la única caseína que contiene residuos de cisteína. Su punto isoeléctrico es de 4.1 – 4.5 y su peso molecular de 19 KDa.

La estructura primaria de la  $\kappa$ -caseína con sus características de carga permite predecir una estructura solvatada, desplegada o con una pequeña hélice en el segmento C-terminal, de más de 50 residuos, mientras que la porción central aparece plegada en forma compacta en una estructura globular, debido al carácter altamente hidrofóbico de la región. Los residuos de cisteína se encuentran en la región más hidrofílica de la  $\kappa$ -caseína y en la superficie participa activamente en las uniones intermoleculares (Fox y McSweeney, 1998).

### 1.1.2 Proteínas del suero.

A diferencia de las caseínas, estas proteínas son compactas, globulares y solubles en un intervalo de pH muy amplio (incluso a pH ácidos, cuando se han desnaturalizado por el calor). Constan por lo menos de ocho fracciones diferentes, entre las cuales destacan la  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina, las inmunoglobulinas, la albúmina sérica bovina y fracciones proteosa-peptona. Son sensibles a altas temperaturas y en menor grado al pH ácido (condiciones inversas a las caseínas) debido a que su mecanismo de estabilidad es por hidratación y no por carga eléctrica; son las primeras proteínas de la leche en desnaturalizarse y su calentamiento libera grupos sulfhidrilo que reducen el potencial oxido-reducción, lo que puede llegar a inhibir parcialmente las reacciones de oxidación. En su composición intervienen la mayor parte de los aminoácidos, lo que favorece la estabilidad de las mismas en medios ácidos, en comparación con las propias caseínas, por lo que su valor nutritivo es mejor (Keating, 1999). Las características de los componentes principales son las siguientes:

## Albúmina sérica bovina

Esta molécula aparece sólo con una cadena peptídica con un grupo  $-SH$  libre en la posición 34 amino terminal y con 17 enlaces disulfuro intramoleculares. Tiene un peso molecular de 66 KDa y es idéntica a la albúmina del suero sanguíneo en todas sus propiedades medidas e inmunológicas, excepto en el comportamiento electroforético a pH 4.0 - 4.8, que es la zona en que se localiza el punto isoeléctrico.

### $\alpha$ -lactoalbúmina

Se encuentra en cualquier tipo de leche que contenga lactosa, ya que se requiere de la biosíntesis de la primera. Al parecer, existe una relación entre la cantidad de  $\alpha$ -lactoalbúmina y lactosa presente. Se conocen dos variantes genéticas, la A y B, que sólo difieren en una sola sustitución en la posición 10, en donde la A tiene lisina y la B arginina, ambas con un peso molecular de 14 KDa. La función de la  $\alpha$ -lactoalbúmina es la síntesis de lactosa. Es una proteína globular que presenta una estructura primaria, rica en lisina y triptofano, precipita a pH 5.1. No coagula por acción del cuajo o de los ácidos, sólo por efecto del calor, ya que su estabilidad depende del agua de hidratación y no de las cargas eléctricas que caracterizan a las micelas de caseína.

### $\beta$ -lactoglobulina

Existen cuatro variantes genéticas de esta unidad. Su función biológica consiste en transferir gran variedad de inmunoglobulinas a las crías. Es la proteína del suero más abundante y soluble; su peso molecular es bajo (18 KDa) y su punto isoeléctrico 5.2. Es la principal proteína portadora de grupos sulfhidrilo, que son modificados o separados en el curso de la desnaturalización y que intervienen en la formación del sabor "a cocido" después del tratamiento térmico de la leche. Bikker et. al, 2000 han realizado estudios en el comportamiento reológico de las variantes genéticas de esta fracción cuando son adicionadas durante la rehidratación de la leche en polvo y sus resultados demuestran que la adición en exceso de esta proteína favorece las propiedades funcionales del producto.

## **Inmunoglobulinas**

Las inmunoglobulinas son proteínas que participan en la defensa del organismo ante la presencia de moléculas y organismos ajenos. Existen tres clases de inmunoglobulinas en la leche de vaca: inmunoglobulina G (IgG) con un peso molecular de 52 KDa; inmunoglobulina A (IgA) con peso molecular 52 – 56 KDa e inmunoglobulina M (IgM), con peso molecular de 69 KDa. Así mismo se les ha encontrado en el calostro, suero sanguíneo y en secreciones como saliva, nasal y vaginal. Su punto isoeléctrico va de 4.6 – 6.0 (Walstra y Jenness, 1987).

## **Fracción proteosa-peptona**

Esta fracción de proteínas consiste en una mezcla de fosfoglicoproteínas termoestables, solubles a pH 4.6 e insolubles en ácido tricloroacético al 12%. Los principales componentes de la fracción se han identificado de acuerdo a sus moviidades electroforéticas a pH 8.6. La movilidad va en orden decreciente: 3>5>8. Tienen un peso molecular de 4 – 40 KDa y un punto isoeléctrico de 3.1.

El componente 3 se encuentra en la fracción del suero. Se caracteriza por su alto contenido de carbohidratos (alrededor de, 17.3%); 0.5% de fósforo; bajo contenido de aminoácidos y componentes sulfurados. Las unidades de carbohidratos consisten en galactosamina, glucosamina, galactosa, fucosa y ácido siálico. La fracción de proteosa-peptona parece estar relacionada con el factor inhibidor de la lipólisis que se encuentra normalmente en la leche (Varnam y Sutherland, 1994).

### **1.1.3 Sustancias nitrogenadas no proteicas**

Constituyen una pequeña proporción de la leche, con una gran cantidad de sustancias de peso molecular aproximado a 5 KDa; son dializables y permanecen solubles a pH 4.5 – 4.6 (Fox y McSweeney, 1998).

## 1.2 Carbohidratos

Entre los carbohidratos presentes en la leche, la lactosa se encuentra en una proporción del 4.7% al 5.2%, y es el componente menos variable. También existen mono y polisacáridos en menor proporción (galactosamina, glucosamina, galactosa, fucosa y ácido siálico) en comparación con la lactosa, que es el carbohidrato principal (Spreer,1991).

A diferencia de la concentración de grasa o proteína en la leche, la concentración de lactosa es similar en todas las razas lecheras, se encuentra en dispersión molecular y no puede alterarse fácilmente con variaciones en la alimentación de los animales. Es un disacárido reductor formado de glucosa y galactosa, que se muestran en la figura 1. Estos azúcares también se encuentran en forma libre en una concentración mucho menor en la leche: 16 mg/100 g y 15 mg/ 100 g, respectivamente. La leche es la única fuente de galactosa disponible para el ser humano. La lactosa se sintetiza en la mama a partir de glucosa sanguínea, y en los ruminantes a partir de ácidos volátiles producidos en el rumen; es soluble y forma parte esencial del suero de leche, puede ser fermentada por bacterias lácticas y producir ácido láctico principalmente. Su cuantificación es útil para determinar adulteración en leche por adición de agua o suero de leche (Varnam y Sutherland,1994).

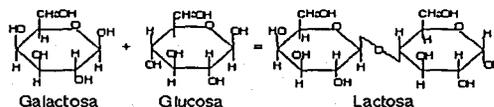


Figura 1: La lactosa se sintetiza en la ubre a partir de glucosa y galactosa (Spreer, 1991)

## 1.3 Lípidos

Normalmente los lípidos constituyen del 3.5 hasta el 6.0% de la leche, este valor cambia de acuerdo a la raza y las prácticas de alimentación. La grasa se sintetiza en la glándula mamaria a partir de ácidos grasos volátiles, (Alais,1990). Está presente como glóbulos pequeños suspendidos en agua, lo que la hace inestable y fácil de extraer sin modificar otros componentes. Sus modificaciones no causan grandes cambios en la estructura fisicoquímica, sin embargo, alteran notablemente la percepción organoléptica del producto (Keating,1999).

Cada glóbulo se encuentra rodeado de una capa de fosfolípidos, que evita la aglutinación entre sí, repeliendo otros glóbulos de grasa y atrayendo agua. Siempre que esta estructura se encuentre intacta, la leche permanece como una emulsión. La mayoría de los lípidos en los glóbulos se encuentra en forma de triglicéridos formados por la unión de glicerol con ácidos grasos, como se observa en la Figura 2, que en su mayor parte son de cadena corta (entre cuatro y diez átomos de carbono) producidos a partir de unidades de ácido acético derivadas de la fermentación en el rumen. El ácido butírico es específico de la leche de rumiantes, cuya proporción varía de acuerdo a la dieta y temperatura ambiente. El más abundante es el oleico, acompañado de los polinsaturados linoleico y linolénico (Walstra y Jenness, 1984; Spreer, 1991).

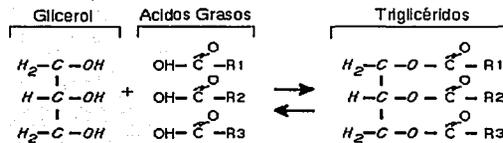


Figura 2 Estructura de los triglicéridos (R1, R2, R3, representan las cadenas de ácidos grasos que le otorgan a los triglicéridos sus características individuales (Spreer, 1991).

## 1.4 Agua

En todos los animales el agua es el nutrimento requerido en mayor cantidad y la leche suministra una gran cantidad de la misma, puesto que contiene aproximadamente 90%, lo que la hace susceptible a adulteraciones por adición de la misma. El volumen de agua es regulado por la lactosa, que posteriormente es transportada y distribuida por el torrente sanguíneo (Amiot, 1994).

## 1.5 Estabilidad de las proteínas de la leche

### 1.5.1 Formación del sistema micelar

La estabilidad de la leche se debe a la formación de micelas de los diferentes monómeros de la caseína. A diferencia de otros agregados proteínicos de tamaño fijo que existen en las células, las micelas de caseína tienen una amplia variedad de tamaños, con un radio mínimo de aproximadamente 20 nm a 300 nm en función de diversos factores (raza, especie, estado de lactancia, etc.). La composición de las micelas está dada por las diferentes fracciones proteicas ya descritas (caseína  $\alpha_s$ -1,  $\beta$ ,  $\kappa$ -caseínas derivadas de éstas y fragmentos peptídicos), por compuestos salinos (calcio y fosfato), por citrato y por una fracción glucosídica.

La presencia de los grupos fosforilados de las caseínas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  y  $\beta$  les confiere una fuerte afinidad por el calcio, a diferencia de la  $\kappa$ -caseína, que tiene baja afinidad por el calcio y se distingue por su alta sensibilidad a la acción proteolítica de la renina. En las micelas de caseína una parte del fosfato y del calcio se encuentra bajo la forma de fosfato coloidal, el cual las estabiliza. Existen diversas hipótesis que tratan de explicar la distribución de los componentes de las micelas, así como su estabilidad interna. Sin embargo, hay dos factores que lo explican:

- 1) Las micelas portan un exceso de cargas negativas que provocan fuertes repulsiones electrostáticas que impiden el acercamiento entre ellas.
- 2) Las micelas fijan una importante cantidad de agua. Una parte de ésta envuelve a la micela por puentes de hidrógeno formando una cubierta de hidratación que la estabiliza.

La importancia de cada uno de estos dos factores depende de la composición de la fase acuosa (pH y concentración de calcio, fosfatos, citrato, etc.) y de la composición de las micelas (fosfato de calcio coloidal y proporción de caseínas). La desestabilización de la micela trae como consecuencia la coagulación (Fox y McSweeney, 1998).

### 1.5.2 Factores que afectan la estabilidad micelar

Existen diversos factores que modifican la composición tanto de la fase acuosa como de la micelar. Entre éstos se encuentran la temperatura y el pH. La refrigeración de la leche provoca una solubilización reversible del calcio y del fosfato hacia la fase acuosa, mientras que el calentamiento provoca una disminución importante del calcio coloidal por precipitación. Por otra parte, la acidificación causa la solubilización del calcio y fosfatos coloidales hacia la fase acuosa, ya que hay una disminución en las cargas de los grupos ácidos de la caseína, lo cual reduce el potencial de carga en la superficie y el nivel de hidratación, con lo que aumenta la solubilización de sales hacia la fase acuosa. Cerca del punto isoeléctrico de las caseínas se forma una red proteínica insoluble constituida por uniones intermoleculares de tipo electrostático e hidrofóbico, con lo que se produce la coagulación de las micelas de caseína de la leche.

### 1.5.3 Coagulación micelar

La coagulación puede ser lograda por tres métodos, dependiendo de la naturaleza de los productos:

- 1) Los electrolitos ácidos provocan la desestabilización de las micelas de caseína sin fraccionarlas. Esta desestabilización puede revertirse al cambiar el pH al original. Generalmente se usa ácido acético.
- 2) Enzimas proteolíticas (de origen animal, bacteriano, fúngico o vegetal). El más utilizado es el cuajo de ternera, que es obtenido del cuarto estómago (abomaso o cuajar) y se conoce como renina o quimosina; está compuesto por una mezcla de proteasas ácidas (quimosina EC 3.4.23.4), que se encuentra aproximadamente en un 85%, y de la pepsina (EC3.4.23.1) que se encuentra en un 15%. Sirve como referencia para otros agentes coagulantes y se le conoce como renina.

La coagulación enzimática consiste en dos fases: una fase primaria y una fase de agregación o secundaria. Sin embargo, existe una etapa en la que  $\alpha_{s1}$  y  $\beta$  caseínas son gradualmente hidrolizadas por largo tiempo, lo que algunos autores la denominan fase terciaria. Durante la fase primaria se lleva a cabo una ruptura entre los aminoácidos 105 y 106 de la k-caseína, que son fenilalanina y metionina. Esta hidrólisis tiene como resultado la separación de la fracción hidrofílica soluble (Amiot, 1994, Fox y McSweeney, 1998).

## 1.6 Calidad

La calidad se define como el acatamiento de normas de calidad que permiten la idoneidad para el uso de un producto o servicio determinado. Estos requerimientos corresponden a un grupo de especificaciones ya establecidas que se relacionan directamente con las diferentes propiedades de cada producto en particular (Manual de Calidad SS, 1999). La calidad fisicoquímica y comercial de la leche debe ser garantizada, por lo que se han establecido denominaciones, especificaciones comerciales y métodos estándares de prueba, que incluyen métodos microbiológicos y fisicoquímicos para evaluar productos lácteos y sustitutos (Richardson, 1985). El AOAC (The Association of Official Analytical Chemists) establece métodos validados que incluyen pruebas de plataforma (acidez, densidad, grasa y gravedad específica) y análisis rutinario.

### 1.6.1 Normas

La Norma Mexicana NMX-F-026-1997 de la Secretaría de Economía (SECOFI), se basa en métodos estándares de prueba y establece denominaciones de los diferentes tipos de leche de acuerdo a su proceso, así como a sus especificaciones mínimas de calidad. De 1988 a 1999, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios (1988), era el instrumento encargado de verificar el cumplimiento obligatorio. En este reglamento se incluían denominaciones y especificaciones sanitarias, fisicoquímicas y comerciales para la leche de vaca.

Sin embargo, fue modificado en 1998 para convertirse en el Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios de la misma Ley General de Salud. En éste se eliminaron las denominaciones y especificaciones fisicoquímicas de la leche y centra su atención únicamente a los aspectos sanitarios.

Este cambio creó un vacío en la regulación de la calidad de la leche, especialmente en aspectos fisicoquímicos e información comercial ya que, fuera del reglamento anteriormente señalado, la única disposición normativa para la leche es la Norma Mexicana NMX-F-026, que se refiere a la denominación y especificaciones comerciales de la leche. No obstante, esta norma es sólo de referencia y, por tanto, no es de cumplimiento obligatorio y no hay sanción por parte de la autoridad cuando algún particular no cumple con la misma.

## 1.6.2 Nueva normatividad

El desarrollo de una norma para la leche de vaca con carácter de cumplimiento obligatorio es necesario y prioritario, tomando en cuenta las circunstancias actuales de apertura de los mercados en el mundo. Esto resulta que, entre otras cosas, se presenten en el comercio entre México y en otros países barreras no arancelarias, mientras que para el mercado interno sólo se consideran elementos sanitarios como la única forma de protección al consumidor. En este sentido, sin un marco normativo adecuado, nuestro país no estará en posibilidades de exigir los requisitos de calidad a los productos lácteos de importación, de la misma forma en que se exige al sector exportador de México. Por el momento, sólo se tiene el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PRY-NOM-155-SCFI-2001 (Diario Oficial de la Federación del 14 de noviembre del 2001), para Leche, Imitaciones y Fórmulas Lácteas - Denominación, Especificaciones Físicoquímicas, Información Comercial y Métodos de Prueba. Este proyecto de norma pretende establecer denominaciones comerciales de diferentes tipos de leche que se comercializan dentro del territorio mexicano, los cuales deben corresponder a las especificaciones establecidas por dicha norma que será de carácter obligatorio. En este contexto las especificaciones físicoquímicas son las mismas que la norma anterior, sin embargo, la denominación de fórmula láctea se ofrece de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Esta norma no concuerda con ninguna norma internacional por no existir referencia alguna al momento de su elaboración.

## 1.7 Producción de leche

### 1.7.1 Producción mundial

A nivel mundial, en los últimos años, la Unión Europea (UE) ocupa el primer lugar de producción de leche de vaca (SAGAR, 2001), debido a su alto grado de industrialización y a los avances en el área de genética y zootecnia. En el cuadro 3 se presenta la producción en toneladas producidas por los diferentes continentes a partir de 1996, de los cuales el incremento global en la producción hacia el año de 1999 es de un 2% anual; Norte América ocupa el segundo lugar al registrar el mayor crecimiento (4%).

**Cuadro 3. Producción mundial de leche de vaca de 1996 – 1999  
(SAGAR,2001)**

PAIS	Miles de Toneladas Métricas			
	1996	1997	1998	1999
N. América	85.447	86.983	87.575	89.040
S. América	32.292	33.772	35.364	36.625
UE	121.505	121.186	120.478	120.026
E. Occ.	3.856	3.867	3.850	3.840
E. Oriental	17.178	17.370	17.380	17.850
Rusia	51.800	47.750	47.700	46.600
S. Asia	33.500	34.500	35.500	36.000
Asia	14.953	15.316	15.750	16.100
Oceanía	19.362	20.774	21.295	21.390
<b>TOTAL</b>	<b>379.893</b>	<b>381.518</b>	<b>384.892</b>	<b>387.471</b>

FUENTE: Foreign Agricultural Service, / USDA, Washington.

La producción de leche a nivel mundial tiene una variación anual ligera (1 a 2 %), y el 65% de ésta se concentra en países desarrollados (Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda, Japón, Canadá, Noruega, Suiza), lo que limita la venta a los países restantes por restricciones de producción. En años recientes, el incremento en la producción de leche en Asia, Latinoamérica y Oceanía ha sido favorecido por una declinación de la producción lechera de Europa Oriental y Rusia. Se espera que estas regiones presenten un crecimiento importante en producción local a mediano plazo (próximos 10 años) (FAO, 2001)

## 1.7.2 Producción Nacional

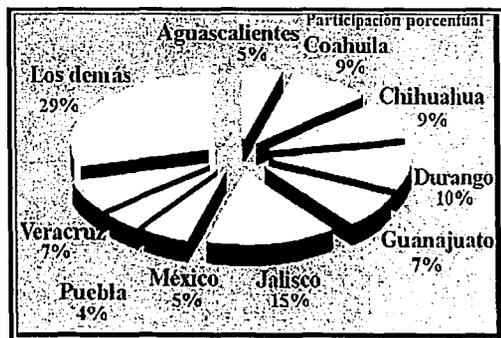
La producción de leche de vaca en México se ha incrementado desde 1989 ( ver cuadro 4 ). En el año 2000, la SAGAR reportó la cifra preliminar de 9.304 millones de toneladas, lo que representó un alza significativa de 3.700 millones de toneladas en comparación a lo producido en 1989, cuando se obtuvieron 5.577 millones de toneladas. El incremento en la producción mexicana de leche se debió en gran medida a las políticas gubernamentales que se establecieron respecto a la liberación de precios de la misma, además de que se otorgaron beneficios económicos para incentivar la producción nacional y un mayor control en los cupos de las importaciones (SAGAR-INEGI, 2001). En la República Mexicana el 70% de la producción se da en los estados del norte, Bajío, Golfo y centro del país ( ver cuadro 5 ).

Cuadro 4 . Producción anual de leche

LECHE DE BOVINO PRODUCCION NACIONAL 1989-2000. (MILES DE LITROS)		
AÑO	PRODUCCION	CRECIMIENTO ANUAL (%)
1989	5,577,309	---
1990	6,141,545	10.1
1991	6,717,115	9.4
1992	6,966,210	3.7
1993	7,404,078	6.3
1994	7,320,213	-1.1
1995	7,398,598	1.1
1996	7,586,422	2.5
1997	7,848,105	3.4
1998	8,315,711	6.0
1999	8,877,314	6.8
2000 <sup>1</sup>	9,304,979	4.8

<sup>1</sup> Cifras preliminares  
FUENTE: Centro de Estadística Agropecuaria, SAGARPA

Cuadro 5. Principales Estados productores de leche fluida en 2001



Sin embargo, la producción nacional de leche (fresca y deshidratada) resulta insuficiente ante la demanda aproximada de 9.3 millones de litros que se consumen diariamente en el país (SAGAR INEGI, 2001).

### 1.7.2.1 Carencias del sector lechero

Este sector es heterogéneo. Si bien existen unas cuantas empresas altamente tecnificadas, la mayor parte de las cerca de 70 mil empresas primarias productoras de leche aún cuentan con sistema de ordeña estacional ordinario. No tienen instalaciones y equipo técnico para recibir y transformar la leche líquida en los volúmenes que se requieren, además de que no existen condiciones suficientes para la deshidratación láctea en el mercado nacional. En contraste, el pequeño grupo de industrias cuenta con infraestructura, ganado y mano de obra especializados, que le permite alimentar a su ganado con forrajes formulados especialmente para la mayor producción de leche (SEDESOL, 2001).

### 1.7.2.2 México como país importador de leche

México se ha convertido en el primer importador de leche descremada y entera en polvo o deshidratada a nivel mundial (Cuadro 7), al consumir el 45% de las exportaciones totales, seguido de Argelia y Japón. Australia y Nueva Zelanda son los principales exportadores de leche descremada en polvo en el mundo. En el 2000 estos dos países exportaron un volumen de 197 mil toneladas cada uno (Cuadro 6). No obstante, esta cifra disminuyó para ambos, siendo mayor para Nueva Zelanda, con el 8.37% en comparación al año anterior. Estados Unidos y Canadá ocupan el primer lugar de exportación de leche entera en polvo (SAGARPA-INEGI, 2001).

Cuadro 6. Exportadores de leche descremada en Polvo (2001)

	Miles de Toneladas Métricas
Bélgica	40
Rusia	45
Holanda	49
Alemania	50
Polonia	90
EU	145
Australia	197
N. Zelanda	197

FUENTE: Foreign Agricultural Service / USDA.

Cuadro 7. Importadores de leche descremada en polvo(2001)

	Miles de Toneladas Métricas
Alemania	30
Holanda	35
Brasil	47
Japón	60
Argelia	94
México	130

FUENTE: Foreign Agricultural Service / USDA.

### 1.7.2.3 Comercialización mundial de la leche

El comercio mundial maneja tradicionalmente volúmenes grandes de leche en polvo, ya sea descremada o entera, del orden de 120 mil toneladas por año. Esta presentación en polvo permite prolongar la vida de anaquel y un simple manejo del producto para su almacenamiento y transporte. Sin embargo, es susceptible de adulteración con la finalidad de encubrir su naturaleza, composición o características comerciales mediante la adición de concentrados proteicos, con lo cual se pretende obtener mayores rendimientos, con la consiguiente ganancia económica en su venta.

### 1.8 Especificaciones normativas en México

La norma NMX-F-026-1997-SCFI y el proyecto de norma (PROY-NOM-155-SCFI-2001) definen a la leche en polvo como la leche a la cual se le ha eliminado cuando menos el 86% del agua propia de la leche descremada o parcialmente descremada, sin sustracción alguna de sus componentes naturales o adición de otros similares, ajustándose a las especificaciones técnicas de la leche que se denomine (Secretaría de economía y Dirección General de Normas 2001). En el cuadro 8 se observan las especificaciones para leche en polvo en sus diferentes presentaciones en cuanto a parámetros químicos. Todas las leches importadas que cumplan con esta denominación se considerarán clasificadas en el Capítulo Cuatro de la Tarifa de la Ley del Impuesto General de Importación, publicado en el Diario Oficial de la Federación el Lunes 19 de Agosto de 1999, que corresponde al 2% sobre producto.

**Cuadro 8. Especificaciones de producto de acuerdo a la NMX-F-026-1997-SCFI**

Especificaciones	Leche entera	Parcialmente descremada	Semi-descremada	Descremada
Grasa butírica %	min 2.6	min 1.5	min 1.3	min 1.5
Sólidos no grasos de la leche	min 69	min 69	min 82	min 93.5
Humedad %	máx 4	máx 4	máx 4	máx 4
Proteínas*	min. 3.4	min. 3.4	min. 3.4	min. 3.4
pH	6.2	6.2	6.2	6.2
Cenizas %	6.05	7.15	7.50	8.15
Color	amarillo-claro	amarillo-claro-crema	amarillo-claro	blanco-amarillo

\* El porcentaje de proteína en todas las presentaciones es mínimo de 3.4 %, lo que debería de incrementar en aquellas denominaciones como descremada y semi-descremada (Dirección General de Normas, 2001).

En los procesos de industrialización de la leche se destruyen algunos nutrientes, especialmente las vitaminas que contiene presentes naturalmente en la leche; la magnitud de las pérdidas depende del nutriente y del método de procesamiento empleado. Sin embargo, los nutrientes dañados durante el procesamiento se pueden reemplazar mediante la fortificación de la leche. Actualmente se permite la adición de vitaminas A y D, al igual que de pequeñas cantidades de emulsionantes o antiapelmazantes (fosfolípidos y dióxido de silicio amorfo) en la leche en polvo.

Los productos que no cuenten con las características normativas de leche se denominarán **fórmula láctea o preparaciones lácteas**, de acuerdo a la norma NMX-F-026-1997-SCFI y PROY-NOM-155-SCFI-2001. Estos resultan de la recomposición de los ingredientes propios de la misma: caseína en cualquiera de sus formas, lactosa, suero de mantequilla, suero de quesería, concentrado de suero y agua potable o purificada en las cantidades necesarias para ajustarlo a las especificaciones técnicas de la leche que se denomine. También se considera la adición de ingredientes de origen vegetal y/o químico: grasa vegetal, aceite parcialmente hidrogenado, dextrinas, gomas, entre otros. Este tipo de productos tienen fracción arancelarias específicas que van desde un 90% hasta 106% de impuesto sobre producto (Diario oficial, 2000, capítulo 4).

## 1.9 Leche en polvo

La obtención de leche en polvo se ha incrementado por ser la mejor forma de conservación, especialmente en lugares donde la producción no es uniforme todo el año. Además, ocupa menos espacio para su almacenamiento y transporte. El mayor volumen de producción le corresponde a la leche descremada en polvo, debido a las múltiples aplicaciones industriales y en la alimentación animal. La leche en polvo entera se utiliza fundamentalmente para la alimentación infantil y leches rehidratadas de consumo. La leche en polvo se elabora de acuerdo a la clasificación que hace referencia al tratamiento térmico que ha recibido, establecida por el American Dry Milk Institute (ADMI, 1971). En el cuadro 9 se presentan las características funcionales de acuerdo a los tratamientos térmicos, así como los usos comerciales a los cuales se puede destinar.

Cuadro 9 . Utilización de leches en polvo de tratamiento térmico bajo, medio y alto

Producto	Tipo de leche en polvo	Características
Leche reconstituida y bebidas lácteas	Tratamiento bajo /medio 65°C por 30 min.	Alta solubilidad, mínimo aroma a cocido
Leche evaporada recombinada	Tratamiento alto 120°C por 5 seg.	Estabilidad al calor, alta viscosidad
Queso	Tratamiento bajo 65°C por 30 min	Coagulabilidad
Helado	Tratamiento medio 76° - 85°C por 30 min.	Emulsificación ,formación de espuma, absorción de agua
Pastelería	Tratamiento alto 120°C por 5 seg.	Modificación de textura, absorción de agua
Productos cárnicos	Tratamiento alto 120°C por 5 seg.	Emulsificación, gelación, absorción de agua
Panadería	Tratamiento alto 120°C por 5 seg.	Unión de agua, modificación de textura

(Fox y McSweeney, 1998)

El American Dry Milk Institute (ADMI,1971) basa su clasificación en la cantidad de proteína de suero no desnaturalizada que contienen por gramo. Esta cantidad se expresa como índice de nitrógeno de las proteínas de suero (Whey Protein Nitrogen Index WPNI). El grado de desnaturalización está determinado por el tratamiento térmico sobre las proteínas de la leche en polvo y tiene dos etapas:

1. La alteración de las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas, cuya consecuencia es la desnaturalización.
2. La agregación de las proteínas que origina la coagulación ( Fox y McSweeney,1998).

### 1.9.1 Leche en polvo de baja temperatura

El tratamiento térmico es equivalente a una pasteurización normal, donde las proteínas no han sufrido ninguna desnaturalización ni agregación, por lo que se le denomina "Low-heat powder" y el contenido mínimo en proteínas del suero no desnaturalizadas tiene que ser de 6.0 mg/g.

### **1.9.2 Leche en polvo de mediana temperatura**

Los intervalos de temperatura van entre 76.5°C – 85°C durante 15 – 30 minutos. Presenta un cierto grado de desnaturalización y agregación de sus proteínas debido a la formación de complejos entre la  $\beta$ -lactoalbúmina y la  $\kappa$ -caseína. Este tratamiento ejerce un efecto bactericida. En el caso de la leche entera produce la formación de grupos reductores y aumenta la capacidad de conservación y el contenido de proteínas del suero no desnaturalizadas va de 1.5 y 6.0 mg/g en la leche en polvo.

### **1.9.3 Leche en polvo de alta temperatura**

Los tratamientos térmicos son más intensos, entre 90°C y 110°C, incluso de 121°C, con un tiempo de tratamiento de hasta un segundo, por lo que las proteínas están desnaturalizadas y agregadas debido a las interacciones entre las proteínas del suero a través de los grupos sulfhidrido. La leche recibe el nombre de "High-heat powder". Este tipo de leches es más solubles y de mejor sabor y contiene menos de 1.5 mg/g de proteína del suero no desnaturalizada (Early, 1999).

## **1.10 Principales características funcionales de las leches en polvo**

Resulta difícil definir con exactitud las características físicas y las propiedades funcionales de la leche en polvo. Las características físicas influyen sobre su manipulación, almacenamiento y usos, dependiendo fundamentalmente de la composición y del proceso de elaboración utilizados para la obtención del producto en polvo, por lo que sólo se menciona las principales características y factores que intervienen en el producto final.

El control de la temperatura determina el grado de desnaturalización de las estructuras terciarias que definen las propiedades funcionales de las proteínas, lo que hace que la leche en polvo sea multifuncional y factible de adecuar al producto a las necesidades industriales

### 1.10.1 Solubilidad

Es una característica fundamental en las leches en polvo. Los productos poco solubles forman un sedimento que resulta desagradable, los factores más importantes que pueden modificar la solubilidad de la leche en polvo son los siguientes:

1. La presencia de ácido láctico en la leche (que produce la desestabilización de las caseínas).
2. El tratamiento térmico de la leche (especialmente, cuando hay ácido láctico desnatura reversiblemente las proteínas).
3. El sistema de desecación (generalmente, el secado en rodillos genera un mayor grado de insolubilidad que el proceso de aspersión o spray) (Early,1999).

### 1.10.2 Viscosidad

La viscosidad de la leche en polvo depende de la leche cruda como materia prima. Se mide por el tiempo que tarda en pasar el flujo en un capilar. La viscosidad de la leche se debe a la resistencia que presenta los glóbulos grasos al formar la nata. La leche entera en polvo generalmente es más viscosa que la leche descremada en polvo debido a un mayor contenido de grasa, por lo que su viscosidad no debe exceder de 100° Cp y para leche entera, como máximo, 60° Cp. La viscosidad determina el tamaño de partículas primarias lo que, a su vez, incide en el contenido de humedad final del polvo. Los principales factores que influyen sobre la viscosidad del producto final son:

- Temperatura de pasteurización/ precalentamiento.
- Desnaturalización de las proteínas del suero.
- Homogenización
- Contenido de sólidos totales del concentrado
- Variaciones estacionales en la proporción proteína/ lactosa.
- pH final del producto.

Investigaciones recientes en el ámbito nacional (Nungaray, 2001) proponen determinar el comportamiento reológico (viscosidad) de la leche fluida para precisar la calidad o la posible adulteración de este producto mediante un análisis de rutina. Esto permitiría determinar la adición de gomas, caseínatos y/o suero de leche a la misma para enmascarar prácticas de higiene y alimentación del ganado en general, lo que repercute en sus propiedades funcionales, incrementando principalmente la viscosidad y la estabilidad de las micelas. Un ejemplo lo constituyen los estudios de Jianshe *et al* (1999) quienes mostraron que la viscoelásticidad y las propiedades emulsificantes se incrementan al adicionar suero de leche y proteína concentrada de leche a productos lácteos.

### 1.10.3 Color

El color de la leche fluida y en especial de los productos lácteos, varía mucho debido al diferente contenido de caroteno en la grasa, lo que depende de los piensos, por lo que en la época de invierno tiene efecto marcado. Además depende de la capacidad de la vaca de convertir al caroteno en vitamina A, lo que varía mucho entre razas. Sin embargo un color amuy amarillo en leche en polvo indica que ha sufrido un proceso de enranciamiento (Nobel P, 1999).

### 1.10.4 Acidez

La acidez titulable de la leche se define como los mililitros de hidróxido de sodio 0.1N necesarios para neutralizar 10 mililitros de leche y es expresada como ácido láctico es una de las principales pruebas de plataforma que valora la calidad de la leche fluida y en polvo. La normatividad especifica valores que van de 0.13 – 0.17% de ácido láctico para ambas leches. La leche de vaca es ácida ante la fenolftaleína alcalina y ante el anaranjado de metilo y anfolérica cuando se prueba papel tornasol debida a la presencia de fosfatos, caseína y dióxido de carbono. Valores superiores a la normatividad pueden indicar un deterioro microbiológico, al revelar alteraciones de las propiedades organolépticas y/o de la composición de la leche (Spreer, 1991).

Existen dos métodos de procesamiento que se ilustran en el cuadro 10, así como las especificaciones de cada uno. Actualmente el método más empleado en el secado de la leche en polvo es por atomización, debido a que este proceso implica el menor daño térmico para las proteínas de la leche

**Cuadro 10. Métodos de elaboración de leche en polvo**

	<b>Método de cilindros</b>	<b>Método de Spray o Atomización</b>
<b>Tratamiento previo</b>	Concentración de los sólidos	Concentración de los sólidos Tratamiento UHT
<b>Proceso</b>	La leche se extiende sobre dos cilindros calentados previamente mediante vapor que giran en sentido inverso; la costra seca se forma rápidamente y se separa por medio de una cuchilla. El tratamiento térmico es energético.	La leche se pulveriza en el interior de una torre de secado mediante aire caliente. La desecación es instantánea. Los tiempos de secado dependerán de las características deseadas del consumidor.
<b>Densidad final</b>	0.3 - 0.5%	0.5 - 0.8%
<b>Solubilidad final</b>	80 - 85%	95 - 99%
<b>Usos</b>	Para alimentación animal	Industrial; repostería, cáncicos, lácteos, bebidas.
<b>Ventaja y desventajas</b>	Poco usado a nivel industrial, por el calentamiento térmico que daña la composición inicial del producto.	Mayormente usado por las pocas pérdidas causadas al producto final.

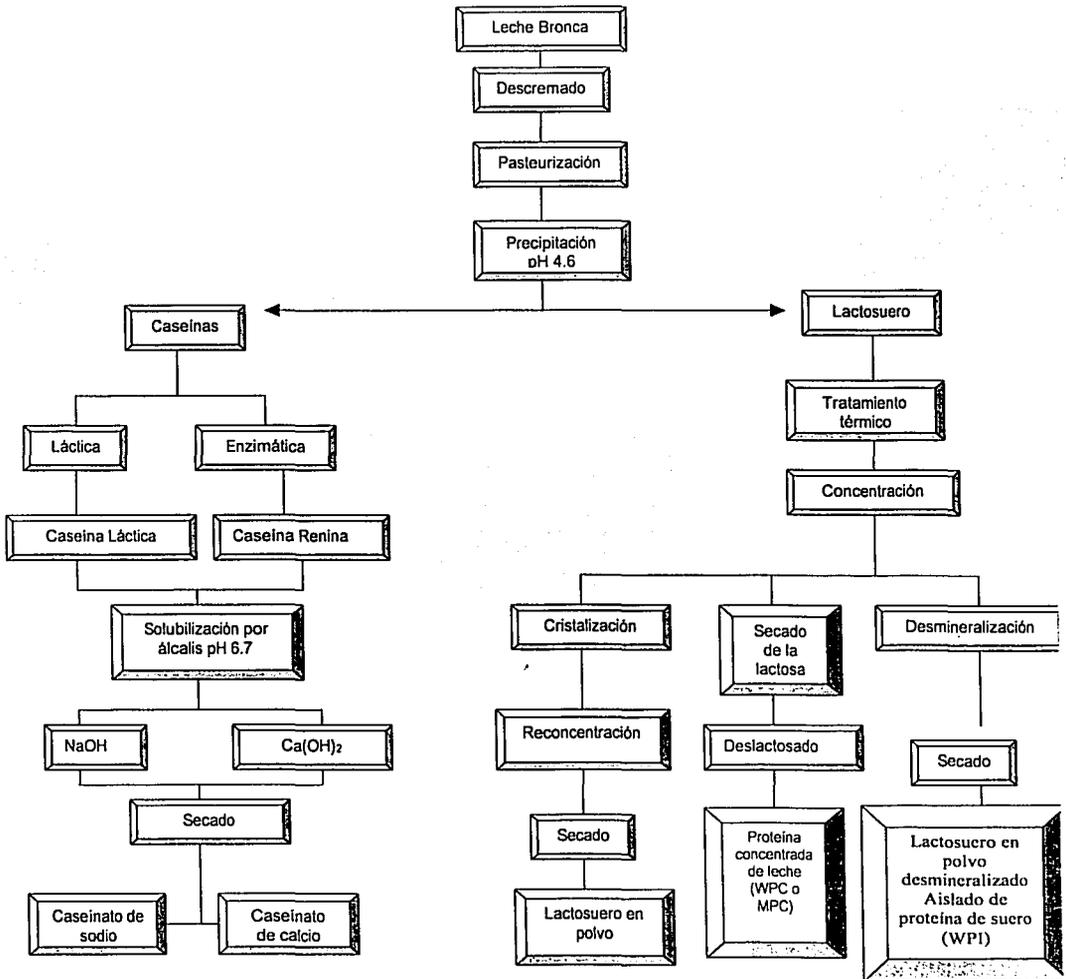
(Varnam and Sutherland, 1994, Spreer, 1991).

### 1.11 Usos de la leche en polvo en la industria

Del total de las importaciones mexicanas de leche en polvo, el 30% es destinado para programas de abasto social, que apoyan a 4.2 millones de beneficiarios por día en mil 754 municipios marginados del país. Para lograrlo, se debe rehidratar el producto y, además, producir los suplementos alimenticios para el Programa de Educación, Salud y Alimentación (Progesa, 2001). Se considera que la calidad debe corresponder a lo que estipula la etiqueta y se le ofrece al consumidor. El 70% restante se destina a la industria, debido a las propiedades funcionales que proporcionan las proteínas de la leche (Trujillo *et al* 2000). Entre ellas están la capacidad de absorción y retención de agua, formación de espuma, agente emulsificante, solubilidad, viscosidad, gelación, estabilidad térmica y coloidal.

Los sectores que la emplean son las industrias lácteas, de cárnicos, repostería y panadería las que mayor beneficio obtienen en la elaboración de productos y los usos consisten en la fortificación de quesos y procesados, helados, yogurt, leches fermentadas y acidificadas, cremas batidas, betunes, merengues, chocolates, jamones, sustituto de huevo y fortificación de alimentos nutricionales (Imm y Regenstein,1998). Las características de la leche en polvo destinada a usos industriales se pueden ajustar de acuerdo a las necesidades. Como alternativas de uso están las de formulas lácteas, preparaciones alimenticias y/o leches enriquecidas con suero de leche, caseína o caseínatos (Dagleish,1999). En el diagrama I se presentan los subproductos obtenidos de la leche fluida de mayor uso industrial.

Diagrama de Obtención de los Subproductos Lácteos (Amiot, 1994)



### 1.11.1 Obtención de caseínas y caseínatos

La obtención de las caseínas se puede realizar por tres vías:

- 1) Química y fisicoquímica: caseína ácida.
- 2) Fermentativa (bacterias lácticas): caseína láctica.
- 3) Enzimática: caseína cuajada.

Se parte de leche descremada y pasteurizada. Las operaciones siguientes son; extracción, purificación y secado. La fabricación de los caseínatos es más elaborada, se hace a partir de la caseína ácida o láctica seguida de operaciones de solubilización en la sal correspondiente (en sistemas continuo o discontinuo), deshidratación y secado (cilindros o por atomización).

Investigaciones recientes (Slattery *et al*, 1999) proponen la obtención de caseínatos y caseínas mediante hidrólisis enzimática con proteasa de *Bacillus* debido a que mejora la actividad emulsificante a pH ácidos, emulsiona las grasas y deja a las proteínas libres para retener el agua, lo que permite controlar mejor las propiedades funcionales en la elaboración de alimentos infantiles, fortificación de productos geriátricos, en usos farmacéuticos y aplicaciones nutraceuticas.

Ikonen *et al* (2000) plantean la manipulación genética de las variantes de la caseína, principalmente la  $\beta$ -caseína y la  $\kappa$ -caseína de tres diferentes razas de vaca a partir de los cromosomas 6 (7,19) a partir del fenómeno de polimorfismo proteico, para promover mejoría en las propiedades funcionales a partir de cambios fisicoquímicos y reológicos, que permitirán un amplio uso a nivel industrial lo que principales países europeos productores de leche, no tardaran en usar esta manipulación genética.

### 1.11.2 Obtención de las proteínas del suero de leche

Existen tres tipos de lactosuero, que se detallan en el cuadro 11, que varían de acuerdo a su acidez titulable. Casi la totalidad del suero de leche en polvo se produce a partir de lactosuero dulce, el cual se concentra hasta un contenido en sólidos totales del 35 – 52% y el sistema de secado que se realiza es por atomización. Suele emplearse como sustitutos directos de la leche en polvo desnatada.

El WPC (concentrado de proteínas de suero) se obtiene por separación mediante técnicas de ultrafiltración que permiten el fraccionamiento del lactosuero (y de la leche descremada) sin necesidad de aplicar calor y, por lo tanto, sin desnaturalizar las proteínas del suero así como concentrar hasta un 75% en sólidos totales (Casper *et al*, 2000).

**Cuadro 11. Tipos de lactosuero**

Lactosuero dulce	Acidez titulable 0.1 – 0.2 % pH 5.8 – 6.6 Obtenido por vía enzimático
Lactosuero semiácido	Acidez titulable 0.2 – 0.4 % pH 5.0 – 5.8. Obtenido de quesos frescos y ácidos como Ricota y el quesón
Lactosuero ácido	Acidez titulable 0.4 % pH < 5.0. Procedente de quesos frescos ácidos y caseína ácida.

(Vamam,1994).

### 1.11.3 Cambios conformacionales de las proteínas del suero de leche

En el cuadro 12 se muestran algunas características funcionales de las proteínas del suero. Estas son sensibles a temperaturas mayores de 60°C, por lo que se promueven cambios en las propiedades del producto en el polvo recién obtenido y en los cambios que tienen lugar durante el almacenamiento de la leche en polvo o de los aislados. Generalmente se produce la desnaturalización de la  $\beta$ -lactoglobulina en un 80-90 % y de la  $\alpha$ -lactoalbúmina en un 33-45%, pero sólo se da durante el secado del producto, pasando de su conformación globular nativa a una conformación al azar que permite fácilmente las interacciones ión-proteína y proteína-proteína. Las proteínas del suero desnaturalizadas, como la  $\beta$ -lactoglobulina y otras proteínas del suero, forman complejos con las caseínas, preferentemente mediante enlaces de calcio (Wnag *et al*,1999), lo que hace mejorar las propiedades funcionales y nutricionales.

**Cuadro 12 Características de las proteínas del suero**

Proteína	Características	Funcionalidad
$\beta$ - lactoglobulina	Termolábil	Domina las propiedades funcionales
$\alpha$ - lactoalbúmina	Algo termolábil	Solubilidad de los concentrados, gelificación y emulsionante
Proteasa – peptona	Termoestables	Actividad superficial, favorece batido
Inmunoglobulinas	Muy termosensibles	Favorece gelificación
Albúmina sérica bovina	Termolábil	Une lípidos
Caseína soluble	Termoestables	Modifica funcionalidad

(Fox y McSweeney,1998).

### 1.12 Técnicas de monitoreo de calidad

Se han realizado investigaciones con la finalidad de corroborar la calidad de la leche y sus subproductos mediante diferentes técnicas. Hay propuestas de métodos tanto presuntivos como confirmativos. Algunos de los principales métodos presuntivos se basan en la comparación de resultados obtenidos con respecto a valores pre-establecidos a partir de normas nacionales e internacionales dependiendo del país de origen. Una de éstas es el análisis proximal (AOAC 1991), que permite suponer la presencia de agentes adulterantes o el enriquecimiento de algún componente de la leche. Los métodos confirmatorios abarcan diversas prácticas que permiten concluir acerca de la calidad y origen de la leche y sus subproductos, de acuerdo al siguiente cuadro:

**Cuadro 13. Trabajos que involucran métodos confirmatorios.**

Autores	Métodos/información
Miralles y Ramos (2001)	Electroforesis capilar: Técnica para determinar la concentración de proteína de leche de vaca fluida, suero de leche y caseína láctica, mediante degradación de la k-caseína.
Walsh y Brown (2000)	HPLC: Estimación de las proteínas en mezclas de leche fluida mediante secuencia de aminoácidos. Posteriormente se cuantifica mediante HPLC utilizando estándares.

continua

Continuación cuadro 13.

Guzmán-Gonzalez y col. (2000)	Electroforesis: Caracterización de las proteínas presentes en productos lácteos como el yogurt, enriquecidos con caseínatos y concentrados de leche en polvo.
García, Amigo y Molina (2000)	Electroforesis: Método propuesto que permite determinar la calidad y composición de los productos de proteína de soya.
Brikker y Hill (2000)	Reológicos: Estudio del efecto reológico de la fortificación de la leche fluida y en polvo reconstituidas con mezclas de proteínas de suero; $\alpha$ -lactoalbúmina y dos variantes de $\beta$ -lactoglobulina, con tratamientos térmicos diferentes, que permiten determinar la viscosidad a diferente pH.
Syrbe y Klostermeyer (1999)	Reológicos: Estudio basado en el comportamiento de mezclas de leche fluida adicionadas con carragenina, proteína de suero y proteína de soya.
Visser y Olieman (1999)	Espectrometría de masas: Análisis de las variantes genéticas o mutantes de $\beta$ -lactoglobulina, $\alpha$ -lactoglobulina y carbohidratos en bebidas lácteas, mediante la determinación de la secuencia de péptidos y proteínas. Acoplada a la electroforesis capilar.
Peng y Puhán (1999)	Espectroscopía Ultravioleta: Determinación de proteínas en leche fluida, en especial la caseína comparada con la técnica de Kjeldahl.
Laporte y Paquín (1999)	Espectroscopía de infrarrojo cercano: Análisis de grasa, proteína total, nitrógeno no proteico y caseína de leche de vaca, en base al espectro de absorción electromagnético.

Continua

Continuación cuadro 13.

Igarashi (1999)	Químicos: Método propuesto para la separación de las fracciones de caseína en leche fluida y en polvo, basado en la solubilidad con diferentes reactivos, para hacer específica la selección y precipitación.
López Tapia y col. (1999)	Electroforesis capilar: Determinan la presencia de proteína de soya en productos lácteos, mediante electroforesis SDS-PAGE.
Bobé et al (1999)	HPLC: Separación y cuantificación de las proteínas de las variantes genéticas de la kapa caseína mediante cromatografía de líquidos en fase reversa.
Molina et al (1998)	Métodos inmunológicos: Detección de proteínas de suero de leche y de soya, con anticuerpos de $\alpha$ -lactoalbúmina y $\beta$ -lactoglobulina en formulas lácteas.
Lynch et al (1997)	Electroforesis: Determinación de perfiles cromatográficos de elusión y propiedades electroforéticas de los aminoácidos libres, el contenido de grupos sulfhidrilo en los caseínatos de sodio comerciales.
Schägger y von Jagow (1997)	Electroforesis-SDS. Técnica de separación de proteínas de bajo peso molecular, en el rango de 1 -100KDa y determinación de secuenciación de aminoácidos de diferentes proteínas y orígenes, incluyendo las lácticas
Pinto y Brito (1995)	Electroforesis- SDS: Detección de sólidos de suero de quesería en leche pasteurizada.
van Riel y Olieman (1995)	Electroforesis capilar: Determinación de la presencia del caseino macropéptido en la leche pasteurizada de vaca y búfalo. Detección de proteínas de bajo peso molecular.

Como se observa, existe una amplia gama de metodologías que permiten obtener información cuantitativa y cualitativa sobre las proteínas y otros compuestos de la leche. Algunas técnicas se caracterizan por su simplicidad y otras requieren de equipo sofisticado, inaccesible para muchos laboratorios. En el presente estudio se utilizará la técnica de electroforesis SDS-PAGE, con la finalidad de identificar las fracciones proteicas propias de la leche entera con respecto a las denominadas leche que ingresan al país. Los patrones de bandeo obtenidos se analizarán con el software Quantity One (Bio Rad), a fin de obtener información objetiva de los perfiles encontrados.

## OBJETIVOS

## 2.0 Objetivos General

Implementar un marco de referencia con técnicas fisicoquímicas y bioquímicas que permitan conocer el comportamiento de leche fluida, leches comerciales y muestras de referencia de preparaciones de proteínas lácteas en lo que se refiere a su :

- Composición proximal
- Parámetros fisicoquímicos
- Perfil electroforético unidimensional

Verificar si diversas muestras de preparaciones lácteas en polvo importadas, contienen la cantidad de proteína total, caseína y proteínas del suero característicos de la leche entera en polvo sugeridos por la Norma NMX-F-026-SCFI y el PROY-NOM-155-SCFI-2001.

# METODOLOGIA

### 3.0 Metodología

#### 3.1 Muestras analizadas

Para realizar el estudio se trabajó con dos tipos de productos como referencia (a y b) así como con muestras problema (c). En algunos casos, los métodos se aplicaron a productos comerciales de otras marcas para comparar el comportamiento (d)

##### a) Aislados proteicos comerciales

- Caseína láctea (New Zealand. S.A de C.V).
- Caseinato de sodio (New Zealand. S.A de C.V).
- Caseinato de calcio (New Zealand. S.A de C.V).
- Suero de leche (New Zealand. S.A de C.V).
- WPC o MPC ( Milk Proteins Concentrate) y (New Zealand. S.A de C.V).

##### b) Leches enteras

- Leche comercial Nido (Nestlé) en una presentación de 250 gramos, herméticamente sellado (Análisis completos)
- Leche bronca proveniente del rancho San Antonio, localizada en el municipio de Ameca en el estado de Puebla, México. Se fraccionó en lotes de 250 gramos para congelarla a 4°C. Posteriormente liofilizarta (liofilizadora Labconco, Inglaterra -50°C y 60 mPas de vacío).

##### c) Muestras Problema.

- Proporcionadas por la Administración General de Aduanas (ver cuadro 16) a través de la Administración Central de Laboratorios (ACL) y Servicios Centrales (SC). Siete muestras de distinto origen en bolsas transparentes selladas y etiquetadas, con un volumen aproximado de 100g para todas las muestras. Las características de las mismas, de acuerdo a dicho organismo se muestran en el cuadro 14

Cuadro # 14. Composición Muestras Problema

Clave	% Cenizas	% Proteína	% Grasa
F-38	7.6	43.09	1.0
F-39	6.8	58.20	1.8
F-40	6.9	31.9	1.7
F-41	6.5	36.09	1.76
F-42	7.1	33.09	3.9 *
F-43	7.46	44.0	4.42
F-44	7.0	37.7	4.2 **

Análisis realizado por la ACL ySC

\* Adicionado con aceite vegetal parcialmente hidrogenado.

\*\*Adicionado con aceite vegetal.

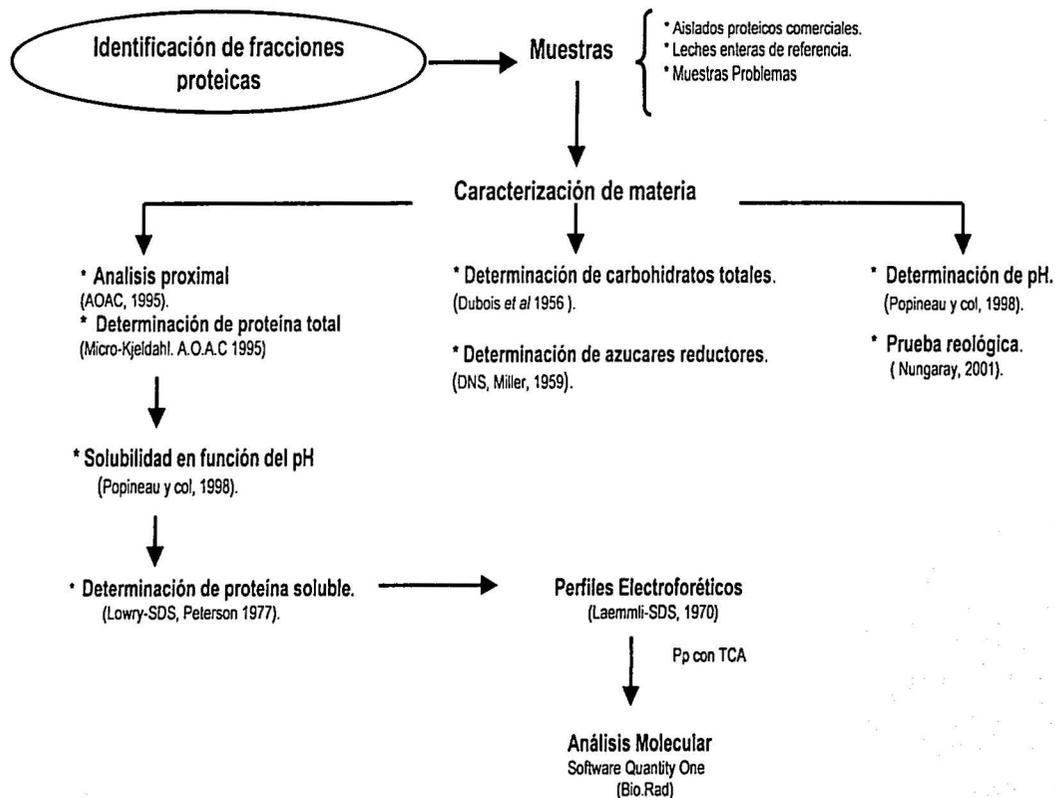
Todas las muestras analizadas se fraccionaron en lotes de 250 gramos. Fueron almacenados en recipientes, herméticos, no translúcidos, a 4°C, para prevenir reacciones de oxidación.

#### d) Muestras de leches comerciales

- Leches comerciales en polvo, misma presentación: Bio Nan, Nan, Carnation, Alpura, Fortileche (Verificación parcial de resultados).
- Leche fluida Suiza.

### 3.2 Estrategia experimental

Figura 3. Esquema para la Identificación de caseína, caseinatos y/o fracciones proteicas en muestra problema.



### **3.3 Caracterización de la materia prima.**

#### **3.3.1 Análisis proximal.**

Las determinaciones se realizaron de acuerdo con las pruebas estipuladas en el texto de Association of Analytical Communities (AOAC 1995). Con la finalidad de establecer parámetros estadísticos se realizó un promedio de seis mediciones por cada determinación y se evaluaron con el programa estadístico Statistics Program Social Sciences ( for versión 8.0).

Determinación de Humedad. Método AOAC 927.05.

Determinación de Cenizas. Método AOAC 945.46.

Determinación de Grasa. Método AOAC 905.02.

Determinación de Proteína total. Método AOAC 991.20, realizada en el equipo Buchi 426 Digestion Unit ( Alemania).

#### **3.3.2. Determinación de carbohidratos.**

##### **3.3.2.1 Determinación de carbohidratos totales.**

Se llevó a cabo por el método de Fenol sulfúrico descrito por Dubois *et al* 1956. La concentración de la curva patrón fue de 100 $\mu$ g/ml de glucosa. Se realizó un promedio de tres repeticiones y se evaluaron con el programa estadístico Statistic Program for Social Sciences (SPSS).

##### **3.3.2.2 Determinación de azúcares reductores.**

Se realizó por la técnica de reducción del ácido 3-5 dinitrosalisílico DNS reportado por Miller, 1959. La concentración de la curva patrón fue de 2 mg/ml de lactosa. Se realizó un promedio de tres repeticiones y se evaluaron con el programa estadístico Statistiscs Program for Social Sciences (SPSS).

### **3.3.3 Determinaciones fisicoquímicas**

#### **3.3.3.1 Viscosidad**

Se usó la técnica que reporta Nungaray, 2001, la cual se basa en la determinación de la viscosidad de suspensiones al 12% de sólidos totales de la leche bronca. Las muestras problema se ajustaron a un 12% de sólidos e hidrataron con agua, registrando el tiempo que tarda en pasar el flujo de la suspensión por un capilar del viscosímetro capilar Cannon-Fenske (International Research Glassware, E.U.) a 4°C, que es la temperatura a la cual se conserva la leche bronca. La determinación se realizó por triplicado.

#### **3.3.3.2 Determinación de pH.**

Se realizó por la técnica de Popineau y col. (1998). Se prepararon suspensiones del 1% p/v, para las muestras de aislados proteicos y muestras de referencia y del 2% para las muestras proporcionadas por la ACL. Se llevaron a un volumen de 50 ml con agua desionizada a pH 7.0 - 7.2. La solución se mezcló por 15 minutos con un agitador magnético en una placa agitadora marca Cole-Parmer modelo 4802-00. USA, a temperatura ambiente y el valor de pH se registró con un potenciómetro marca Beckman-Coulter (Alemania) modelo  $\phi$  34 pH meter. Las determinaciones se realizaron por sextuplicado.

#### **3.3.3.3 Determinación de ácido láctico.**

Se empleó el método AOAC 947.05. Se reconstituyeron las muestras a un 12 % de sólidos totales, El porcentaje de acidez titulable se cuantificó con HCl al 0.1N (Merck) y fenolftaleína (Merck) como indicador.

### 3.4 Curvas de solubilidad de las proteínas en función del pH.

La solubilidad de las proteínas se determinó de acuerdo a la estrategia propuesta por Popineau y col. (1998). Se prepararon suspensiones de leche con un nivel de proteína del 1%. (p/v). En un volumen de 30 ml de disolvente (agua desionizada pH 7.0.) se ajustó a diferentes valores de pH (2,4,6,8 y 10) con HCl 0.1N (Merck) ó NaOH 0.1N (Baker). El valor de pH se registró con un potenciómetro marca Beckman, modelo  $\phi$  34 (Alemania). Las suspensiones se agitaron orbitalmente a 120 rpm durante 30 minutos. Se ajustó de nuevo el pH, se aforó y se agitó nuevamente por 30 minutos (agitador orbital New Brunswick, Inglaterra). Posteriormente se centrifugó la suspensión a 10,000 r.p.m por 30 minutos a 4°C, en una centrífuga Beckman J2-MC.

#### 3.4.1 Determinación de proteína soluble

Después de centrifugar, se tomó un mililitro del sobrenadante y se cuantificó la proteína soluble de todas las muestras por el método de Lowry-SDS (Peterson, 1977). Se utilizó albúmina sérica bovina (1.0 mg/ml) para realizar la curva patrón. Las determinaciones fueron por triplicado y los resultados se analizaron con el programa estadístico Statistics Program for Social Sciences versión 8.0.

### 3.5 Método de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

El sobrenadante obtenido de todas las muestras se concentró mediante la precipitación con ácido tricloro acético al 50% en una relación 1: 2, se dejó reposar por 24 hrs a 4°C. Posteriormente el precipitado se lavó con acetona para quitar el exceso del ácido tricloroacético y se resuspendieron en un volumen conocido de agua desionizada, de acuerdo al porcentaje de proteína soluble que contenía cada muestra. Las muestras así tratadas fueron sometidas a electroforesis en gel.

La elaboración de geles de poliacrilamida se llevó a cabo de acuerdo al método de Laemmli- SDS (1970) en la cámara HOEFER. SE 600 SERIES ELECTROPHORESIS UNIT. USA. El pH del sistema se amortiguó con buffer 0.025 M Tris a pH 6.8. El gel concentrador se hizo al 10% de acrilamida y pH 8.8. Para el gel separador se empleó acrilamida al 16% y pH 8.8. Para correr la electroforesis se aplicó un voltaje de 250 watts, 360 mA y 80 volts, por tres horas y media.

Los geles se tiñeron con una solución al 20% de azul de Coomassie por tres horas y posteriormente se destiñeron con una solución de ácido acético glacial y metanol en una relación 7:3 en un litro.

### **3.6 Análisis molecular**

Se obtuvo la imagen de cada gel mediante el densitómetro Fluorist GS 700 (Bio Rad Laboratories, E.U.). La determinación de los pesos moleculares y la concentración de cada banda se obtuvieron al extrapolar los pesos y concentraciones de los estándares de pesos moleculares de alto y bajo rango (marca Bio rad.), mediante el software Quantity One, Bio Rad (EU).

## RESULTADOS

#### 4.0 Resultados y Discusión

Con la finalidad de conocer la composición proximal y, en particular, el contenido de proteína, se caracterizaron químicamente las muestras de aislados proteicos, de leches enteras y las problema. Los resultados proporcionaron elementos para establecer su composición e identidad con respecto a la designación de fórmula láctea o leche en polvo. Para poder evaluar los resultados de las leches enteras de referencia y muestras problema se tomaron como referencia los valores establecidos en la Norma Oficial Mexicana para leche en polvo NMX F 026 1997 SCFI y el proyecto de norma PRY-NOM-155-SCFI-2001, así como lo que reporta el exportador o la etiqueta. En el caso de los aislados proteicos comerciales los valores obtenidos del químico proximal sólo se compararon con lo que reporta el proveedor y/o la etiqueta. Los resultados se muestran en el cuadro 15. En las muestras problema se aprecian valores superiores a los indicados en la norma. Las diferencias en composición química y la determinación de solubilidad se deben a la presencia de compuestos que inciden en las propiedades funcionales (indicadores de las condiciones del proceso de secado de la leche en polvo (Alais, 1990). Estas pueden resultar en alteraciones del comportamiento reológico (viscosidad) y de algunas características fisicoquímicas (pH y ácido láctico) ( Bikker et al 2000, Nungaray, 2001), que se analizan más adelante.

A continuación se presenta un análisis más detallado para cada parámetro evaluado y se señalan las diferencias estadísticamente significativas. El análisis estadístico para evaluar la calidad de las repeticiones se basó en pruebas de Fisher, las cuales se realizaron a un nivel de significancia del 95%. Se debe aclarar que no se presentaron diferencias significativas entre el número de repeticiones, lo cual quiere decir que el número de mediciones fue el adecuado para obtener las conclusiones. Para evitar que la humedad enmascarase las diferencias entre los contenidos de los demás compuesto, se reporta el análisis químico proximal en base seca, y al contar con las mediciones de la misma, se decidió analizarla por separado.

Cuadro 15 Análisis Químico proximal de muestras de aislados proteicos muestras de referencia y muestras problema (Reporte en base seca)

Muestras	Cenizas %	Grasa %	Proteína %	Carbohidratos Totales %
Caseína	2.54 ± 0.18	0.00	96.45 ± 0.78	0.93 ± 0.00
Suero de leche	7.90 ± 0.04	1.56 ± 0.00	11.33 ± 0.07	79.31 ± 0.4
Caseinato de sodio	5.54 ± 0.13	1.09 ± 0.00	87.69 ± 1.06	5.14 ± 0.15
Caseinato de calcio	8.49 ± 0.92	1.59 ± 0.00	77.31 ± 0.58	11.97 ± 0.13
Leche Comercial	6.89 ± 0.54	2.65 ± 0.00	27.07 ± 0.25	63.40 ± 0.38
Leche Bronca lío-filizada	8.25 ± 0.39	3.64 ± 0.00	34.66 ± 0.29	53.06 ± 0.50
WPC	7.21 ± 0.10	1.04 ± 0.00	72.67 ± 0.28	18.39 ± 0.00
F-38	8.86 ± 0.08	1.09 ± 0.00	38.88 ± 0.42	50.65 ± 0.16
F-39	7.67 ± 0.05	1.51 ± 0.00	56.45 ± 2.08	33.91 ± 0.00
F-40	7.50 ± 0.01	1.59 ± 0.00	32.72 ± 0.60	57.65 ± 0.05
F-41	6.75 ± 0.03	1.60 ± 0.00	32.90 ± 0.60	58.16 ± 0.13
F-42	6.75 ± 0.06	3.74 ± 0.00	32.69 ± 0.19	56.55 ± 0.38
F-43	7.96 ± 0.02	4.28 ± 0.00	43.28 ± 0.30	43.66 ± 0.20
F-44	8.03 ± 0.03	4.32 ± 0.00	37.39 ± 0.64	49.63 ± 0.25

La NMX F 026 1997 SCF1 especifica los siguientes parámetros para leche en polvo: Humedad 4% máx, Proteína 3.4% mín, Grasa butírica en leche entera 2.6% mín, leche parcialmente descremada inferior a 2.6% y para leche descremada un máximo de 1.5%. parcialmente descremada y descremada 1.5% mín. Cenizas de acuerdo al CODEX STAN207-1999, especifica para leche entera 6%, parcialmente descremada 7%, y descremada 8%, con fines de importación. Los carbohidratos totales se presentan en base seca. Se presenta el promedio de seis repeticiones y su desviación estándar.

## 4.1 Composición de las muestras

### 4.1.1 Contenido de humedad

Las muestras proporcionadas por la Administración Central de Aduanas, así como la leche comercial Nido, superan lo establecido por la norma mexicana, que permite un valor máximo de 4% de humedad. Los resultados son heterogéneos (ver anexo I , cuadro 1), lo que indica diferencias en la manipulación y procesamiento de las muestras, no necesariamente acordes a los criterios establecidos en las buenas prácticas de manufactura en las diversas etapas de secado, transporte y almacenamiento. El contenido de humedad, es decir, del agua libre, afecta negativamente la estabilidad durante el almacenamiento así como las propiedades físicas de la leche en polvo. La cantidad de agua se regula en el proceso de atomización y mediante las condiciones de secado, pero también depende de las características del concentrado (Spreer, 1991). El incremento de humedad genera cambios en la solubilidad y puede desencadenar reacciones de Maillard debido a las interacciones entre las proteínas y la lactosa, que a su vez favorecen reacciones de oxidación y reacciones enzimáticas (Fenemma,1997), cambios en la percepción del sabor y en otras propiedades físicas, lo que reduce la funcionalidad y vida de anaquel (Spreer, 1991), por posible deterioro microbiológico.

### 4.1.2 Determinación de cenizas

La composición de las sales se ve modificada por factores tales como la alimentación del animal, el tiempo de lactación y enfermedades presentes en la vaca (mastitis). Además, durante la incineración se producen pérdidas y cambios de estado de muchos minerales, como los cloruros alcalinos, que son parcialmente volátiles. El valor de este parámetro no se encuentra estipulado en la norma mexicana (NMX F 026 1997 SCFI) ni en el proyecto de norma oficial. Sin embargo, el CODEX STAN207-1999 establece un intervalo de 5.5 – 6.0 % de cenizas totales para leche entera en polvo y de 6-9% para leche descremada en polvo con fines de importación. De acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan (ver anexo I , cuadro 2), se agruparon sólo dos conjuntos de muestras problema. En el primero se encuentra F-41, F-42, y el en segundo F-43 y F-44, cuyos valores de acuerdo al CODEX STAN207-1999 corresponden a leche descremada.

El resto de las muestras problema (F-38, F-39, F-40) no se agrupó pues existían diferencias significativas en los niveles de cenizas detectados. Sin embargo los valores mostrados también corresponden a la denominación de leche descremada de acuerdo al CODEX STAN207-1999. Los aislados proteicos cumplen con lo que especifica el proveedor en la etiqueta. Las leches enteras tienen valores correspondientes a leche descremada, por que superan lo establecido por el CODEX, si la denominación de la etiqueta (leche comercial) y origen (leche de vaca liofilizada) es de leche entera. El incremento en este valor indica un alto contenido de minerales, que pudiera resultar de la adición de caseinatos ya sea de sodio, calcio o mezclas de éstos; de la adición de fosfatos como agentes estabilizantes, así como de la fortificación de la leche en polvo por calcio o algún otro mineral con el fin de mejorar la calidad nutricional (Early,1999).

#### 4.1.3 Determinación de grasa

La norma mexicana y el proyecto de norma oficial señalan que debe existir un contenido mínimo de grasa en leche entera del 2.6%, en leche parcialmente descremada debe ser inferior a 2.6% y para leche descremada un máximo de 1.5%. Esta norma incluye también a las denominadas fórmulas lácteas, para las que establece que la adición de grasa vegetal o butírica debe ser de 3% como mínimo para leche entera, un máximo de 2.8% para leche parcialmente descremada y un máximo de 0.5% para leche descremada.

Las muestras analizadas se agruparon en dos conjuntos, de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Duncan (ver anexo I , cuadro 2). En el primero se encuentran caseinato de sodio, WPC y F-38. El segundo agrupa a caseinato de calcio, F-40 y F-41. En ambos grupos las muestras problema tienen valores correspondientes a leche descremada. Las restantes muestras problema (F-39,F-42, F-43 y F-44) no se agruparon, debido a que existían diferencias altamente significativas entre los valores obtenidos. Además de que en las muestras F-42 y F-44 el origen de la grasa es aceite vegetal y aceite parcialmente hidrogenado respectivamente, de acuerdo a la Administración Central de Aduanas. En el caso de la muestra F-43 no se especifica el origen de la grasa y el valor obtenido es superior a lo que especifica la norma tanto para leche en polvo, como para fórmula láctea. El valor de la muestra F-39 corresponde a leche parcialmente descremada.

La determinación de grasa presenta problemas pues la mayor parte de la misma está contenida entre las partículas del polvo, mientras una fracción se encuentra como grasa libre en la superficie de las mismas. Esto tiene influencia directa con el proceso de oxidación, la que se puede favorecer en presencia de oxígeno, humedad, metales pesados y la ausencia de agentes antioxidantes (Fenemma, 1997, Amiot, 1994). El porcentaje de humedad que tienen la mayoría de las muestras problema favorece estas reacciones. Al mismo tiempo, se sabe que la grasa reduce la flotabilidad y humectabilidad de la leche en polvo, lo que sucede en las muestras problema. La observación anterior se refuerza con el hecho de que en las muestras F-43 y F-44 se percibe un ligero aroma y sabor a rancio, lo que no coincide con el sabor típico de la leche en polvo, que es ligeramente dulce y no debe ser perceptible ningún sabor rancio ni desarrollarse ningún otro aroma (Alais, 1990).

#### 4.1.4 Determinación de proteína

La norma oficial establece para leche fluida un porcentaje mínimo de proteína del 2.9%. Se considera que un alto contenido proteico es indicador de calidad de la leche para consumo humano. Para toda denominación de leche en polvo establece un mínimo de 3.4%. Sin embargo la denominación de fórmula láctea establece un mínimo de 2.2% de proteína, designación a la que corresponden las muestras problema.

La leche bronca deshidratada cumple con la especificación de la norma para leche fluida, de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Duncan (ver anexo I, cuadro 2): sólo agrupa a leche bronca y tres muestras problema (F-40, F-41, F-42) de las cuales presentaron valores inferiores a lo que se establece para leche en polvo. Las restantes muestras problema (F-38, F-39, F-43 y F-44) no se agruparon pues existían diferencias altamente significativas en los niveles de proteínas detectados. Esto podría indicar que las muestras fueron enriquecidas con fracciones proteicas y/o son concentrados de proteína, ya que valores máximos de proteína detectados en leches de vaca de diferentes países no excede del 4.0% de proteína (Hussein *et al* 1999). La leche en polvo comercial presenta valores correspondientes a una fórmula láctea, ya que el porcentaje de proteína es inferior al 3.4% para leche en polvo, mientras que la leche bronca liofilizada cumple con los valores establecidos en la norma para leche en polvo. Las muestras de aislados proteicos tienen valores altos de proteína, que concuerdan con lo que reporta el proveedor.

#### 4.1.5 Determinación de carbohidratos

Con la finalidad de confirmar que las muestras problema y las leches de referencia cumplieran con el porcentaje establecido de sólidos no grasos establecidos por la normatividad, se cuantificaron los carbohidratos totales por el método de fenol sulfúrico (Dubois, *et al* 1956), y los azúcares reductores por el método DNS (Miller, 1959) para descartar un exceso de lactosa, principal componente de los sólidos no grasos de la leche. Los azúcares no reductores se obtuvieron por diferencia, debido a la sospecha de la presencia de sacarosa y de otros carbohidratos más complejos, como las dextrinas, en las muestras problemas. Los resultados se presentan en el cuadro 16.

**Cuadro 16. Determinaciones de Carbohidratos Totales y Reductores**

Muestra	Carbohidratos totales %	Azúcares Reductores %
Caseína	0.93 ± 0.01	0.1 ± 0.01
Caseinato de sodio	5.14 ± 0.01	0.1 ± 0.01
Caseinato de calcio	11.97 ± 0.01	0.3 ± 0.01
Suero de leche	79.32 ± 0.05	57.5 ± 0.23
WPC	18.39 ± 0.50	17.89 ± 0.33
Leche comercial	62.4 ± 0.38	49.99 ± 0.70
Leche bronca	53.06 ± 0.50	51.15 ± 0.16
F-38	48.65 ± 0.16	30.90 ± 0.57
F-39	31.91 ± 0.00	21.50 ± 0.41
F-40	54.65 ± 0.05	48.10 ± 0.23
F-41	55.16 ± 0.13	48.80 ± 0.28
F-42	53.55 ± 0.38	50.20 ± 0.69
F-43	42.66 ± 0.20	30.10 ± 0.49
F-44	45.63 ± 0.25	31.44 ± 0.28

La norma (NMX F 026 1997 SCFI) se refiere al valor cuantificado de Sólidos no grasos, (lactosa) como carbohidratos totales, en este cuadro se presenta ambos valores de cada muestra, así como el promedio de seis repeticiones y su desviación estándar.

Los valores de carbohidratos totales para los aislados proteicos comerciales corresponden a lo que especifica el proveedor. Los caseinatos tienen una menor cantidad de carbohidratos totales lo que impide su aglomeración, ya que éstos promueven la unión entre las proteínas (Varnam y Sutherland, 1994), en comparación con el suero de leche y el WPC, donde la lactosa está contenida en la fracción del suero de leche.

En el caso del caseinato de calcio, el valor de azúcares reductores ( 0.3%) no corresponde a lo que especifica el proveedor, ya que es inferior a los carbohidratos totales. De acuerdo a la información brindada por el proveedor, durante el proceso de elaboración de sus productos (caseinatos, caseínas, suero de leche, leche en polvo y WPC) se adicionan dextrinas, por lo que la diferencia se atribuye a éstas. En la industria es una práctica común agregar azúcares más complejos, a los productos lácteos (inclusive leche en polvo), con la finalidad de aumentar su volumen, mejorar la viscosidad, promover la textura, conservar los aromas y/o como vehículo en la adición de vitaminas que se han perdido durante el proceso de secado, o bien, para ayudar al secado por aspersión (Fenema, 1997).

Para las leches enteras, los carbohidratos totales se especifican en la norma oficial mexicana (NMX F 026 1997 SCFI y el proyecto de norma PRY-NOM-155-SCFI-2001), como sólidos no grasos (lactosa) de la leche, en donde para leche entera en polvo y parcialmente descremada se propone un máximo de 5.0%, mientras que para leche descremada y semi descremada, un máximo de 6%. En las muestras de referencia de leches enteras, los carbohidratos totales de la leche bronca deshidratada y la leche comercial presentaron valores diferentes a los que se esperaba ( 9% más la leche comercial), incluso es mayor el porcentaje en relación con las demás muestras problema, ya que se suponía que cumplieran con la composición teórica de leches enteras. La leche bronca sólo se liofilizó, pero en el caso de la leche comercial entera analizada existe la posibilidad de que en virtud de que va dirigida a un sector específico (infantil) haya sido adicionada de carbohidratos no reductores (sacarosa o dextrinas) para satisfacer la demanda de sabor dulce por este sector y/o promover el proceso de secado.

Los valores de carbohidratos totales de las muestras problema entran en la denominación de leche parcialmente descremada y descremada, sin embargo el contenido de lactosa es inferior a lo que especifica la normatividad y la bibliografía (Nobel, P, 1999), por lo que la diferencia podría ser por la presencia de dextrinas con la finalidad de ajustar los carbohidratos totales.

La normatividad no permite la presencia de dextrinas en la denominación de leche en polvo, por lo que los valores obtenidos de sólidos no grasos (lactosa) aunque sean cercanos a lo que especifica la norma para este parámetro, no permiten cumplir con la denominación de leche en polvo. Los contenidos de proteína y grasa indican que estas muestras no son leche entera, sino fórmula láctea. La prueba de rango múltiple de Duncan no agrupa a ninguna muestra, al existir diferencias altamente significativas entre los valores obtenidos, más no entre las repeticiones. Para determinar la cantidad y tipo de dextrina se recomienda utilizar cromatografía de alta resolución, con estándares puros de dextrinas.

## 4.2 Características fisicoquímicas

### 4.2.1. Determinación de pH

En el cuadro 17 se presentan los valores obtenidos de pH para todas las muestras. La NMX-F-026-1997-SCFI y el proyecto de norma permiten un intervalo de pH de 6.0 a 6.6 para cualquier tipo de leche (excepto leches acidificadas y fermentadas) para consumo humano. La importancia de mantener este parámetro dentro de los límites marcados por la normatividad radica en los efectos que origina en la vida de anaquel de la leche en polvo, ya que su estabilidad depende de las cargas eléctricas y de su grado de hidratación de las micelas de las caseínas. Por lo tanto, la adición de agentes estabilizantes está permitida para retrasar la coagulación de la leche en polvo por acción del calor. Generalmente se agregan fosfato disódico, citrato sódico y cloruro cálcico, que actúan como anfóteros y tienen como efecto aumentar la estabilidad de las micelas de las proteínas, aunque a su vez modifican el pH, lo que influye en el equilibrio entre las dos fases: un descenso disminuye la cantidad de fosfato cálcico coloidal hasta su desaparición, a un pH alrededor de 5.9, mientras que un incremento de pH aumenta la fase soluble (Amiot, 1994, Diario Oficial de la Federación, 14/nov/2001).

Las muestras analizadas de leches enteras y las muestras problema (F-38,F-39, F-40,F-42 y F-44) registraron valores de pH dentro de la normatividad. Sin embargo dos muestras problema (F-41 y F-43) superan ligeramente el intervalo establecido por la norma. Los aislados proteicos cumplen con lo que estipula el proveedor

**Cuadro 17. Caracterización fisicoquímica de muestras de aislados proteicos, muestras de referencia y muestras problema**

Muestra	pH	Ácido láctico %	Viscosidad
Caseína	4.14± 0.08	0.09± 0.03	55 cP± 0.32
Caseinato de sodio	7.45± 0.08	0.22± 0.04	53 cP± 0.65
Caseinato de calcio	6.61± 0.01	0.27± 0.04	56 cP± 0.45
Suero de leche	6.01± 0.06	0.26± 0.04	49 cP± 0.78
WPC	6.08± 0.41	0.27± 0.08	45 cP± 0.50
Leche Bronca	6.0± 0.66	0.15± 0.08	61 cP± 0.14
Leche Comercial	6.03± 0.58	0.17± 0.08	76 cP± 0.22
F-38	6.59± 0.68	0.26± 0.08	71 cP± 0.55
F-39	6.53± 0.51	0.26± 0.08	106 cP± 0.41
F-40	6.58± 0.55	0.22± 0.03	98 cP± 0.36
F-41	6.63± 0.40	0.23± 0.08	97 cP± 0.62
F-42	6.50± 0.63	0.25± 0.08	112 cP± 0.12
F-43	6.63± 0.58	0.25± 0.08	109 cP± 0.16
F-44	6.50 ± 0.57	0.25± 0.09	114 cP± 0.29

La NMX F 026 1997 SCFI y el proyecto de norma especifican los siguientes parámetros para leche entera en polvo: pH 6.2 máx, Ácido láctico 1.3 – 1.7 máximo. La viscosidad no se encuentra en la normatividad, se determino con la finalidad de conocer su comportamiento reológico (Nungaray, 2001). Las muestras se reconstituyeron a un 12% de sólidos totales. Para cada determinación se presenta el promedio de seis repeticiones y su desviación estándar.

#### 4.2.2 Determinación de ácido láctico

Para este parámetro los valores de los aislados proteicos comerciales corresponden a lo que especifica el proveedor, mientras que las leches enteras cumplen con lo que especifica la norma. Ninguna de las muestras problema cumple con lo que especifica la norma para leche en polvo, por lo que estas muestras podrían tener algún deterioro microbiológico, puesto que el incremento de ácido láctico es favorecido por la humedad, al desarrollar microorganismos que hidrolizan la lactosa, en galactosa y glucosa. (Noble P, 1999).

#### 4.2.3 Determinación de viscosidad

Se empleó la técnica recomendada por Nungaray (2001) para determinar adulteración en leche fluida, por lo que las muestras tuvieron que ser hidratadas a ajustar un 12% de sólidos y en condiciones de temperatura de 4°C. Los aislados proteicos, como la caseína y los caseinatos tuvieron diferencia de 1cP entre ellos. El caseinato de sodio es ligeramente menos viscoso que el caseinato de calcio, lo que se atribuye a los grupos fosfato y calcio que están presentes en solución (Early, 1999). La diferencia entre El WPC y suero de leche es del 4%, este último presenta el mayor valor, debido a la lactosa que ofrece mayor resistencia a fluir junto con los minerales del suero de leche. El WPC, al ser un concentrado, exento de lactosa y minerales es menos viscoso: para su obtención se concentra hasta un 75% en proteínas del suero, en comparación con el suero de leche (32%). Entre las leches enteras de referencia, la leche comercial en polvo resultó ser más viscosa que la leche bronca. Probablemente esto se debió a la presencia de carbohidratos en la primera, que presentan más resistencia al fluir. En el caso de las muestras problema, todas presentaron valores diferentes, de acuerdo a Nungaray, 2001, las muestras F-38, F-40 y F-41 se encuentran en el intervalo para leche en polvo descremada mientras las muestras restantes sobrepasan los valores establecidos para leche en polvo. Cuando se analizan leches en polvo se deben considerar los factores que influyen en la determinación de viscosidad, como son la temperatura del proceso, la desnaturalización de proteínas, el enriquecimiento con fracciones proteicas o la adición de carbohidratos complejos, como las dextrinas, puesto que a 4°C, la resistencia del flujo es mayor, lo que favoreció el incremento de la viscosidad en estas muestras.

## 4.3 Caracterización de las proteínas de la leche

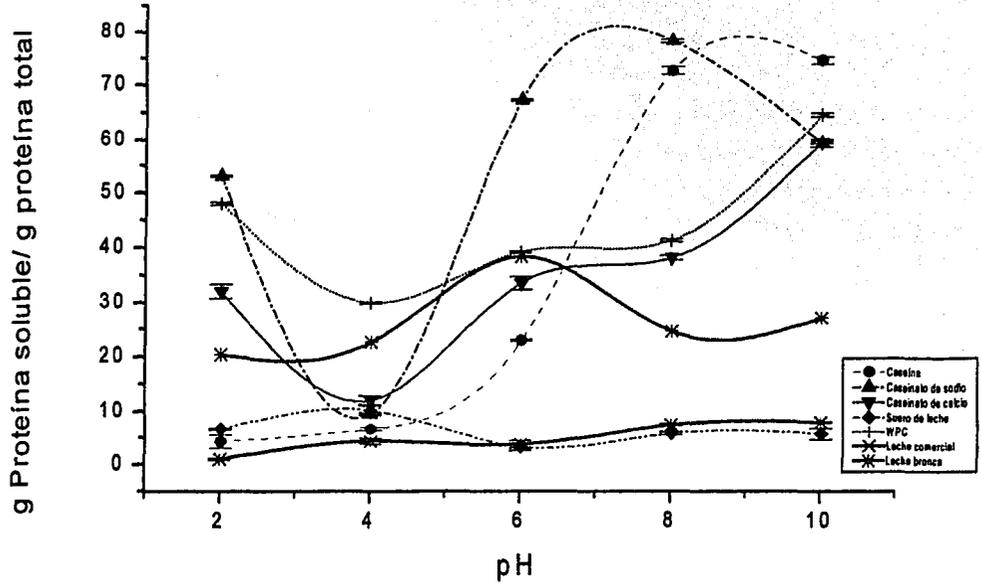
### 4.3.1 Curvas de solubilidad

La curva de solubilidad en función del pH permite caracterizar el comportamiento de las proteínas, con base en la carga que adquieren en solución y suspensión. También permite medir de manera indirecta el grado de desnaturalización que presenten las proteínas, ya que el grado de insolubilidad está directamente relacionado con el grado de desnaturalización que se pudo efectuar en las proteínas como resultado de los procesos de pasteurización y/o secado (Fennema, 1997).

Se observan dos gráficas; en la primera se presenta el comportamiento del porcentaje de solubilización de la proteína de los de aislados proteicos (caseína, caseinato de sodio y caseinato de calcio, suero de leche y WPC) y las muestras de leche entera (leche comercial y leche bronca deshidratada), en la segunda gráfica, se presentan las muestras problema, junto con la leche bronca deshidratada, para comparar su comportamiento en función del pH. Para cada muestra se realizó un cuadro que pretende simplificar los resultados obtenidos del promedio y desviación estandar de seis determinaciones del porcentaje de solubilización de la proteína en función del pH, así como las bandas presentes en el perfil electroforético de acuerdo al pH, en el que se resaltan las proteínas características de una leche entera.

52

### Gráfica de Porcentaje de Solubilización de Aislados proteicos y Leches enteras



Determinación de proteína soluble al 1% por cada muestra, por el metodo de Lowry-SDS (peterson 1987). Promedio de tres repeticiones y su desviación estándar

### 4.3.2 Análisis de solubilidad y perfil electroforético de muestras de aislados proteicos

#### 4.3.2.1. Análisis de solubilidad y perfil electroforético de caseína

En el cuadro 18 se observan los resultados del porcentaje de solubilización de la caseína, en la figura 4 se presenta el perfil electroforético de la caseína adiferentes pH. Las diferencias en el porcentaje de solubilización de la caseína en los pH analizados se debieron al contenido de calcio presente en solución asociado a las micelas de caseína (Varnam y Sutherland,1994). Un incremento en el contenido de calcio se debe a la ruptura de las caseínas  $\alpha$  y  $\beta$ , pues cesa la repulsión y tienden a agregarse y flocular a pH de 4.6, que es el punto isoeléctrico de esta fracción proteica (Igarashi Y, 1999). En el pH 2 el porcentaje de solubilización de la proteína es mayor (6.65%) con respecto al pH 4 (2.09%), en el cual la kappa caseína permanece en solución, ya que contiene la mayor cantidad de fosfo-caseinato cálcico, que permite estabilizar a la proteína a través de la carga (Ochirkhuyag. B,1998) y hacerla visible en el perfil electroforético. Además, se observa una banda correspondiente a  $\alpha$ -caseína, cuyo punto isoeléctrico es de 5.1 (Igarashi Y, 1999).

En pH 4 el porcentaje de solubilización de la proteína disminuye, ya que la mayor parte de las fracciones de las caseínas se desestabilizan y tienden a precipitar a este pH (Igarashi Y, 1999). Sin embargo, se esperaría encontrar en menor intensidad las mismas bandas que se observan a pH 2, ya que estas fracciones (kappa caseína y  $\alpha$ -caseína) de la caseína son solubles a pH ácidos. El no encontrarlas puede ser un problema de solubilización. En los restantes pH's el porcentaje de solubilización de la proteína incrementa con el pH, al comparar con el perfil electroforético en el pH 6 sólo se observan dos bandas, aunque se esperaba visualizar un número mayor. Esto pudiera atribuirse a que el porcentaje de solubilización de la proteína es 40% menor que en los pH's 8 y 10. En el pH 8 sí se observa el número de bandas correspondientes a las fracciones de la caseína (Ochirkhuyag. B,1998), en tanto que a pH 10 no se observa la  $\gamma$ -caseína (11 KDa), a pesar de tener el mayor porcentaje de proteína soluble (74.54%) con respecto a los demás pH's.

Muchos autores consideran como insoluble a la caseína y su uso se destina principalmente a la fortificación de alimentos (Slattery *et al* 1998). Ochirkhuyag. B. (1998) fraccionó las caseínas de la leche de vaca, camello y búfalo mediante electroforesis en SDS y obtuvo los pesos moleculares y porcentajes correspondientes, obtenidos en el presente estudio.

**Cuadro 18 Perfil electroforético y Solubilización para Caseína**

*Proteína Total 96.45 %	pH 2	pH 4	pH 6	pH 8	pH 10
**% Solubilización de la proteína	6.65 ± 1.52	2.09 ± 0.63	23.87 ± .96	75.90 ± 1.12	63.35 ± 1.02
	2 banda		bandas	5 bandas	4 bandas
****Análisis electroforético	κ- caseína 19 KDa	No se observan bandas	α <sub>2</sub> caseína 25KDa	α <sub>2</sub> caseína 25KDa	α <sub>2</sub> caseína 25 KDa
	α <sub>1</sub> caseína 22 KDa		β- caseína 24 KDa	β- caseína 24 KDa	β- caseína 24 KDa
				α <sub>1</sub> caseína 23 KDa	α <sub>1</sub> caseína 23 KDa
				κ- caseína 19 KDa	κ- caseína 19 KDa
				γ- caseína 11KDa	

\* Proteína total en base seca

\*\*Porcentaje de solubilización esta dada por la proteína soluble / g de proteína total

\*\*\*\*Las fracciones de la caseína se resaltan con letras negras y los pesos moleculares se presentan en KDa

**Perfil electroforético de Caseína en función del pH**

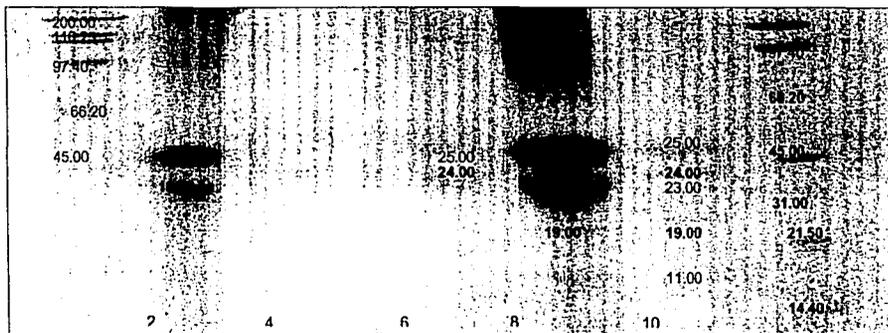


Figura 4. Perfil electroforético de caseína en función del pH. En los extremos se observan los marcadores de peso molecular cuyos valores se reportan en KDa. El gel se realizó a un 16% de acrilamida.

#### 4.4.2 Análisis de solubilidad y perfil electroforético de caseinatos

Los caseinatos son derivados de las caseína. El proceso de obtención es el mismo para ambos, con la única variante de la adición de diferente sal, cada una con diferente carga que le brinda estabilidad a las micelas de las caseínas (Walstra P, 1999). En los cuadros 19 y 20 se observa el porcentaje de solubilización para los caseinatos, cuyos porcentajes son diferente entre sí, tanto a pH's básicos como ácidos.

La solubilización del caseinato de sodio en los diferentes pH's es mayor en comparación con el caseinato de calcio, lo que pudiera deberse a la presencia de iones divalentes cargados positivamente en el caseinato de calcio, que promueven la desestabilización de las micelas de la proteína al dejar grupos fosfato expuestos, lo que provoca que se agreguen las proteínas y tienda a disminuir la solubilización de las mismas e incrementa el contenido de calcio soluble (Noble, 1999), en comparación con el caseinato de sodio, que es monovalente y no provoca que se agreguen las proteínas (Keating, 1999). A partir del pH 6 en el caseinato de sodio toda la proteína se solubiliza, mientras que en el caseinato de calcio en pH 10 se solubiliza toda la proteína.

A pH's ácidos el porcentaje de solubilización del caseinato de calcio es mayor que el caseinato de sodio, ya que el calcio, al estar en mayor proporción que en el de sodio, permite estabilizar las cargas de las fracciones de la caseína (k caseína y  $\alpha$ 0-caseína) solubles a pH's ácidos, por lo que se incrementa la solubilización de estas fracciones proteicas (Igarashi Y, 1999). La diferencia de cargas entre los caseinatos se manifiesta en el perfil electroforético (figura 5), donde la preparación de caseinato de calcio presenta las bandas correspondientes a la caseína en los porcentajes reportados, (Guacheron *et al* 2000), pero además se observan bandas de peso molecular alto en los pH's 2, 4, 8 y 10, que pudieran deberse a la formación de agregados que a pesar de la aplicación del SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol, no pudieron separarse, incluso con la presencia de urea (Guzmán *et al* 2000) por lo que se atribuye la formación de los mismos a los enlaces covalentes que se encuentran en la proteína, que probablemente se formaron por acción del calor y/o del tratamiento con álcali para la obtención del mismo caseinato. Sin embargo algunos autores (Ferreira B, 1999) atribuyen la presencia de agregados a iones divalentes como el calcio y el magnesio por efecto de la carga que le atribuyen a la proteína. En el caso del pH 8 se presentan tres bandas de peso

molecular bajo, que se atribuyen a una proteólisis de la proteína a este pH (Jacoba M.S et al 2000). Por lo que se recomienda hacer un ensayo con inhibidores de proteasa para confirmar los resultados. En el caseinato de sodio se observan bandas de peso molecular bajo en comparación con el caseinato de calcio, bandas que acompañan a las correspondientes caseínas (Guacheron *et al* 2000), principalmente en el pH 2 y 10. Estos resultados permiten afirmar que es posible distinguir entre los caseinatos de sodio y calcio por la determinación de diferencias en porcentaje de solubilidad y por el perfil electroforético, en el que se aprecian diferencias en los estados de agregación.

**Cuadro 19 Perfil electroforético y Porcentaje de Solubilización para Caseinato de Sodio**

Proteína total 87.69%	pH 2	pH 4	pH 6	pH 8	pH 10
%Solubilización de proteína	58.16±1.30	10.45± 1.12	73.64± 0.97	85.83± 0.96	65.12±0.68
	6 bandas	3 bandas	6 bandas	7 bandas	7 bandas
***Análisis electroforético	29.89 KDa	29.26 KDa	29.60 KDa	30.34 KDa	31.69 KDa
	26.28 KDa	26.07 KDa	26.68 KDa	26.28 KDa	28.69 KDa
	$\alpha_{s1}$ caseína 23.00 KDa	$\alpha_{s1}$ caseína 23.72 KDa	$\beta$ -caseína 24.64 KDa	$\alpha_{s0}$ caseína 22.11 KDa	$\alpha_{s1}$ caseína 23.64 KDa
	$\alpha_{s2}$ caseína 22.26 KDa		16.69 kDa	16.94 KDa	$\alpha_{s0}$ caseína 22.99 KDa
	$\kappa$ - caseína 19.25 KDa		13.02 KDa	15.85 KDa	$\kappa$ - caseína 19.00 KDa
	$\gamma$ -caseína 11 KDa		$\gamma$ -caseína 11.88 KDa	13.90 KDa	18.90 KDa
				9.99 KDa	$\gamma$ -caseína 11.45 KDa

\*Proteína total en base seca

\*\*Porcentaje de solubilización esta dada por la proteína soluble / g de proteína total.

\*\*\*Las fracciones de la caseína se resaltan con letras negras y los pesos moleculares se presentan en KDa

Cuadro 20 Perfil electroforético y Porcentaje de Solubilización para Caseinato de Calcio

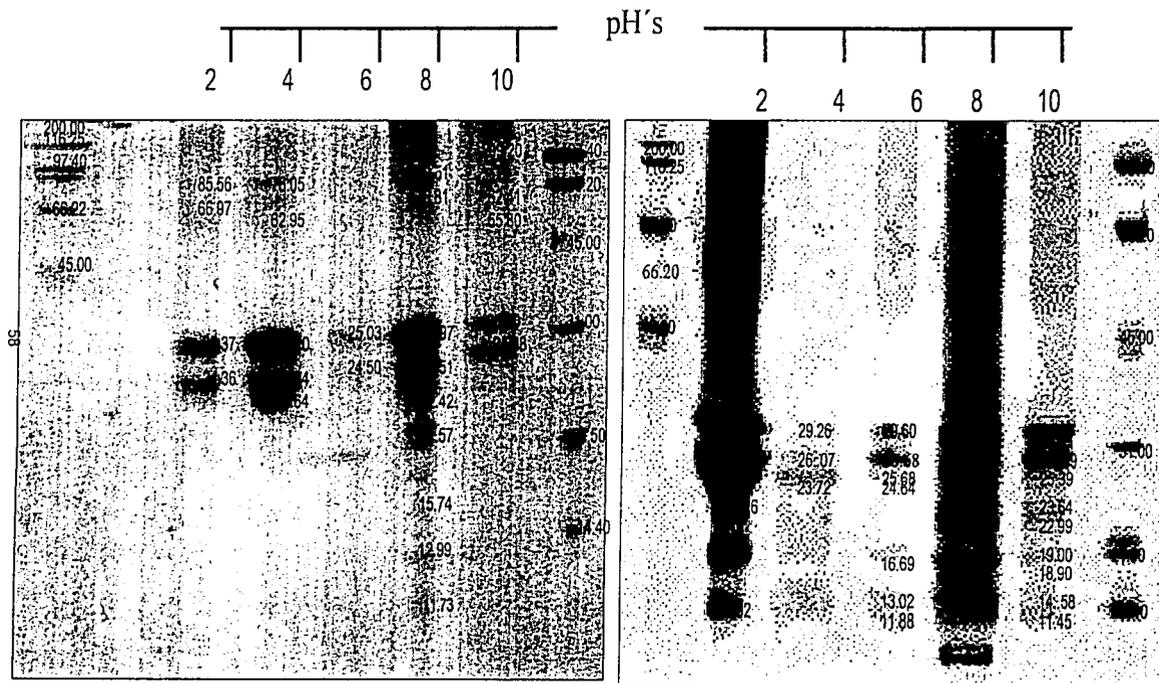
*Proteína total 77.31 %	pH 2	pH 4	pH 6	pH8	pH 10
**%Solubilización de la proteína	32.11±1.22	12.00±.99	33.55±.87	38.11±0.56	59.55±0.48
	4 bandas	5 bandas	2 bandas	9 bandas	5 bandas
***Análisis electroforético	85.56 KDa	86.05 KDa	$\alpha$ s <sub>2</sub> caseína 25.03 KDa	89.51 KDa	99.20 KDa
	66.97 KDa	62.95 KDa	$\beta$ -caseína 24.50 KDa	66.81 KDa	62.41 KDa
	$\alpha$ s <sub>2</sub> -caseína 25.37 KDa	$\alpha$ $\alpha$ <sub>2</sub> caseína 25.10 KDa		26.97 KDa	55.80 KDa
	$\beta$ -caseína 24.36 KDa	$\beta$ -caseína 24.34 KDa		$\beta$ -caseína 24.51 KDa	26.90 KDa
		$\alpha$ s <sub>1</sub> caseína 23.64 KDa		$\alpha$ s <sub>0</sub> -caseína 22.42 KDa	$\beta$ -caseína 24.98 KDa
				21.57 KDa	
				15.74 KDa	
				12.99 KDa	
				$\gamma$ -caseína 11.73 KDa	

\*Proteína total en base seca.

\*\*Porcentaje de solubilización esta dada por la proteína soluble / g de proteína total .

\*\*\*Las fracciones de la caseína se resaltan con letras negras y los pesos moleculares se presentan en KDa

## Perfil electroforético de Caseinato de sodio y Caseinato de calcio



La figura de la izquierda corresponde al perfil electroforético del caseinato de calcio, la figura de la derecha al caseinato de sodio, ambos en función del pH. En los extremos se observan los marcadores de peso molecular, los gels se realizaron a un 16% de acrilamida. La diferencia entre ambos son las bandas de alto peso molecular que en el caseinato de sodio están ausentes.

#### 4.2.3 Análisis de solubilidad y perfil electroforético de suero de leche y WPC

En los cuadros 21 y 22 se presentan los porcentajes de solubilización de la proteína para los aislados proteicos restantes (suero de leche y WPC) en función del pH. El comportamiento del porcentaje de solubilización de las muestras en función del pH, es diferente en ambas muestras debido a que el suero de leche es menos soluble que el WPC. Esto se debe a que el porcentaje de sólidos es mayor en el primero, ya que contiene lactosa y otros minerales que contribuyen a que el porcentaje de solubilidad sea menor en comparación con el WPC, el cual es un concentrado (Noble, 1999) que carece de carbohidratos. En general a mayor cantidad de extracto seco se obtienen polvos más solubles, igualmente por el incremento en el contenido de sales presentes en estos productos, lo que a nivel industrial los hace multi-funcionales en la elaboración de pan, helado, queso fundido, charcutería y rellenos de carne, de pescado y de pollo. También se utilizan en muchos alimentos no normalizados, como caramelos, dulces, pasteles, entre otros (Keating, 1999).

El incremento en la solubilización de la proteína fue proporcional al pH, ya que a pH 10 el 60% de la proteína del suero de leche y WPC se solubilizó. Esto se atribuye al bajo grado de desnaturalización proteica, ya que ambos se procesan por ultra-filtración y secado por aspersión, lo que reduce la posibilidad del daño molecular, aunado al bajo contenido de lípidos. Estas condiciones favorecen que los iones disociados se ligan a la molécula proteica e incrementen así la afinidad por el agua y por consiguiente, la solubilización de la proteína (Walstra P, 1999). En investigaciones recientes esta capacidad hidrofílica se ha asociado a la  $\beta$ -lactoglobulina (Casper *et al* 1999), la que es soluble a pH's ácidos, mientras que a pH básicos ( como 8 ) presenta una disminución de la solubilización de la proteína ( suero de leche), que se le atribuye a la  $\beta$ -lactoglobulina (Jacoba *et al*, 2000).

En el perfil electroforético del WPC ( figura 6) se observan tres fracciones proteicas principales: seroalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoglobulina, correspondientes al concentrado de suero. Se encuentran en la misma distribución en cada pH, lo que corresponde a estudios reportados por Ochirkhuyag (1998). Se observaron bandas de bajo peso molecular, entre  $\approx 34 - 26$  KDa, así como de alto peso molecular,  $\approx 90$  y 60KDa, las cuales se encuentran en la leche bronca y en el suero de leche en menor intensidad de las bandas.

Por lo tanto, puede decirse que estas bandas corresponden a la fracción del suero de leche, ya sean inmunoglobulinas y/o fracciones de proteosomas. A pH 2 aparece una banda de  $\approx 160$  KDa que pudiera corresponder a algún agregado.

El perfil electroforético del suero de leche (figura 6) muestra no sólo a las proteínas características del suero sino que, como se ha mencionado, las bandas se multiplican aparentemente por fenómenos de agregación. Estas proteínas del suero se definen claramente en el WPC y se observan las bandas características de sero-albúmina,  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoglobulina.

**Cuadro 21 Perfil electroforético y Porcentaje de Solubilización para Suero de Leche**

Proteína total 11.33%	pH 2	pH 4	pH 6	pH 8	pH 10
**%Solubilización de la proteína	6.67 $\pm$ 0.56	10.16 $\pm$ 0.98	3.19 $\pm$ 1.23	5.80 $\pm$ 1.17	5.70 $\pm$
	12 bandas	6 bandas	14 bandas	11 bandas	5 bandas
***Análisis electroforético	217.12 KDa	71.54 KDa	176.61 KDa	78.92 KDa	72.41 KDa
	171.53 KDa	59.13 KDa	119.66 KDa	74.83 KDa	58.16 KDa
	132.36 KDa	42.04 KDa	104.84 KDa	64.50 KDa	44.63 KDa
	105.04 KDa	34.82 KDa	77.38KDa	57.42 KDa	34.87 KDa
	79.65 KDa	30.02 KDa	61.54 KDa	45.36 KDa	$\alpha$ lactoglobulina. 14.00 KDa
	69.00 KDa	$\alpha$ lactoalbúmina. 14.70 KDa	57.37 KDa	41.86 KDa	
	56.18 KDa		45.40 KDa	37.44 KDa	
	45.47KDa		41.88 KDa	30.10 KDa	
	40.87 KDa		39.49KDa	28.84 KDa	
	34.37 KDa		36.59 KDa	27.98 KDa	
	30.10 KDa		32.73 KDa	$\alpha$ lactoalbúmina 14.46KDa	
	$\alpha$ -lactoalbúmina. 4.24KDa		30.12 KDa		
			27.98 KDa		
			$\alpha$ -lactoalbúmina 14.48 KDa		

\*Proteína total en base seca.

\*\*Porcentaje de solubilización esta dada por la proteína soluble / g de proteína total .

\*\*\*Las fracciones de la caseína se resaltan con letras negras y los pesos moleculares se presentan en KDa

Cuadro 22 Perfil electroforético y Porcentaje de Solubilización para WPC

*Proteína total 72.67 %	pH 2	pH 4	pH 6	pH 8	pH 10
**%Solubilización de la proteína	48.00	30.00	39.2	41.3	64.6
	9 bandas	9 bandas	8 bandas	9 bandas	9 bandas
****Análisis electroforético	168.44KDa	96.43KDa	149.94KDa	155.49 KDa	180.82 KDa
	91.44 KDa	71.58 KDa	91.06 KDa	91.38 KDa	92.13 KDa
	71.65 KDa	ASB 69.20 KDa	70.14 KDa	70.39 KDa	70.55 KDa
	ASB 69.78 KDa	40.92 KDa	ASB 69.55 KDa	ASB 69.36 KDa	ASB 69.32 KDa
	33.18 KDa	33.82 KDa	32.91 KDa	32.50 KDa	58.02 KDa
	30.00 KDa	32.03 KDa	30.13 KDa	29.45 KDa	32.62 KDa
	28.08 KDa	28.96 KDa	27.74 KDa	27.22 KDa	29.37 KDa
	B-lactoglobulina. 18.78 KDa	B-Lactoglobulina 18.32 KDa	B-lactoglobulina 18.64 KDa	B-lactoglobulina 18.65 KDa	27.44 KDa B-lactoglobulina 18.98KDa
	α-lactoalbúmina. 14.16 KDa	α-lactoalbúmina. 14.67KDa	α lactoalbúmina 14.47 KDa	α lactoalbúmina 14.2 5 KDa	αlactoalbúmin a14.36 KDa

\*Proteína total en base seca.

\*\*Porcentaje de solubilización esta dada por la proteína soluble / g de proteína total .

\*\*\*Las fracciones de la caseína se resaltan con letras negras y los pesos moleculares se presentan en KDa

## Perfil electroforético de WPC y Suero de leche

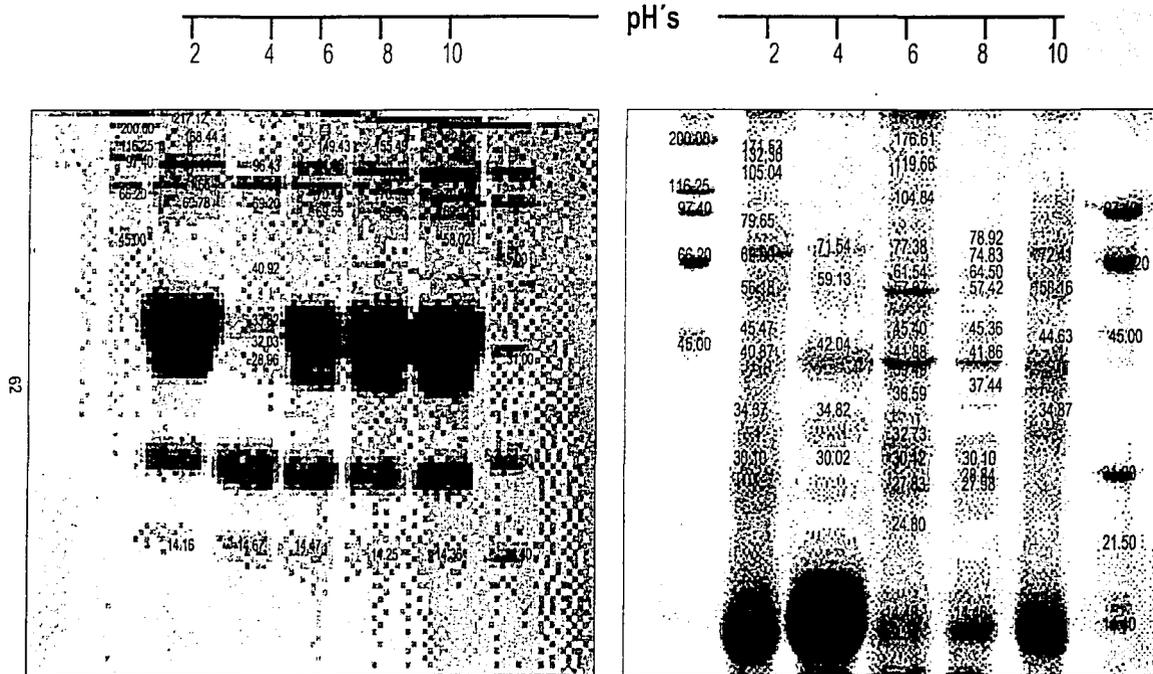


Figura 6. A la izquierda corresponde el perfil electroforético de WPC, a la derecha corresponde al Suero de leche, ambos en función del pH, en los extremos se observan los marcadores de peso molecular, la concentración de acrilamida fue al 16%. El perfil del suero de leche se observa un mayor número de bandas que pertenecen a las fracciones de proteosas y/o inmunoglobulinas, ya que este no es un concentrado como lo es el WPC.

#### 4.2.4 Análisis de solubilidad, solubilización y perfil electroforético de leches enteras de referencia

Los resultados obtenidos de la determinación del porcentaje de solubilización de la proteína, así como en los cuadros 23 y 24, se presentan las bandas obtenidas del perfil electroforético (figura 7), para las muestras de referencia de leches enteras; leche bronca deshidratada y leche comercial en función del pH. Ambas muestras presentan un comportamiento distinto en el porcentaje de solubilización (cuadro 22 y 23) ya que es más soluble la proteína de la leche bronca liofilizada en comparación con la leche comercial, lo que podría deberse al tratamiento térmico de pasteurización y/o al proceso de secado de la leche en polvo (de acuerdo a la temperaturas y tiempo empleado). También es necesario considerar que la leche comercial empleada va dirigida a un sector específico (infantil), por lo que, el enriquecimiento por carbohidratos (63.79%) y vitaminas es un factor decisivo en la solubilización de la proteína y el producto como tal (Walstra P, 1999).

En la leche bronca liofilizada el porcentaje de solubilización es directamente proporcional al pH, a excepción del pH 6 el cual presenta el mayor porcentaje de solubilización (38.32%) debido a que todas las proteínas de la leche son solubles a este pH (Walstra P, 1999). En el caso del pH 8 la solubilización de la proteína disminuye, lo mismo ocurre con algunas muestras problema (F-40, F-41) debido a la formación de dos complejos con la  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\kappa$ -caseína, así como interacciones entre la lactosa y los grupos amino de las proteínas, lo que hace que se agreguen y disminuya el porcentaje de solubilización de la proteína (Gaucheron *et al* 2000) en la leche bronca y en muestras problema. Estudios realizados por Casper *et al*, 1999 y Jacoba *et al*, 2000 coinciden con la formación de complejos entre las fracciones de la caseína y proteínas del suero en leches de bovinos, por lo que el comportamiento se puede atribuir a la naturaleza de las proteínas.

El perfil electroforético de la leche comercial (figura 7) difiere mucho con respecto al de la leche bronca, lo que resulta extraño pues se supone que se parte de "leche entera" en ambos casos. En tanto, el de la leche bronca resultó ser el que presentó el mayor número de bandas independientemente del pH de trabajo. Las bandas y las proporciones de las fracciones proteicas presentes en la leche bronca (sero-albúmina,  $\alpha_2$ -caseína,  $\alpha_1$ -caseína,  $\alpha_5$ -caseína,  $\kappa$ -caseína,  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina, y  $\gamma$ -caseína) corresponden a lo reportado por Ochirkhuyag (1998).

En la leche bronca liofilizada se observó la  $\beta$ -caseína a pH 2, lo que pudiera deberse a la presencia de grupos fosfatos ionizados en las demás condiciones probadas. Una banda correspondiente en peso a la  $\gamma$ -caseína se observa en todos los pH's, lo que resulta extraño puesto que esta fracción se encuentra dentro de la  $\beta$ -caseína y resulta de su rompimiento (Noble P, 1999). En pH 4 se observaron las fracciones correspondientes a  $\beta$ -lactoglobulina  $\gamma$ -caseína, las que al ser proteínas del suero son solubles a pH ácido. La  $\alpha$ <sub>1</sub>-caseína es una fracción insensible a la precipitación del calcio, por lo que se observó la banda en cualquier condición. Las restantes  $\alpha$ -caseínas no se observaron ya que son sensibles al calcio (Vamam, 1994). Las bandas que van de 8.28 KDa a 55.91 KDa son fracciones de proteosa solubles a pH 4.6. En pH 6 se observan más bandas, ya que a este pH todas las proteínas de la leche son solubles y son las condiciones en que se encuentran normalmente. De acuerdo a lo reportado por Gaucheron *et al* 2000, a pH 8 se forman complejos entre la  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\kappa$ -caseína, que genera la aparición de agregados y tiende a disminuir el porcentaje de solubilización de la proteína, al estar ausente la  $\kappa$  caseína que es la que le brinda estabilidad a las alfas caseínas, las que precipitan y, por lo tanto, no son observables a este pH (Noble, 1999).

En la leche en polvo comercial se aprecia el mayor número de bandas (4) a pH 6 y dos de ellas corresponden a la  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\gamma$ -caseína, respectivamente, de acuerdo a lo que reporta Ochirkhuyag (1998). Las dos bandas restantes tienen un peso molecular de 149.13KDa, misma que se encontró presente en el WPC a pH 6 en el primer caso, mientras la segunda banda es de bajo peso molecular, que podría provenir de fracciones de inmunoglobulinas cuyo peso molecular varía entre 15 – 120 KDa y/o fracciones de proteosa que van de 30-60 KDa (Noble, 1999; Gaucheron *et al* 2000). En los pH's 2, 6, 8 y 10 se encontró la banda correspondiente a la fracción de la  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\kappa$ -caseína; esta última no se observó a pH 2, a pesar de que esta fracción proteica es soluble a pH's ácidos.

El comportamiento de la preparación comercial difiere claramente de la leche bronca. En su análisis proximal, el porcentaje mayor corresponde a los carbohidratos (63.40%) y humedad (5.72%), mientras que sólo el 27% corresponde a proteína en base seca. Por lo tanto, puede afirmarse que esta leche comercial no se debería de denominar leche en polvo sino fórmula láctea o preparación láctea, ya que en base a los porcentajes obtenidos en el análisis químico proximal rebasa lo especificado por la normatividad para leche entera en polvo.

**Cuadro # 23. Perfil electroforético y Porcentaje de Solubilización para Leche comercial**

*Proteína total 27.07 %	PH 2	pH 4	pH 6	pH 8	pH 10
***Solubilización de la proteína	0.96±0.55	4.25± 1.04	3.67± 0.99	7.45± 0.65	7.93± 0.23
	1 banda	2 bandas	4 bandas	2 bandas	2 bandas
*** Análisis electroforético	A lactoalbumina. 14.46 KDa	κ- caseína 19.74 KDa	149.13KDa	κ- caseína 19.48 KDa	κ- caseína 19.81Kda
		α lactoalbumina. 14.72 KDa	α lactoalbumina. 14.58 KDa	α lactoalbumina. 14.57 KDa	α lactoalbumina. 14.14 Kda
			γ-caseína 11.66 KDa		
			9.49 KDa		

\*Proteína total en base seca

\*\*Porcentaje de solubilización esta dada por la proteína soluble / g de proteína total x 100.

\*\*\*Las fracciones de la caseína se resaltan con letras negras y los pesos moleculares se presentan en KDa

Cuadro 24 Perfil electroforético y Porcentaje de Solubilización para Leche bronca

*Proteína total 34.66 %	pH 2	pH 4	pH 6	pH 8	pH 10
**%Solubilización de la proteína	20.36±0.78	22.57± 0.83	38.32± 1.25	24.48± 0.92	27.07± 1.14
***Análisis electroforético	14 bandas	13 bandas	19 bandas	14 bandas	18 bandas
	80.65 KDa	173.56 KDa	170.63 KDa	172.62 KDa	87.26 KDa
	<b>ABS</b> 69.24 KDa	102.56 KDa	82.24 KDa	84.71 KDa	69.45KDa
	67.00 KDa	85.35 KDa	69.57 KDa	72.74 KDa	55.95 KDa
	31.74 KDa	69.66 KDa	55.58 KDa	69.86 KDa	44.21KDa
	28.41 KDa	55.91 KDa	48.40 KDa	54.07 KDa	33.69KDa
	<b>α2caseína</b> 25.36 KDa	43.65 KDa	33.74 KDa	45.36 KDa	29.50KDa
	<b>α1caseína</b> 23.73 KDa	39.06 KDa	29.27 KDa	32.39 KDa	<b>α1caseína</b> 25.58 KDa
	<b>κ-caseína</b> 19.23 KDa	33.07 KDa	<b>α2caseína</b> 25.43 KDa	<b>α2caseína</b> 25.93KDa	<b>α1caseína</b> 23.51 KDa
	<b>β-lactoglobulina.</b> 18.16 KDa	<b>α2caseína</b> 25.01 KDa	<b>α1caseína</b> 23.37 KDa	<b>βlactoglobulina</b> 18.66 KDa	<b>α-caseína</b> 22.31 KDa
	<b>α lactoalbumina</b> 14.41 KDa	<b>β-lactoglobulina</b> 18.58 KDa	<b>κ-caseína</b> 19.26 KDa	13.36 KDa	<b>β-lactoglobulina</b> 18.93 KDa
	<b>γ-caseína</b> 11.35 KDa	10.54 KDa	<b>α lactoalbúmina</b> 14.81KDa	9.17KDa	<b>γ-caseína</b> 11.35 KDa
	9.97 KDa	8.28 KDa	13.36 KDa	7.85KDa	9.80 KDa
	8.72 KDa		<b>γ--caseína</b> 11.71 KDa		8.60 KDa
			10.84 KDa		8.14 KDa
			9.35 KDa		7.91 KDa
			8.71 KDa		
			8.12 KDa		
			7.39 KDa		

\*Proteína total en base seca

\*\*Porcentaje de solubilización esta dada por la proteína soluble /proteína total x 100

\*\*\*Las fracciones de la caseína y suero de leche se resaltan con letras negras y los pesos moleculares se presentan en KDa

## Perfil electroforético de Leche Bronca y Leche comercial

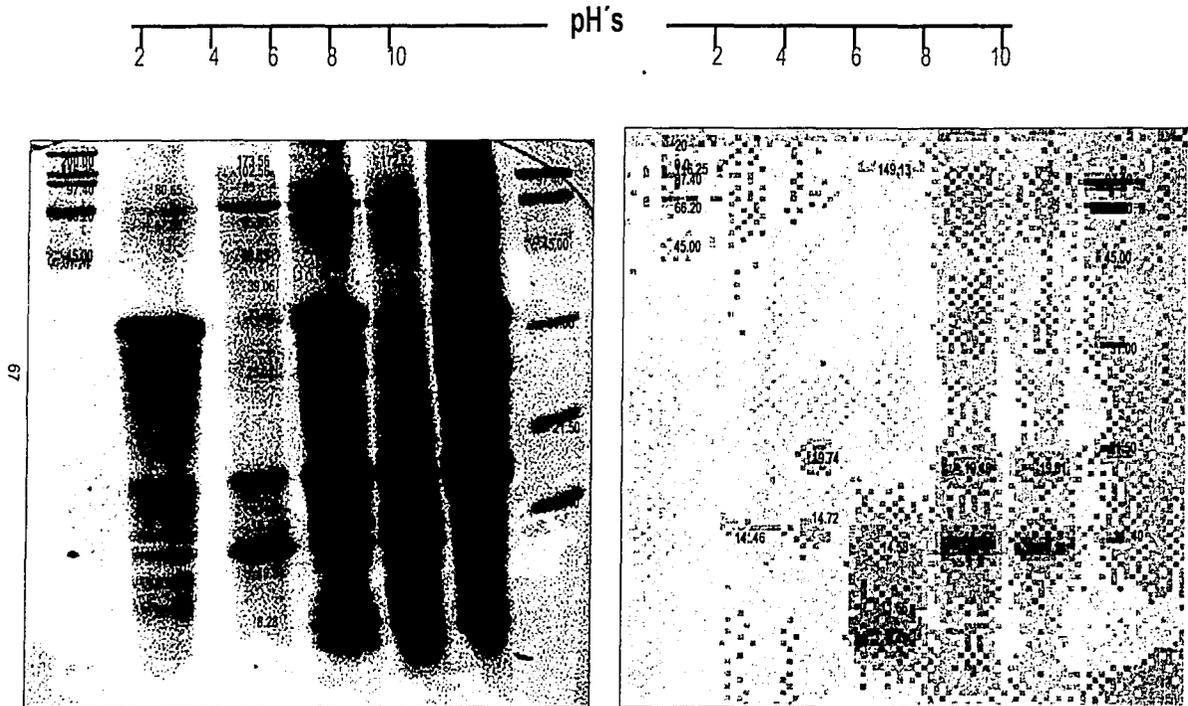


Figura 7. A la izquierda se presenta el perfil electroforético de Leche bronca liofilizada en el laboratorio, a la derecha corresponde el de la Leche Comercial, ambas en función del pH, en los extremos se observan los marcadores de peso molecular, la concentración de acrilamida fue al 16%. El perfil de la leche bronca presenta las bandas características reportadas por la bibliografía para una leche entera

### Perfil electroforético de leches Comerciales

Con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos de la leche comercial 1 y la leche bronca liofilizada, se llevaron a cabo determinaciones de perfiles electroforéticos de leches en polvo comerciales disponibles en tiendas de autoservicio, así como de una sola leche fluida comercial, la cual se liofilizó bajo las mismas condiciones de la leche bronca de referencia. Para estas muestras sólo se realizó la determinación de nitrógeno total y carbohidratos totales para verificar el contenido que especifica la etiqueta. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Tabla de comparación de leches comerciales

Muestra	% Proteína total		% Carbohidratos totales	
	Etiqueta	Experimental	Etiqueta	Experimental
Leche comercial 2 (Forti-leche)	26.00	27.01± 0.66	39.00	49.9±1.20
Leche comercial 3 (Alpura)	26.00	26.59±0.68	39.00	38.12±1.09
Leche comercial 4 (Carnation)	26.4	27.64±0.63	38.8	49.30±1.15
Leche comercial 5 (Nan)	11.4	11.96±0.70	57.9	57.02±1.10
Leche comercial 6( Bio-nan)	12.5	13.10±0.68	58.6	58.97±1.09
Leche fluida comercial (Suiza)	30.00	28.99±0.62	48.00	48.27±1.17

Promedio de dos repeticiones en base húmeda.

Los perfiles electroforéticos (figura 8 y 9) de estas muestras se llevaron a cabo con muestras solubilizadas a pH 2, donde se observan solubles las proteínas del suero de leche y a pH 8, en el que están ausentes las caseínas en la leche bronca deshidratada. Los resultados obtenidos en pH 2; reafirman los resultados de la primera leche comercial analizada, pues sólo se observan las cuatro bandas que se aprecian también en las leche comerciales 2 y 4. A esto hay que agregar que en estas dos muestras el porcentaje de proteína total determinado por el método de Kjeldahl es ligeramente mayor con respecto a lo que declara la etiqueta y mucho menor a lo mínimo especificado en la NOM para leche en polvo (34%).

El porcentaje de carbohidratos totales resultó ser un 10% más de lo que declara la etiqueta. Aunado a los argumentos anteriores, para estas leches comerciales la declaración de la etiqueta correspondería a fórmula láctea.

En el caso de las leches en polvo comerciales 5y 6, el porcentaje de proteína total y carbohidratos totales obtenidos en el laboratorio son similares a lo que declara la etiqueta, mientras que el perfil electrofético en las condiciones analizadas concuerda con el perfil del WPC, por lo que la declaración de la etiqueta si corresponde a fórmula láctea. En el caso de la leche comercial 3, se observa un numero mayor de bandas a pH 2 y 8, similar a la leche bronca, en menor intensidad, a pesar de que se incrementó la concentración de proteína (650 $\mu$ g). A pH 2 se observan las proteínas del suero y la  $\kappa$ -caseína obtenidos en la leche bronca. Al igual que a pH 8, no se observan las bandas correspondientes a las caseínas. En general el perfil electroforético se asemeja más a la leche bronca, en comparación con las demás muestras comerciales, en tanto que el porcentaje de carbohidratos resultó ser menor de lo que declara la etiqueta. En la leche fluída comercial, la cantidad de proteína determinada experimentalmente es ligeramente menor a la reportada en la etiqueta. El perfil electroforético es similar a la leche en polvo comercial 1, pues sólo se observan cuatro bandas en los dos pH's (2y 8), correspondientes a las proteínas del suero y a la  $\kappa$  caseína, lo que difiere del comportamiento de la leche bronca. Estos resultados son inesperados si se considera que esta leche fluída sólo ha sufrido un proceso de pasteurización, un tratamiento térmico que produce cambios mínimos, en la composición química, física y percepción organoléptica del producto. Se puede llevar a cabo por 30 minutos a 62°C o 16 segundos a 72°C. Este tratamiento térmico no desestabiliza las micelas de la caseína, ya que soportan temperaturas mayores de 90°C , las más susceptibles serían las proteínas del suero, donde la  $\beta$ -lactoglobulina se desnaturaliza reversiblemente a temperaturas de 75.9°C a pH 6.5, mientras que la  $\alpha$ -lactoalbúmina en las mismas condiciones se desnaturaliza a 61°C en caso de que el tiempo y temperatura empleados fueran prolongados la desnaturalización es irreversible. La leche presente en esta muestra no ha sufrido tampoco el proceso de secado por aspersión, que sería otro factor que afectaría la conformación final de las proteínas de la leche en polvo. En el caso de las leches comerciales (2,4,5,6 y fluída) a pH 8 están presentes algunas fracciones de caseínas que podrían ser también fracciones de caseinatos. Por lo tanto estas leches deberían denominarse fórmulas lácteas.

## Perfil electroforético de Leches comerciales en polvo y fluidas a pH2

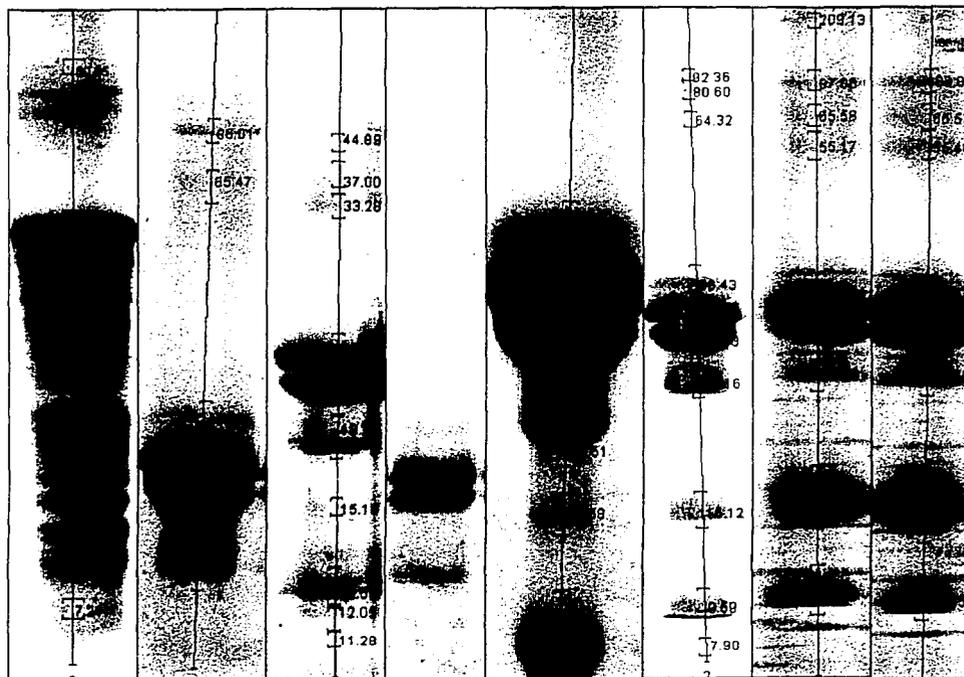


Figura 8. De izquierda a derecha se presenta las bandas correspondientes de muestras comerciales a pH 2 en el siguiente orden: Leche bronca, leche fluida comercial (suiza), alpura en polvo, nido, forti-leche, carnation, nan, bionan. El porcentaje de acrilamida fue al 16%.

## Perfil electroforetico de Leches comerciales en polvo y fluidas a pH8

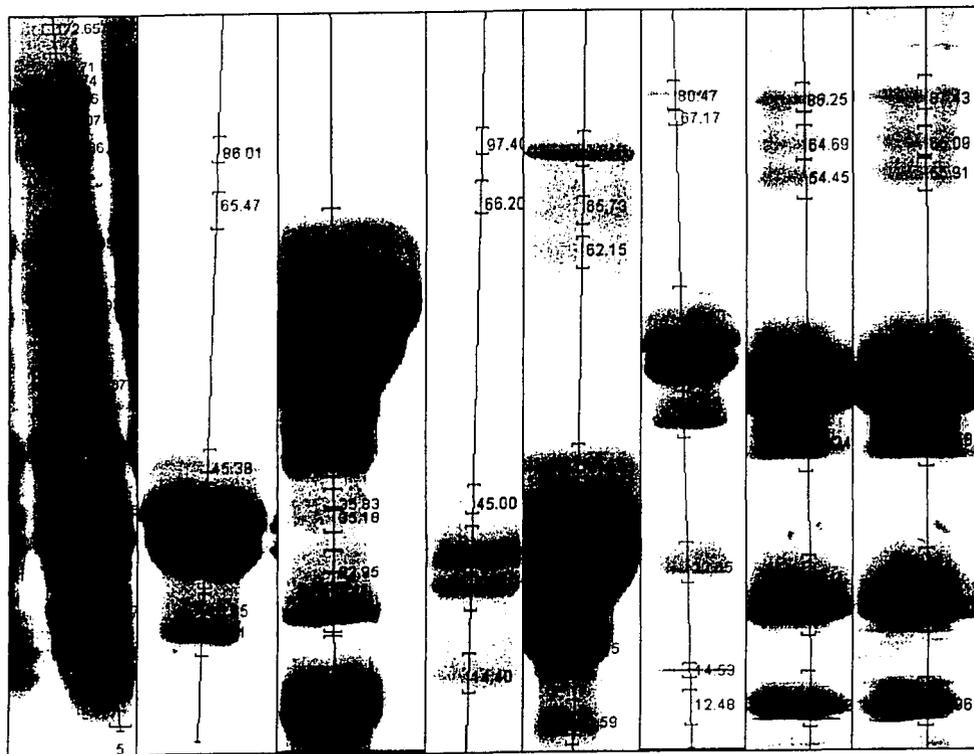


Figura 9. De izquierda a derecha se presenta las bandas correspondientes de muestras comerciales a pH 8 en el siguiente orden: Leche bronca, leche fluida comercial (suiza), alpura en polvo, nido, forti-leche, carnation, nan, bionan. El porcentaje de acrilamida fue al 16%.

#### 4.2.5 Análisis de solubilidad y perfil electroforético de muestras problema

En la gráfica 2 y cuadros 25 ,26, 27, 28, 29, 30 y 31 se presentan los resultados obtenidos del porcentaje de solubilización y perfil electroforético, para cada una de las muestras problema en función del pH.

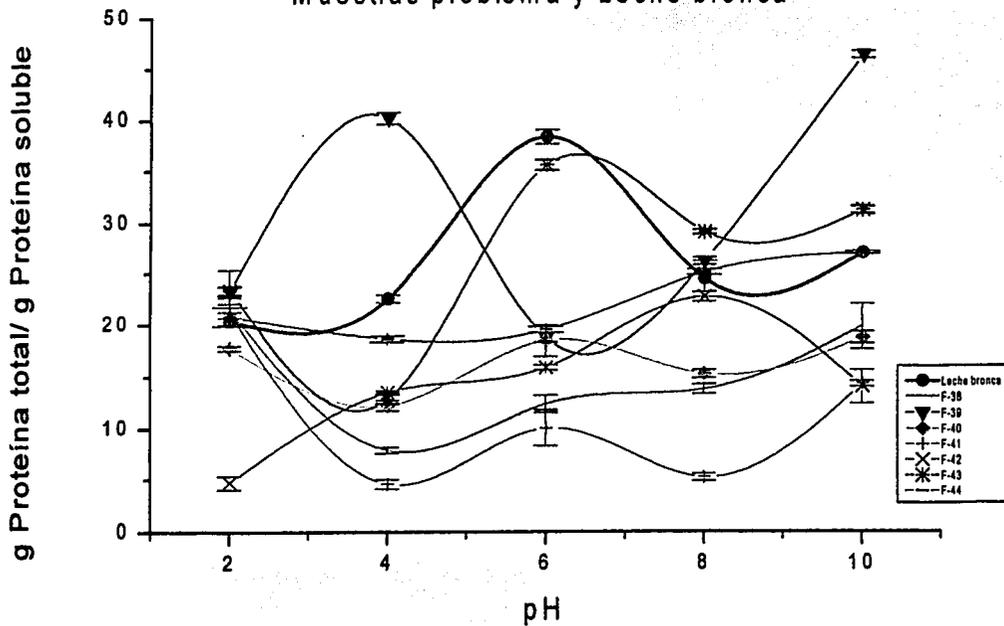
El comportamiento en solubilización de la mayoría de las muestras es diferente entre sí, solo la muestra F-40 tiene un comportamiento similar al de la leche bronca. De acuerdo a los resultados; el porcentaje de solubilización se incrementa a pH2 a excepción de las muestras F-40 y F- 42. Las restantes tienen porcentajes similares al de la leche bronca, sin embargo el contenido total de proteína es mayor y en general se solubiliza el 20% aproximadamente, esto podría deberse a la presencia de carbohidratos complejos, que compitan con el agua para formar uniones con la proteína (Noble, 1999), impidiendo que esta se solubilice. En el caso del pH4 la ausencia de caseínas genera disminución en el porcentaje de solubilización (Cheffel, 1989). Caso contrario sucede con la muestra F-39, cuyo porcentaje obtenido excede del 40%, lo que indica el enriquecimiento con proteínas del suero de leche que son solubles a pH's ácidos (Fenema,1997). Las restantes muestras tienen porcentajes menores en comparación con la leche bronca, sin embargo en la elaboración de geles; la leche bronca presenta fracciones de caseínas característicos de cada pH (Gaucheron *et al* 2000), mientras que las muestras problema la ausencia de caseínas en los diferentes pH's es evidente, asimismo el contenido de proteína total es mayor en las muestras F-39 y F-40. En los restantes pH's las muestras F-38,F-39 y F-44 incrementa la solubilización directamente proporcional al pH, caso contrario sucede en las muestras: F-40,F-41,F-42 y F-43, donde la disminución se presenta a pH8, por la presencia de proteínas del suero y incrementa nuevamente a pH10.

En el perfil electroforético de las muestra problema F-38, F-41, F-42 y F-44 se observaron bandas correspondientes a las fracciones de las caseínas ( $\alpha_{s2}$ ,  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s0}$ ,  $\kappa$ -caseína, $\gamma$ -caseína y en algunas la  $\beta$ -caseína. A pH 8 se logró observar las cuatro fracciones, mientras que en la leche comercial en polvo estas fracciones no son visibles. Se esperaría que si estas muestras son etiquetadas como leches en polvo se observarían todas las fracciones correspondientes a una leche entera (Gaucheron *et al* 2000).

La ausencia de las fracciones del suero de leche más representativas ( $\alpha$ -lactoglobulina,  $\beta$ -lactoglobulina) así como una mayor concentración de la fracción proteica y bandas correspondientes a las caseínas, indica que en realidad estas muestras son mezclas WPC y caseinatos. La hipótesis se refuerza por el hecho de que el comportamiento de las curvas de solubilidad, en las que a pH's ácidos la fracción soluble es mayor (20% más) con respecto a la leche bronca, pero no igual que el WPC.

En las muestras F-39, F-40 y F-42 se observaron bandas de las proteínas de suero ( $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, seroalbúmina) en mayor porcentaje que lo reportado (Gaucheron *et al* 2000). En comparación con las muestras anteriores, las fracciones de las caseínas se encuentran en menor proporción mientras resaltan las fracciones del suero de leche. De acuerdo al perfil electroforético del WPC, se observaron bandas de bajo peso molecular, entre  $\approx 34 - 26$  KDa, y de alto peso molecular  $\approx 90$  y 60KDa, las cuales se encuentran en la leche bronca y en el suero de leche en menor proporción. Puede afirmarse que estas bandas corresponden a la fracción del suero de leche, ya sean inmunoglobulinas y/o fracciones de proteosomas, que se encuentran en un porcentaje de 2 - 6% en la leche bronca. Las fracciones de bajo peso molecular se encuentran presentes en las muestras problema F-39, F-40 y F-42, enriquecidas en mayor proporción, junto con las fracciones de  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina con respecto a las del WPC. Por lo tanto, se puede afirmar que de acuerdo al análisis químico proximal, de solubilidad y electroforético, estas muestras fueron enriquecidas con WPC. Se recomienda que para identificar las bandas características de una leche se emplee pH 2, ya que en el mismo estas proteínas del suero están solubles, o bien a pH 8, en el que se observa el mayor número de bandas que permite verificar la ausencia o presencia de caseínas.

## Gráfica de Porcentaje de Solubilización de Muestras problema y Leche bronca



Determinación de proteína soluble al 1% por cada muestra, por el método de Lowry-SDS (peterson 1967). Promedio de tres repeticiones y su desviación estándar

Cuadro 25. Perfil electroforético y Porcentaje de Solubilización para F-38

*Proteína total 38.88 %	pH 2	pH4	pH6	pH8	pH10
**%Solubilización de la proteína	21.37± 0.97	7.87± 0.89	12.37± 1.06	13.78± 0.99	19.87± 1.56
	10 bandas	9 bandas	11 bandas	18 bandas	13 bandas
****Análisis electroforético	81.86 KDa	77.77 KDa	78.62 KDa	153.63 KDa	98.24 KDa
	62.00 KDa	59.19 KDa	59.99 KDa	92.11 KDa	78.48 KDa
	34.27 KDa	50.29 KDa	49.81KDa	77.29 KDa	60.59 KDa
	28.80 KDa	33.13 KDa	31.95 KDa	59.58 KDa	42.35 KDa
	26.57 KDa	28.06 KDa	28.29 Kda	42.95 KDa	32.28 KDa
	<b>α<sub>1</sub>caseína 23.73 KDa</b>	<b>α<sub>2</sub>caseína 25.28 KDa</b>	<b>α<sub>2</sub>caseína 25.18 KDa</b>	31.09 KDa	27.21 KDa
	<b>κ-caseína 19.42KDa</b>	21.57 KDa	16.49 KDa	27.79 KDa	<b>α<sub>2</sub>caseína 25.14 KDa</b>
	16.23 KDa	16.59 KDa	12.79 KDa	<b>α<sub>2</sub>aseína 25.14 KDa</b>	<b>α<sub>1</sub>-caseína 22.42 KDa</b>
	13.31KDa	<b>γ-caseína 11.92 KDa</b>	<b>γ-caseína 11.75KDa</b>	<b>α<sub>1</sub> caseína 22.51 KDa</b>	21.65 KDa
	<b>γ-caseína 11.58 KDa</b>		7.93 KDa	<b>κ-caseína 19.90KDa</b>	16.90 KDa
			7.37 KDa	16.20 KDa	15.18 KDa
				12.48 KDa	12.10 KDa
				<b>γ- caseína 11.46 KDa</b>	10.80 KDa
				10.53 KDa	
				8.39 KDa	
				7.78 KDa	
				7.23 KDa	
				6.56 KDa	

\*Proteína total en base seca

\*\* Porcentaje de solubilización esta dada por la proteína soluble / g de proteína total x 100.

\*\*\*Las fracciones de la caseína se resaltan con letras negras y los pesos moleculares se presentan en KDa

Cuadro 26. Resultados del Perfil electroforético y Porcentaje de Solubilización para F-39

*Proteína total 56.45 %	pH 2	pH4	pH6	pH8	pH10
**%Solubilización de la proteína	23.32± 1.22	40.16± 1.17	18.77± 0.97	26.22± 0.88	46.35± 1.01
	16 bandas	10 bandas	16 bandas	17 bandas	17 bandas
****Análisis electroforético	183.22 KDa	170.32 KDa	167.91KDa	156.93 KDa	192.53KDa
	87.18 KDa	65.88 KDa	81.23 KDa	82.43KDa	81.60 KDa
	<b>α caseína 22.43KDa</b>	56.58 KDa	64.84KDa	65.20 KDa	64.78KDa
	58.46 KDa	38.42 KDa	55.58KDa	56.24 KDa	56.38 KDa
	32.31 KDa	32.18KDa	30.84 KDa	31.27 KDa	46.54KDa
	30.02 KDa	30.03 KDa	27.17 KDa	30.22 KDa	31.69KDa
	27.06 KDa	26.80 KDa	<b>α caseína 22.51 KDa</b>	27.45 KDa	28.51 KDa
	24.71 KDa	<b>α-caseína 22.74 KDa</b>	21.22 KDa	<b>β-lactoglobulina 18.97KDa</b>	<b>α1caseína 23.23 KDa</b>
	<b>α caseína 23.72 KDa</b>	<b>β-lactoglobulina 18.93 KDa</b>	<b>β-lactoglobulina 18.29 KDa</b>	16.13 KDa	<b>α -caseína 22.49 KDa</b>
	20.96 KDa	12.77 KDa	<b>α-lactoglobulina 14.34 KDa</b>	15.15 KDa	<b>βlactoglobulina 18.47KDa</b>
	<b>βlactoglobulina. 18.71KDa</b>		12.13 KDa	<b>α-lactoglobulina 14.90 KDa</b>	16.60 KDa
	15.64 KDa		<b>γ-caseína 11.27 KDa</b>	12.76 KDa	<b>α -lactoglobulina. 14.23KDa</b>
	14.58 KDa		10.58 KDa	<b>γ caseína 11.82 KDa</b>	<b>γ caseína 11.58KDa</b>
	12.90 KDa		8.70 KDa	9.19 KDa	10.66 KDa
	10.83 KDa		8.20 KDa	8.51 KDa	9.21KDa
	9.42 KDa		7.91 KDa	7.71 KDa	8.18 KDa

\*Proteína total en base seca

\*\*Porcentaje de solubilización esta dada por la proteína soluble / g de proteína total x 100

\*\*\*Las fracciones de la caseína se resaltan con letras negras y los pesos moleculares se presentan en KDa

## Perfil electroforético de Muestras problema F-38 y F-39

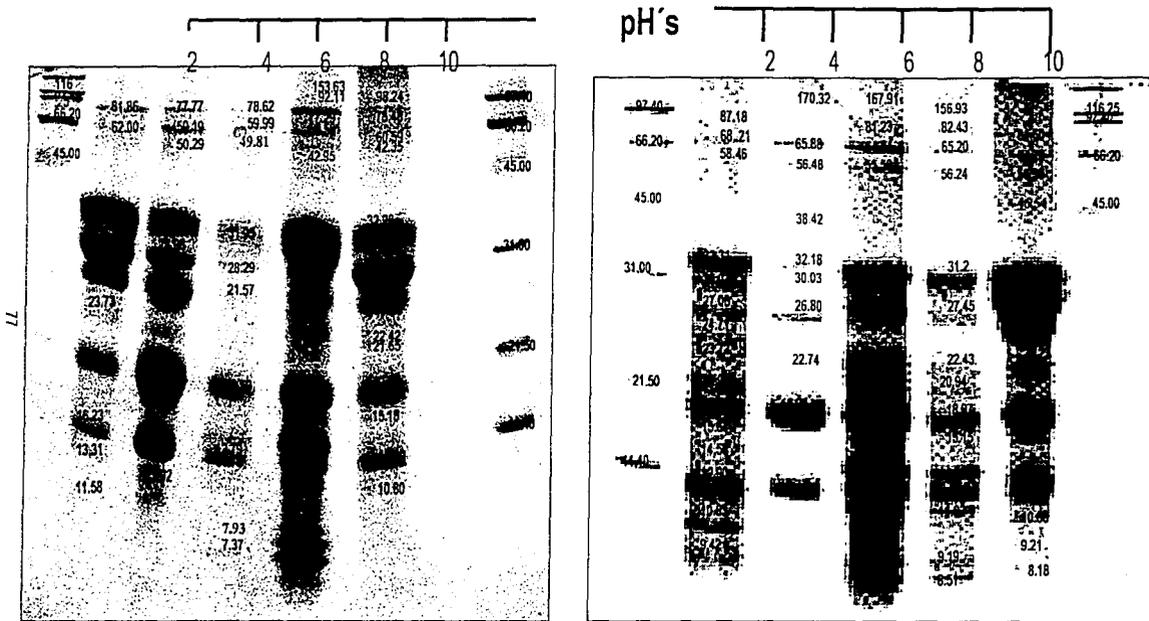


Figura 10. A la izquierda se presenta el perfil de electroforético de la muestra problema F-38, a la derecha corresponde a la muestra F-39, ambas en función del pH, en los extremos se observan los marcadores de peso molecular, la concentración de acrilamida fue al 16%.

Cuadro 27. Perfil electroforético y Porcentaje de Solubilización para F-40

*Proteína total 32.72 %	pH4	pH4	pH6	pH8	pH10
**%Solubilización de la proteína	17.80±1.14	12.22± 1.02	18.48± 0.97	15.29± 0.89	18.77± 1.00
	12 bandas	7 bandas	11 bandas	14 bandas	17 bandas
***Análisis electroforético	175.11KDa	64.28 KDa	106.08KDa	82.80 KDa	101.96KDa
	82.91KDa	32.45 KDa	84.69 KDa	64.46 KDa	78.98 KDa
	64.76 KDa	30.12 KDa	66.49 KDa	55.21 KDa	62.54 KDa
	56.54 KDa	26.82 KDa	49.03 KDa	48.18 KDa	55.01 KDa
	33.30 KDa	<b>κ-caseína 19.26KDa</b>	44.93 KDa	32.67 KDa	32.26 KDa
	28.28 KDa	12.93 KDa	42.60 KDa	27.91 KDa	28.78 KDa
	26.17 KDa	10.14 KDa	<b>κ-caseína 19.09KDa</b>	<b>αs caseína 22.80KDa</b>	26.95 KDa
	<b>β-caseína 23.40 KDa</b>		13.97KDa	21.04 KDa	<b>αs1caseína 22.80 KDa</b>
	<b>K-caseína 19.01KDa</b>		12.65KDa	17.61KDa	21.70 KDa
	17.01 KDa		<b>γ-caseína 11.27KDa</b>	12.56 KDa	17.80 KDa
	13.26 KDa		10.46 KDa	<b>γ-caseína 11.93KDa</b>	16.17 KDa
	32.99 KDa			9.81 KDa	13.87 KDa
	10.43 KDa			9.50 KDa	12.76 KDa
					<b>γ-caseína 11.90 KDa</b>
					10.39 KDa
					9.07 KDa
					8.61 KDa

\*Proteína total en base seca

\*\*Porcentaje de solubilización esta dada por la proteína soluble / g de proteína total x 100

\*\*\*Las fracciones de la caseína se resaltan con letras negras y los pesos moleculares se presentan en KDa

Cuadro 28. Perfil electroforético y Porcentaje de Solubilización para F-41

*Proteína total 32.90 %	pH 2	pH4	pH6	pH8	pH10
**%Solubilización de la proteína	21.09±0.23	4.54± 0.63	10.06± 0.85	5.22± 0.95	14.33± 0.43
	13 bandas	12 bandas	12 bandas	15 bandas	17 bandas
**Análisis electroforético	83.62KDa	226.11 KDa	83.72 KDa	82.49 KDa	82.06 KDa
	63.77 KDa	110.22 KDa	66.26 KDa	65.35 KDa	65.13 KDa
	58.20 KDa	86.49 KDa	57.83 KDa	56.29 KDa	56.69 KDa
	34.94 KDa	65.52 KDa	33.46 KDa	33.23 KDa	33.28 KDa
	32.54 KDa	57.18 KDa	32.73 KDa	31.95 KDa	28.72 KDa
	28.57 KDa	33.77KDa	29.20 KDa	28.79 KDa	27.55 KDa
	26.95 KDa	32.87 KDa	27.56 KDa	27.89 KDa	25.44 KDa
	26.67 KDa	29.15 KDa	26.61 KDa	<b>B-caseína</b> 24.16 KDa	<b>B-caseína</b> 24.02 KDa
	<b>K-caseína</b> 19.04 KDa	27.58 KDa	<b>K-caseína</b> 19.00 KDa	<b>α1 -caseína</b> 23.40 KDa	<b>K-caseína</b> 19.66 KDa
	<b>α-lactoglobulina.</b> 14.41 KDa	<b>K-caseína</b> 19.67 KDa	<b>α-lactoglobulina.</b> 14.62 KDa	<b>K-caseína</b> 19.74 KDa	15.66 KDa
	<b>γ-caseína</b> 11.02KDa	16.75 KDa	13.20 KDa	<b>αlactoalbumina.</b> 14.44 KDa	<b>αlactoalbumina</b> 14.58 KDa
	10.43 KDa	<b>α-lactoalbumina</b> 14.01 KDa	<b>γ-caseína</b> 11.06 KDa	13.37KDa	13.37 KDa

\*Proteína total en base seca

\*\*Porcentaje de solubilización esta dada por la proteína soluble / g de proteína total x 100

\*\*\*Las fracciones de la caseína se resaltan con letras negras y los pesos moleculares se presentan en KDa

# Perfil electroforético de Muestras problema F-40 y F-41

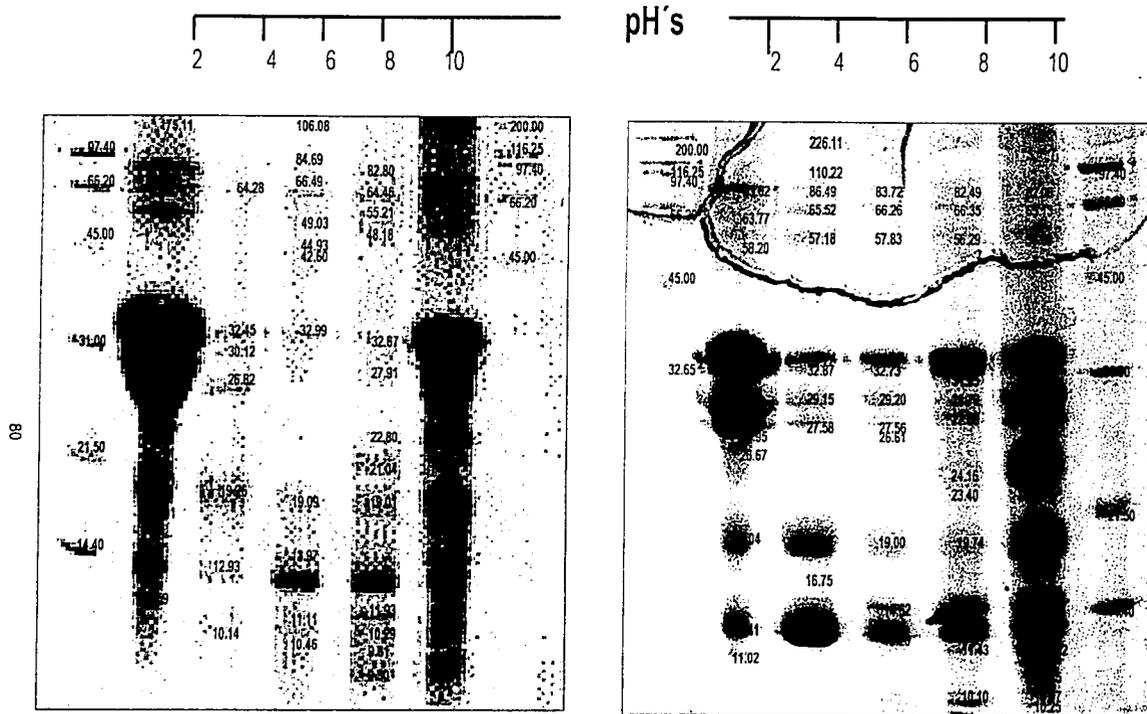


Figura 11. A la izquierda se presenta el perfil de electroforético de la muestra problema F-40, a la derecha corresponde a la muestra F-41, ambas en función del pH, en los extremos se observan los marcadores de peso molecular, la concentración de acrilamida fue al 16%.

Cuadro 29. Perfil electroforético y Porcentaje de Solubilización para F-42

*Proteína total 32.69%	pH 2	pH4	pH6	pH8	pH10
**%Solubilización de la proteína	4.68±01.14	13.5± 0.56	15.93± 0.66	22.78± 0.55	14.06± 0.71
***Análisis electroforético	14 bandas	10 bandas	16 bandas	18 bandas	10 bandas
	118.52 KDa	105.50 KDa	100.76 KDa	94.45 KDa	86.85 KDa
	106.46 KDa	90.31 KDa	85.61 KDa	87.35 KDa	68.54 KDa
	101.80 KDa	76.75 KDa	61.91 KDa	76.19 KDa	59.50 KDa
	92.56 KDa	39.99 KDa	37.53 KDa	64.15 KDa	34.29 KDa
	81.61 KDa	32.35 KDa	35.77 KDa	35.86 KDa	29.05 KDa
	43.28 KDa	30.53 KDa	29.75 KDa	33.28 KDa	27.64 KDa
	39.06 KDa	K-caseína 19.94 KDa	28.56 KDa	28.76 KDa	26.55 KDa
	30.56 KDa	α-lactoalb. 14.83 KDa	27.12 KDa	27.16 KDa	K-caseína 19.96 KDa
	α2caseína 25.90KDa	γ-caseína 11.49 KDa	26.33 KDa	26.01 KDa	α-lactoalb. 14.17 KDa
	α s-caseína 21.04 KDa	10.47 KDa	B-caseína 24.45 KDa	B-caseína 24.13 KDa	12.47 KDa
	K-caseína 19.43 KDa		α s-caseína 22.95 KDa	αs1-caseína 23.19 KDa	
	17.20KDa		K-caseína 19.97 KDa	K-caseína 19.06 KDa	

\*Proteína total en base seca

\*\*Porcentaje de solubilización esta dada por la proteína soluble / g de proteína total x 100

\*\*\*Las fracciones de la caseína se resaltan con letras negras y los pesos moleculares se presentan en KDa

Cuadro 30. Perfil electroforético, Porcentaje de Solubilidad y Solubilización para F-43

*Proteína total 43.28 %	pH 2	pH4	pH6	pH8	pH10
**%Solubilización de la proteína	23.4± 0.8	12.85± 0.58	35.57± 0.74	29.14± 1.04	31.28± 0.93
	12 bandas	8 bandas	8 bandas	12 bandas	8 bandas
****Análisis electroforético	232.60 KDa	82.64 KDa	226.32 KDa	81.18 KDa	82.59 KDa
	185.88 KDa	65.37 KDa	80.11 KDa	67.44 KDa	63.54 KDa
	155.61 KDa	32.69 KDa	66.09 KDa	56.28 KDa	58.94 KDa
	106.23 KDa	26.76 KDa	58.63 KDa	32.62 KDa	33.59 KDa
	84.98 KDa	$\alpha$ s2-caseína 25.51 KDa	33.93 KDa	30.70 KDa	31.73 KDa
	68.25 KDa	B-caseína 24.01 KDa	$\alpha$ s2-caseína 25.64 KDa	$\alpha$ s2caseína 25.56 KDa	$\alpha$ s2caseína 25.44 KDa
	56.38 KDa	K-caseína 19.87 KDa	K-caseína 19.33 KDa	$\alpha$ s1caseína 23.70 KDa	K-caseína 19.81 KDa
	32.38 KDa	12.01 KDa	12.50 KDa	$\alpha$ scaseína 22.03 KDa	13.40 KDa
	B-caseína 24.33 KDa			20.83 KDa	
	K-caseína 19.74 KDa			K-caseína 19.39 KDa	
	12.88 KDa			12.18 KDa	
	$\gamma$ -caseína 11.37 KDa			$\gamma$ -caseína 11.74 KDa	

\*Proteína total en base seca

\*\*Porcentaje de solubilización esta dada por la proteína soluble / g de proteína total x 100

\*\*\*Las fracciones de la caseína se resaltan con letras negras y los pesos moleculares se presentan en KDa

## Perfil electroforético de Muestras problema F-42 y F-43

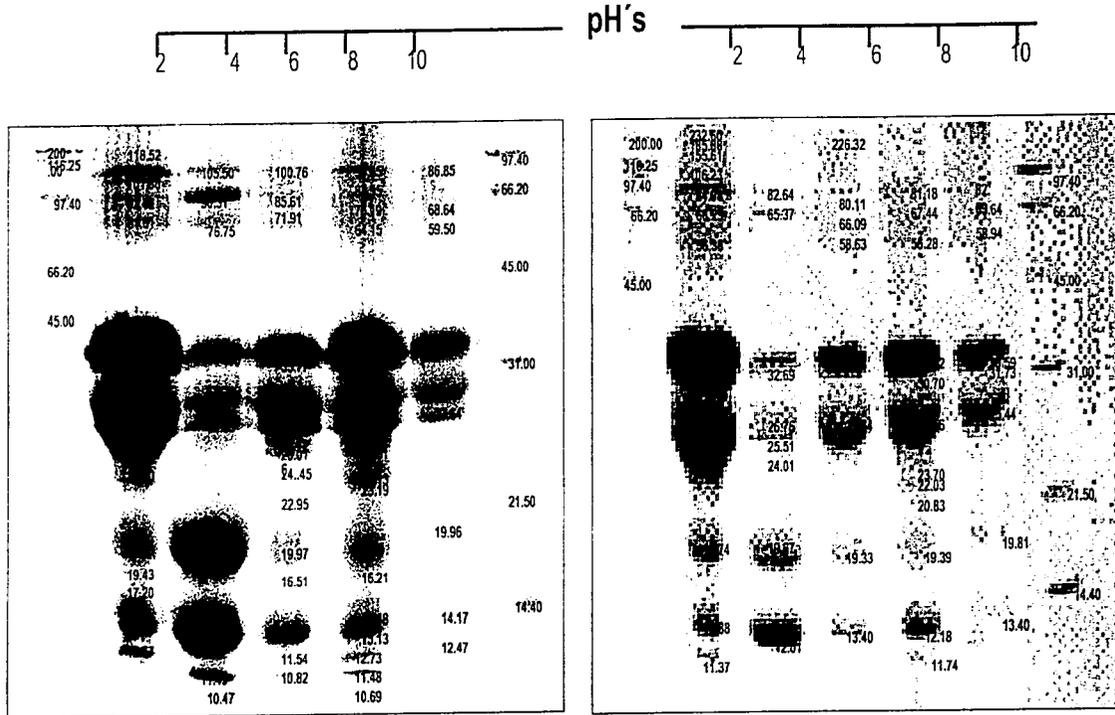


Figura 12. A la izquierda corresponde al perfil de electroforético de la muestra problema F-42, a la derecha corresponde a la muestra F-43, ambas en función del pH, en los extremos se observan los marcadores de peso molecular, la concentración de acilamida fue al 16%.

Cuadro 31. Perfil electroforético, Porcentaje de Solubilidad y Solubilización para F-44

*Proteína total 37.39 %	pH 2	pH4	pH6	pH8	pH10
**%Solubilización de la proteína	20.81± 0.32	18.65± 0.56	19.5± 1.25	25.12± 0.62	27.09± 0.45
	<b>12 bandas</b>	<b>10 bandas</b>	<b>8 bandas</b>	<b>8 bandas</b>	<b>8 bandas</b>
****Análisis electroforético	169.28 KDa	82.52 KDa	85.28 KDa	199.53 KDa	86.25 KDa
	90.06 KDa	64.48 KDa	69.87 KDa	85.31 KDa	68.74 KDa
	85.33 KDa	54.09 KDa	50.00 KDa	71.58 KDa	57.01 KDa
	65.73 KDa	48.60 KDa	45.26 KDa	33.91 KDa	32.75 KDa
	55.96 KDa	35.55 KDa	32.47 KDa	<b>α s2caseína</b> <b>25.90 KDa</b>	30.93 KDa
	32.52 KDa	31.15 KDa	30.67 KDa	<b>K-caseína</b> <b>19.32 KDa</b>	28.07 KDa
	29.83 KDa	27.02 KDa	27.97 KDa	<b>α-lactoalbumina.</b> <b>14.19 KDa</b>	27.08 KDa
	<b>α s2caseína</b> <b>25.79 KDa</b>	<b>α s2caseína</b> <b>25.99 KDa</b>	27.29 KDa	13.37 KDa	<b>α s2caseína</b> <b>25.47 KDa</b>
	K-caseína	16.52 KDa	<b>α s2caseína</b> <b>25.52 KDa</b>		<b>α s1caseína</b> <b>23.45 KDa</b>
	16.77KDa	12.42 KDa	K-caseína 19.76 KDa		<b>α scaseína</b> <b>22.45 KDa</b>
	13.30KDa		<b>α-lactoglo.</b> <b>14.30 KDa</b>		K-caseína 19.97 KDa
	<b>γ-caseína</b> <b>11.76 KDa</b>		12.95 KDa		<b>α-lactoalb.</b> <b>14.34KDa</b>
			10.76 KDa		13.02 KDa
			8.86 KDa		<b>γ-caseína</b> <b>11.34 KDa</b>
			8.32 KDa		8.21 KDa

\*Proteína total en base seca

\*\*Porcentaje de solubilización esta dada por la proteína soluble / g de proteína total x 100

\*\*\*Las fracciones de la caseína se resaltan con letras negras y los pesos moleculares se presentan en KDa

## Perfil electroforético de Muestras problema F-44

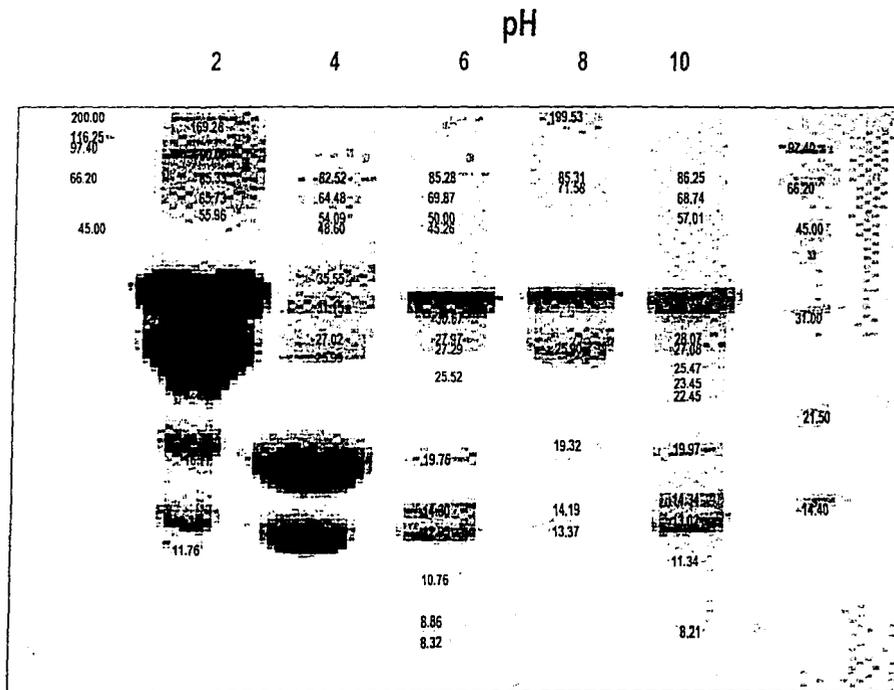


Figura 13. Perfil de electroforético de la muestra proble F-44 en función del pH, en los extremos se observan los marcadores de peso molecular, la concentración de acrilamida fue al 16%.

Mediante las técnicas propuestas se determinó la adición de algunos componentes principales como; carbohidratos y proteínas en muestras de preparaciones alimenticias.

Mediante el análisis químico proximal podemos determinar la adicción de más proteína pero no nos proporciona información sobre la identidad de las proteínas presentes. Pero si el análisis electroforético mediante el software Quantity One (Biorad), confirma la designación de preparación láctea para las muestras comerciales y las muestras problema al identificar por peso molecular las bandas presentes en cada pH y con ello comparar con las características de una leche entera.

En comparación con técnicas cromatográficas (HPLC), la electroforesis SDS-PAGE permite determinar glicosilaciones de proteínas así como la cuantificación de pequeños péptidos presentes, mientras que para las técnicas como el HPLC (Walsh y Brown 2000, Bobe et al,1999) sólo se puede cuantificar péptidos mediante la adquisición de columnas específicas de mayor costo, además de tener interferencia por microorganismos psicrófilos provenientes de *Pseudomonas spp.* La electroforesis capilar permite cuantificar péptidos, sin embargo algunas investigaciones (Miralles y Ramos,2001, van Riel y Olieman,1995) refieren interferencia, por la liberación de péptidos por parte de proteasas en leche fluida, mientras que para leche en polvo esta interferencia podría ser menor de acuerdo al proceso de almacenamiento después de su elaboración. Tanto la electroforesis SDS-PAGE y la capilar dependen del tiempo de almacenamiento del producto para garantizar resultados confiables.

Considerando lo anterior la técnica de electroforesis unidimensional aquí propuesta, en combinación con los análisis proximales, de solubilidad y pH, acidez y viscosidad, resulta ser mas económicos y sencillos, para cualquier laboratorio de análisis rutinario.

## CONCLUSIONES

## 5.0 Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

- 1.- La leche bronca liofilizada en el laboratorio de acuerdo al análisis químico proximal cumple con las especificaciones para la leche fluida de acuerdo con la norma NMX-F-026-1997-SCFI.
- 2.- De acuerdo al análisis químico proximal, las muestras problema y la leche comercial no cumplen con las especificaciones para la denominación de leche en polvo. El porcentaje de carbohidratos resulta superior, por presencia de carbohidratos complejos.
- 3.- Los resultados del porcentaje de solubilidad en función del pH de las muestras problema y leche comercial indican la presencia de proteínas o concentrados del suero de leche adicionados para favorecer las propiedades funcionales al incrementar su solubilidad o abaratar los aranceles de importación.
- 4.- El perfil electroforético permite confirmar la composición de las preparaciones alimenticias estudiadas.
- 5.- Las muestra F-44 y F-39 corresponden en identidad al WPC de acuerdo al análisis electroforético.
- 6.- Con base en las similitudes de los patrones electroforéticos las muestras restantes se identificaron como mezclas de proteínas de suero y caseinatos y por las diferencias en el contenido de proteína se concluye que no corresponden a la denominación de leche en polvo.
- 7.- Se propone que la metodología para identificar la adulteración de leches en polvo incluya:
  - análisis químico proximal
  - porcentaje de solubilidad en función del pH.
  - perfiles electroforéticos SDS-PAGE

Esta combinación de métodos de prueba resulta ser rápida, sencilla, económica y confiable en comparación con las técnicas de HPLC y electroforesis capilar, que requieren de una preparación más rigurosa, por lo que esta técnica permite acoplarse a un laboratorio de análisis tradicional.

### Recomendaciones

Realizar un análisis por electroforesis bidimensional, para definir las bandas que no logran ser analizadas con la electroforesis en una sola dimensión.

Para lograr cuantificar las fracciones proteicas presentes en los geles de PAGE-SDS se recomienda utilizar estándares de concentración y de esta manera se podrá determinar el porcentaje de la adulteración.

Identificar y cuantificar los carbohidratos complejos presentes en las mezclas de leche en polvo, mediante HPLC.

## ANEXO I

Cuadro 1. Porcentaje de Humedad

MUESTRA	HUMEDAD %
Caseína	7.8
Suero de leche	3.94
Caseinato de sodio	8.83
Caseinato de calcio	7.15
Leche comercial en polvo	5.75
Leche bronca liofilizada	4.0
WPC	3.3
F-38	5.48
F-39	7.63
F-40	6.22
F-41	6.74
F-42	6.43
F-43	6.55
F-44	7.50

Promedio de seis repeticiones y su desviación estándar

Cuadro 2. Análisis estadístico de la prueba de rango múltiple de Duncan

Grupos	Cenizas	Grasa	Proteína	Carbohidratos totales
1er grupo	F-41 y F-42	WPC, F-38, F-40 y F-41	Leche Bronca F-40, F-41, F-42	
2do grupo	F-43 y F-44	Caseinato de calcio, F-40 y F-44		

---

---

## Bibliografía

- ❖ A.O.A.C. 1995 Official Methods of Analysis 15<sup>th</sup> Edition Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. Capter 33. Volumen II
- ❖ Alais H. 1990. Ciencia de la Leche. Editorial Chapman and May. Capitulo XXII p. 230 – 557.
- ❖ American Dry Milk Institute (ADMI, 1971) 8 : 678-691.
- ❖ Amilo, J. 1994 Ciencia y Tecnología de la Leche. Editorial Acribia. Zaragoza, España. p. 1-55, 159 – 335.
- ❖ Bikker, J. Skelte, F., . Anema, G., Li, Y., y Hill, J.. Rheological properties of acid gels prepared from heat milk fortified with whey proteins mixtures containing the A, B and C variants of  $\beta$ -lactoglobulin. 2001. Journal of Dairy Science. 10: 722 – 732.
- ❖ Bobe G. Beitz, D.C.; Freeman, A.E.; Lindberg, G.L. Separation and quantification of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. 1999. Journal of Agricultural and Food Chemistry; 46(2), 458-463.
- ❖ Boulet-M; Britten- M; Lamarche- F. Voluminosity of some food proteins in aqueous dispersions at various pH and ionic strengths. 1999. Journal a Food Science. 12 (4): 433 – 441.
- ❖ Casper J.L.; Wendorff, W.L.L y Thomas D.D.L. functional properties of whey protein concentrates. Journal of Dairy Sciences. Vol 82. No 2: 265 – 271.
- ❖ Cheffel J.C. Cuaq J.L. y Lorient, D. 1989. Proteínas Alimentarias. Editorial Acribia. Zaragoza, España. p. 179 – 212.
- ❖ CODEX STAN207-1999 <http://www.codex-online.com/codex/home.nsf>
- ❖ Dalglesh-DG. Emulsions made with milk proteins; Formation and stability towards calcium ions. 1998. Leatherhead- Food- RA-Food Industry- Journal. 1 (2) : 80-85.
- ❖ Diario Oficial de la Federación. 14 de Noviembre del 2001. Proyecto de Norma Oficial Mexicana (PRY-NOM-000-SCFI-2001).
- ❖ Dubois,, M., Gilles, K., Hamilton, J. y Rebers, P. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. 1956. Analytical Chemistry 28,350-356.
- ❖ Early, Ralph 1999. The Technology of Dairy Products 2<sup>th</sup>. Ed. Blackie Chapman and Hall. p. 228 – 301.

- 
- ❖ FAO:2001 Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. <http://www.fao.org>.
  - ❖ Fenema O.R. 1997. Food Chemistry 3<sup>th</sup> Edition. Ed. Marcel Dekker, Inc. USA. p. 417 – 758.
  - ❖ Ferreira B. Ricardo, Emanuel Franco and Artur R. Telxeira. Calcium and Magnesium. Depend Aggregation of proteins. 1999. Journal Agricultural Food Chemistry. 47: 3009 – 3015.
  - ❖ Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. 1998. Dairy Chemistry and Biochemistry. Blackie Academic and Professional, Londres. 478 pp.
  - ❖ García Amigo, Molina E. Use of phast gel sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis for rapid characterization of soy bean proteins in comercial soybean product. 2000. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies; 23(13). 2021-2031.
  - ❖ Gaucheron F; Mollè, D y Pannetier, R. Influence of pH on the heat-induced proteolysis of casein molecules. 2001. Journal of Dairy Research (68) : 71-80.
  - ❖ Guzman-Gonzalez, Marais M; Ramos M; Amigo F. Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low fat set-type yogurt model system. Use of whey protein concentrates, milk proteins concentrates and skimmed milk powder. 2000. Journal of the Science of Food and Agriculture; 79(8). 117-1122.
  - ❖ Hussein T y Chobert, JM. Recent progress in processing of dairy proteins a review. 1999. Journal Food Biochemistry; 23 : 367-407.
  - ❖ Igarashi Y. Separation of casein by chemical procedures. 1999. Journal Dairy International; 9, 377-378.
  - ❖ Imm J.Y y J.M. Regenstein. Emulsification of commercial Dairy Proteins with exhaustively washed muscle. 1998. Journal of Food Science. (63) 6: 1012- 1017.
  - ❖ Jacoba M.S. Renkema, Caltriona M.M. Lakemond, Harmen H.J de Jongh, Harry Gruppen, Ton van Vliet. The effect of pH on heat desnaturation and gel forming proprieties of milk proteins. 2000. Journal of Biotechnology. 79: 223-230.
  - ❖ Jianshe-Chen; Dickinson-E. Viscoelastic properties of heat-set whey protein emulsion gels. 1999. Journal of Texture Studies; 29 (3) : 285 – 304.
  - ❖ Keating, F. 1999. Introducción a la Lactología 2da edición. Editorial Limusa. México . 234-345, 360-377.
  - ❖ Laporte, F y Paquin, P. Near infrared analysis of fat, protein and casein in cow's milk. 1999. Journal Agricultural Food Chemistry. 47:2600-2605.

- 
- ❖ Ley General de Salud. Reglamento en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. 1998. Vol I. Secretaria de Salud.
  - ❖ López Tapia J; Ramos, M; Garcia Risco, M; López Fandiño, R. Detection of milk powder by sodium dodecyl sulfate capillary electrophoresis. 1999. Journal of Chromatography A. 836: 153-160.
  - ❖ Lynch, A.G. Mulvihill, D.M. Law, A.J. Leaver, Chromatographic elution profiles, electrophoretic properties and free amino acid sulphhydryl group contents of commercial sodium caseinates. Journal 1997. Journal of Chromatography A; 7(4): 213-220.
  - ❖ Madrid F. 1990. Química Lactológica. 2da edición. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
  - ❖ Miller, G.L. . Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of reducing sugar. 1959. Analytical Chemistry, 31(3) : 426-431.
  - ❖ Miralles, B y Ramos, M. Improved method for the simultaneous determination of whey proteins, caseins and K-casein in milk and dairy products by capillary electrophoresis. 2001. Journal of Chromatography; 915 : 225-230.
  - ❖ Morales FJ, Romero, C y Jiménez Pérez, S. Characterization of industrial processed milk by analysis of heat- induced changes. 2000. Journal of Food Science and Technology (35) : 193-200.
  - ❖ Noble P. Wong; R y Keeney, M. 1999. Fundamentals of Dairy Chemistry. Third edition. Editorial An Aspen Publication. Gaithersburg, Maryland.
  - ❖ Nungaray, J. Efecto de algunos adulterantes sobre el comportamiento reológico de la leche cruda y su posible uso como estrategia de análisis en la determinación de su calidad o adulteración. 2001. Memorias del IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 10 – 14 sept. 69.
  - ❖ Ochikhuyag, S. Characterization of milk protein of soybean proteins from SDS electrophoresis. 1998. Journal of Food Biochemistry. (22) : 105 – 124.
  - ❖ Peterson, G. A simplification of the protein assay of Lowry et al. which is more generally applicable. 1997. Anal Biochemistry 83 : 346-356.
  - ❖ Pinto, M; Casadini V; Brito, C. Detección de sólidos totales de suero de quesería en leche pasteurizada por electroforesis en gel de poliacrilamida. 1995. Alimentos. 3(46), 23-31.

- ❖ Peng; Q y Puhan, Z. Determination of protein and casein in milk by fourth derivate UV spectrophotometer. 1999. Analytical Chemistry. 393.:227-234.
- ❖ Popineau y Bollecker S. et Thebaudin J.Y. (1998). Caracterisation biochimique et fonctionnelle des proteines de gluten desamidees partiellement en conditions menagees. Sciences des Aliments. 8(4): 411-430.
- ❖ Richardson, G.H. 1985. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 15<sup>th</sup> edition. p 42, 327, 405. Schagger Hermann and Jagow Von. Tricine-Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa. 1997. Analytical Biochemistry;166, 368-379.
- ❖ Secretaria de Agricultura, Ganaderia y Desarrollo Rural. <http://www.sagar.gob.mx> <http://www.siea.sagarpa.gob.mx> (2001).
- ❖ Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. <http://www.secofi-sniim.gob.mx> Norma Mexicana. NMX-F-026-1997-SCFI.
- ❖ Secretaria de Desarrollo Social, Programa Progresá 2001. [www.sedesol.gob.mx](http://www.sedesol.gob.mx)
- ❖ Secretaria de Salud. Manual de calidad 1999. Sistemas de HACCP. Vol 1: p. 89-103.
- ❖ Slattery, H. and Fitzgerald, R.J. Functional properties and Bitterness of sodium caseinate hydrolysates prepared with a *Bacillus Proteinsase*. 1998. Journal of Food Science; 63 (3) : 418 – 422.
- ❖ Spreer E. 1991. Milk and Dairy Product Technology. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- ❖ Syrbe A; Klostermeyer H. Polymer science concepts in dairy systems and overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. 1999. Journal Dairy International; 8(3), 179-193.
- ❖ Syrbe, A; Baver-wj; Klostermeyer-H. Polymer Science. Concepts in dairy systems an overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. 1999. Journal of Dairy Science. 8 (3): 179-193.
- ❖ Trujillo A.J; Casals y Guamis B. Functional properties cows milk by reverse- phase high performance. 2000. Journal of Dairy Science. (83) (1) : 11-19
- ❖ Van Riel y Olieman, C. Determination of caseinomacropeptide with capillary zone electrophoresis and its application the detection and estimation of rennet whey solids in milk and butter milk powder. 1995. Electrophoresis; 16, 529-533.
- ❖ Varnam A H. y Sutherland J.P. 1994. Milk and Milk Products. 2<sup>th</sup>. Editorial. Chapman and Hall. p. 1 – 33, 159 – 180.
- ❖ Visser S; Oleieman C. Electrospray ionization mass spectrometry of analysis of proteins and peptides. 1999. Journal Dairy International; 32 (4). 11- 15.

- ❖ Walsh MK y Brown, R. Use of amino acid analysis for estimating the individual concentrations of protein in mixtures. 2000. Journal of Chromatography. 891 : 355-360.
- ❖ Walstra P y Jenness R, 1987. Química y Física Lactológica. Acribia S.A, Zaragoza. 123-234, 334-41).
- ❖ Walstra P; Geurts.T.J, Noomen A.; Jellema A.. 1999. Dairy Technology. Editorial. Marcel Dekker, Inc. Nnew York. Basel. p. 147-150, 445-469
- ❖ Wnag Hye; Haertlé Thomas; Chobert Jean Marc. Recent Progress in Processing of Dairy Proteins. 1999. Journal of Food Biochemistry; 23 : 367-407.