

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología II



**DETECCIÓN DE CASEINATO Y SUERO EN LECHE
Y PRODUCTOS LÁCTEOS MEDIANTE TÉCNICAS
ELECTROFORÉTICAS, CROMATOGRÁFICAS Y
ESPECTROSCÓPICAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Beatriz Miralles Buraglia

Bajo la dirección de las doctoras

Lourdes Amigo Garrido
Mercedes Ramos González

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-2014-5

El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el Instituto de Fermentaciones Industriales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) bajo la dirección de la Dra. Lourdes Amigo y la Dra. Mercedes Ramos, Científica titular y Profesora de investigación, respectivamente, de dicho instituto. Quiero agradecerles no sólo mi formación investigadora sino su buena acogida, su apoyo y sus consejos personales.

Quiero expresar mi gratitud al Dr. Jeffrey Leaver, investigador del Hannah Research Institute de Ayr (Reino Unido), por haber puesto a mi disposición los medios de este instituto y haber compartido su experiencia en espectrometría de masas, y por su amabilidad durante mi estancia breve allí. Quisiera agradecer también al Dr. Andrew Law y a la Dra. Athina Tziboula sus consejos.

Agradezco a la Dra. M^a Luisa Pérez Rodríguez, Profesora titular del Departamento de Nutrición y Bromatología II de la Facultad de Farmacia de la UCM y ponente de esta tesis, la dedicación y ayuda prestada, especialmente en los últimos momentos de su redacción.

Quiero expresar mi reconocimiento a la Dra. Carmen Polo, directora del Instituto de Fermentaciones Industriales, por las facilidades con las que he contado para la realización de este trabajo. A la Dra. Begoña Bartolomé, Científica Titular del Instituto, por los conocimientos adquiridos en espectroscopía y su valiosa colaboración en mi trabajo, al Dr. Pedro J. Martín-Alvarez, Investigador Científico, por su ayuda en el tratamiento estadístico, a la Dra. Marisi Recio, Colaboradora científica interina, por sus sugerencias sobre la preparación de los sistemas modelo y a la Dra. Encarnación Pueyo, Titulado superior, por sus enseñanzas sobre los equipos de cromatografía. El interés y la orientación de los Drs. Agustín Olano, Rosina López-Alonso, Marta Calvo y Alejandro Cifuentes, del Instituto de Fermentaciones Industriales, y de los Drs. José Carlos Díez-Masa y Mercedes de Frutos, del Instituto de Química Orgánica General, han supuesto un importante incentivo.

Quiero agradecer a Constanza Talavera, Leticia Cano, José Antonio del Prado y Conchita Adán su participación activa en mi trabajo y su amabilidad.

Mi más sincero agradecimiento por su amistad y comprensión a mis compañeros de laboratorio, los doctores Elena Molina, Josefina Belloque, M^a Victoria Moreno, Adolfo Martínez y, especialmente, a la próxima doctora Mónica Rodríguez, y María Manso, Gonzalo Taborda, Blanca Hernández, Myriam del Pozo, José Angel Gómez, Luisa Ramos y Volker Rothbauer, por los momentos que hemos compartido.

Mi agradecimiento a José Luis Andreu, M^a Luisa Mulas y Angelines González por la ayuda que me han prestado, y a todas las personas del Instituto de Fermentaciones Industriales que han contribuido a la realización de este trabajo.

Agradezco al Ministerio de Educación y Cultura la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador y una ayuda para una estancia corta en el extranjero. También quiero agradecer a los participantes en el proyecto europeo SMT-CT97-2208 del Istituto Sperimentale Lattiero-Caseario de Lodi, Italia y del Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel Weihnstephan de Freising, Alemania, por la elaboración de las muestras de queso.

Finalmente deseo expresar mi cariño y agradecimiento a mis padres, por su estímulo y apoyo, a mi hermano, por su ayuda con los ordenadores, y especialmente a Gabriel, que ha compartido y entendido el esfuerzo y al mismo tiempo la recompensa que supone este trabajo.

LISTA DE ABREVIATURAS

A _c :	Área corregida
ACN:	Acetonitrilo
BSA:	Seroalbúmina
CE:	Electroforesis capilar
CMP:	Caseinmacropéptido
CN:	Caseína
CSIC:	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
DHA:	Dehidroalanina
di:	Diámetro interno
DIN:	Instituto alemán para la normalización
DOCE:	Diario Oficial de la Unión Europea
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Etilendiaminotetraacetato disódico
ELISA:	Ensayo con enzimas ligadas en inmunoabsorbentes
FMOC:	9-Fluorenilmetilcloroformiato
FPLC:	Cromatografía líquida rápida de proteínas
HPLC:	Cromatografía líquida de alta eficacia
ESI-MS:	Espectrometría de masas con ionización por electrospray
IDF:	Federación Internacional de Lechería
IEF-IEF:	Isoelectroenfoque en gradiente de pH inmovilizado
Ig:	Inmunoglobulinas
LAL:	Lisinoalanina
Lf:	Lactoferrina
MHEC:	Metilhidroxietil celulosa
min:	Minutos
MOPS:	Ácido mofolinopropanosulfónico
M _r :	Masa relativa
NCN:	Nitrógeno no caseínico
NMR:	Resonancia magnética nuclear
NPN:	Nitrógeno no proteico

OI:	Ósmosis inversa
p:	Probabilidad
P:	Fósforo
PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pI:	Punto isoelectrico
PS/PT:	Proteína de suero/proteína total
RSD:	Desviación estándar relativa
r:	Coefficiente de correlación
R:	Coefficiente de resolución
R ² :	Coefficiente de determinación
RTM:	Tiempo de migración relativo
s:	Desviación estándar residual
seg:	Segundos
SD:	Desviación estándar
SDS-CE:	Electroforesis capilar con dodecil sulfato sódico
TCA:	Ácido tricloroacético
TN:	Nitrógeno total
Tris:	Tris (hidroximetil) aminometano
ua:	Unidades de área
uA:	Unidades de absorbancia
ufc:	Unidades formadoras de colonias
UHT:	Tratamiento térmico a alta temperatura
UV-2 nd -DS:	Espectroscopía ultravioleta de la 2 ^a derivada
UV-4 th -DS:	Espectroscopía ultravioleta de la 4 ^a derivada
α-La:	α-Lactoalbúmina
β-Lg:	β-Lactoglobulina
λ:	Longitud de onda
μS:	Microsiemens

This thesis describes the analysis of the protein fraction of milk and different milk products by high resolution analytical techniques. It is structured in three chapters.

In the first chapter the determination of the whey protein/total protein ratio in milk has been studied with the aim to detect additions of whey. A method of UV 4th derivative spectroscopy (UV 4th DS) has been optimized to determine the above mentioned ratio without influence of heat treatment or degree of proteolysis of milk. This method has permitted to detect the addition of whey to UHT milk in a proportion of 5% in protein. A capillary zone electrophoresis method (CE) and a sodium dodecyl sulphate CE method (SDS-CE) have also been evaluated to determine the whey protein/total protein ratio. The results obtained with these three methods have been compared when applied to samples of milk with different heat treatments, and similar results have been obtained. As milk proteolysis has influence on the results obtained by CE, some indicators that can be useful to determine this degradation in raw and UHT milk have been studied.

In the second chapter, some of the available techniques for the detection of the addition of casein or caseinate to processed, Quarg and Mozzarella cheeses have been evaluated. The quantification of intact κ -CN has demonstrated its suitability to detect acid casein in renneted cheeses if the addition has been done after the rennet action, while it would not be useful in cheeses made with acid coagulation. In these cheeses, however, rennet casein addition can be detected by the quantification of para- κ -CN. CE has permitted the determination of the addition of casein/caseinate to processed cheeses without influence of its content in milk powder in a proportion up to 1.2%. The results obtained by this technique and by immobilized pH gradient isoelectrofocusing (IPG-IEF) have been compared, showing the better repeatability of the CE. Other methods, such as the determination of lisinoalanine by HPLC, which was also evaluated, can be used as a qualitative index to detect the addition of caseinate to Mozzarella cheeses.

In the third chapter, a CE method has been developed to simultaneously quantify β -Lg and para- κ -CN in samples of milk and cheese. The application of this method has permitted to separate some degradation products that appear in refrigerated raw milk. Their presence is attributed to the activity of psychrotrophic bacteria on the κ -CN molecule. By coupling HPLC to MS, the characterization of five triptic peptides has confirmed the formation of para- κ -CN and other related peptides by the action of the extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* B52. Moreover, the CE method developed has demonstrated its suitability for the characterization of fresh cheeses by its technological process of manufacture and, in Mozzarella cheeses, besides, by the type of milk used in its manufacture.

OBJETIVOS

La introducción en la industria láctea de técnicas tanto de concentración por membranas como de precipitación ha hecho posible el desarrollo de nuevos productos como los concentrados de proteínas de suero, susceptibles de ser utilizados para adulteraciones fraudulentas de leche, o los caseinatos, que pueden reemplazar a las proteínas del queso. En los últimos años se ha prestado una especial atención a la detección de sólidos lácteos que se pueden adicionar de forma fraudulenta a la leche o a otros productos lácteos. El reglamento de la Unión Europea 1802/95 establece que en las leches en polvo no deben encontrarse sólidos procedentes de suero ya sea ácido o derivado del tratamiento de la leche con cuajo, mientras que el reglamento 2742/90 prohíbe la adición de caseína o caseinatos a quesos y fija un 5% en peso de producto el máximo a incorporar en quesos fundidos. Por todo ello existe un gran interés en el desarrollo y validación de métodos analíticos que permitan detectar las adulteraciones con estas fracciones lácteas.

Por otra parte, los métodos analíticos habituales no permiten la caracterización de la leche y los quesos respecto al proceso tecnológico seguido en su elaboración, lo que hace necesaria la búsqueda de nuevos procedimientos para evaluar estos parámetros.

El objetivo general de este trabajo ha consistido en el desarrollo y aplicación de métodos analíticos de alta resolución: electroforéticos, cromatográficos y espectroscópicos a la fracción proteica de la leche y productos lácteos con el fin de establecer estrategias analíticas capaces de detectar adiciones de suero en leche y de caseína/ caseinato en quesos, así como caracterizar la leche y el queso en función del proceso tecnológico seguido en su procesado y elaboración.

Este objetivo general implica los siguientes objetivos parciales:

- Optimizar distintos métodos espectroscópicos y de electroforesis capilar para la determinación de la relación proteínas de suero/proteína total en leches. Determinar dicha relación en leches sometidas a distintos tratamientos térmicos comparando los resultados obtenidos por los distintos métodos.

- Evaluar y optimizar los métodos analíticos disponibles con el fin de detectar adiciones de caseína/caseinato en distintos tipos de queso: fundido, Quarg y Mozzarella.

- Desarrollar un método de electroforesis capilar que permita cuantificar simultáneamente la β -Lactoglobulina y la para- κ -caseína en leche y/o queso, con el fin de caracterizar estos productos respecto al proceso tecnológico seguido en su elaboración.

La memoria se ha dividido en tres capítulos abordando en cada uno de ellos uno de los objetivos parciales. Los capítulos están estructurados en: introducción, objetivo y plan de trabajo, materiales y métodos, resultados y discusión.

**CAPÍTULO 1. DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN
PROTEÍNA DE SUERO/PROTEÍNA TOTAL EN LECHE.
DETECCIÓN DE ADULTERACIONES CON SUERO**

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 Composición proteica de la leche

La composición de la leche y las características de sus constituyentes son bien conocidos. Esta composición determina su calidad nutritiva, su valor como materia prima para la elaboración de alimentos y muchas de sus propiedades. Además de carbohidratos, lípidos, agua, vitaminas y sales minerales, la leche contiene proteínas en una proporción de 30 a 35g/litro, constituyendo ésta la fracción más compleja. Dentro de esta fracción pueden distinguirse las caseínas, que son un grupo de proteínas específicas de la leche, que contienen fosfato y son insolubles a pH 4.6 y 20° C, y las proteínas de suero, que permanecen en disolución al citado pH. Además, existen las denominadas proteínas menores y las enzimas, que aunque son despreciables en peso, tienen una actividad importante (Walstra y Jenness, 1984). La Tabla 1.1 recoge las concentraciones de las proteínas en la leche.

1.1.1.1 Caseínas

Las caseínas se presentan en la leche en forma de micelas, que son complejos esféricos con un 92% de proteína y un 8% de sales inorgánicas, principalmente fosfato cálcico. Bajo la denominación de caseínas se incluyen 4 tipos de cadenas polipeptídicas: α_{s1} -caseína (α_{s1} -CN), α_{s2} -caseína (α_{s2} -CN), β -caseína (β -CN) y κ -caseína (κ -CN). Además de un polimorfismo genético, común a todas las proteínas lácteas debido a que cada una de ellas son sintetizadas a partir de genes autosómicos co-dominantes, que pueden haber sufrido mutaciones en la secuencia de pares de bases de la molécula de ADN, existe una heterogeneidad dentro de ellas debido a modificaciones post-traduccionales. Una de las más importantes es la fosforilación de ciertos residuos de serina (Ser) y treonina (Thr) de las caseínas. También se pueden dar la glicosilación y la proteólisis producida por enzimas presentes en la leche. Esta última es patente por la presencia en la leche de las denominadas γ -

caseínas (γ -CN) y las proteasas peptonas, que son fragmentos de la β -CN producidos por la acción de la plasmina sobre esta proteína (Swaisgood, 1992).

Tabla 1.1 Concentración de las proteínas en la leche (Walstra y Jenness, 1984).

Proteína	Concentración en la leche (g/kg)	% de la proteína total (p/p)
Proteína total	33.0	100.0
Caseínas	26.0	79.5
α_{s1} -CN	10.0	30.6
α_{s2} -CN	2.6	8.0
β -CN	9.3	28.4
κ -CN	3.3	10.1
γ -CN	0.8	2.4
Proteínas de suero	6.3	19.3
β -Lactoglobulina	3.2	9.8
α -Lactoalbúmina	1.2	3.7
Inmunoglobulinas	0.7	2.1
Seroalbúmina	0.4	1.2
Varias	0.8	2.4
Proteínas de la membrana del glóbulo graso	0.4	1.2

1.1.1.2 Proteínas de suero

Las proteínas de suero tienen una estructura globular que permite que se desnaturalicen con el calentamiento dando lugar a la formación de agregados entre ellas, con las caseínas o con carbohidratos reductores. Forman parte de ellas la α -lactoalbúmina (α -La), la β -lactoglobulina (β -Lg), la seroalbúmina bovina (BSA),

las inmunoglobulinas (Ig), la lactoferrina (Lf) y algunos péptidos de bajo peso molecular que provienen de la proteólisis de las caseínas.

1.1.2 Estandarización del contenido proteico de la leche

La estandarización del contenido en proteínas de la leche es una cuestión controvertida, que no sólo tiene implicaciones tecnológicas, sino que debe ser considerada en un contexto más amplio incluyendo aspectos nutricionales, de legislación, de actitud del consumidor y de economía (Anónimo, 1998). La Federación Internacional de Lechería (IDF) es de la opinión de que el ajuste proteico de los productos lácteos, dentro del intervalo natural de concentraciones observado, proporcionaría beneficios al consumidor, a los fabricantes de alimentos, y productores de leche sin comprometer la nutrición, la seguridad alimentaria o la transparencia en lo indicado en las etiquetas. De esta forma se fabricarían productos de valor proteico constante, el procesado de los productos no estaría sujeto a la variabilidad natural, y los productores de leche obtendrían un beneficio más justo por su producto (Puhan, 1996).

Cuando se discuten las posibilidades de la estandarización proteica de la leche, la cuestión es si se debe realizar sin alterar la relación caseína/proteínas de suero o mediante la adición de proteínas lácteas aisladas previamente, siendo preferida la primera opción.

1.1.2.1 Empleo de los procedimientos de membrana

El desarrollo de los procedimientos de membrana permite extraer, separar o concentrar uno o varios de los componentes de la materia prima láctea (Figura 1.1). Estos procesos no sólo tienen aplicación en la industria alimentaria sino que permiten obtener productos de gran valor en dietética, farmacia o para alimentación artificial (Maubois, 1990 y 1998).

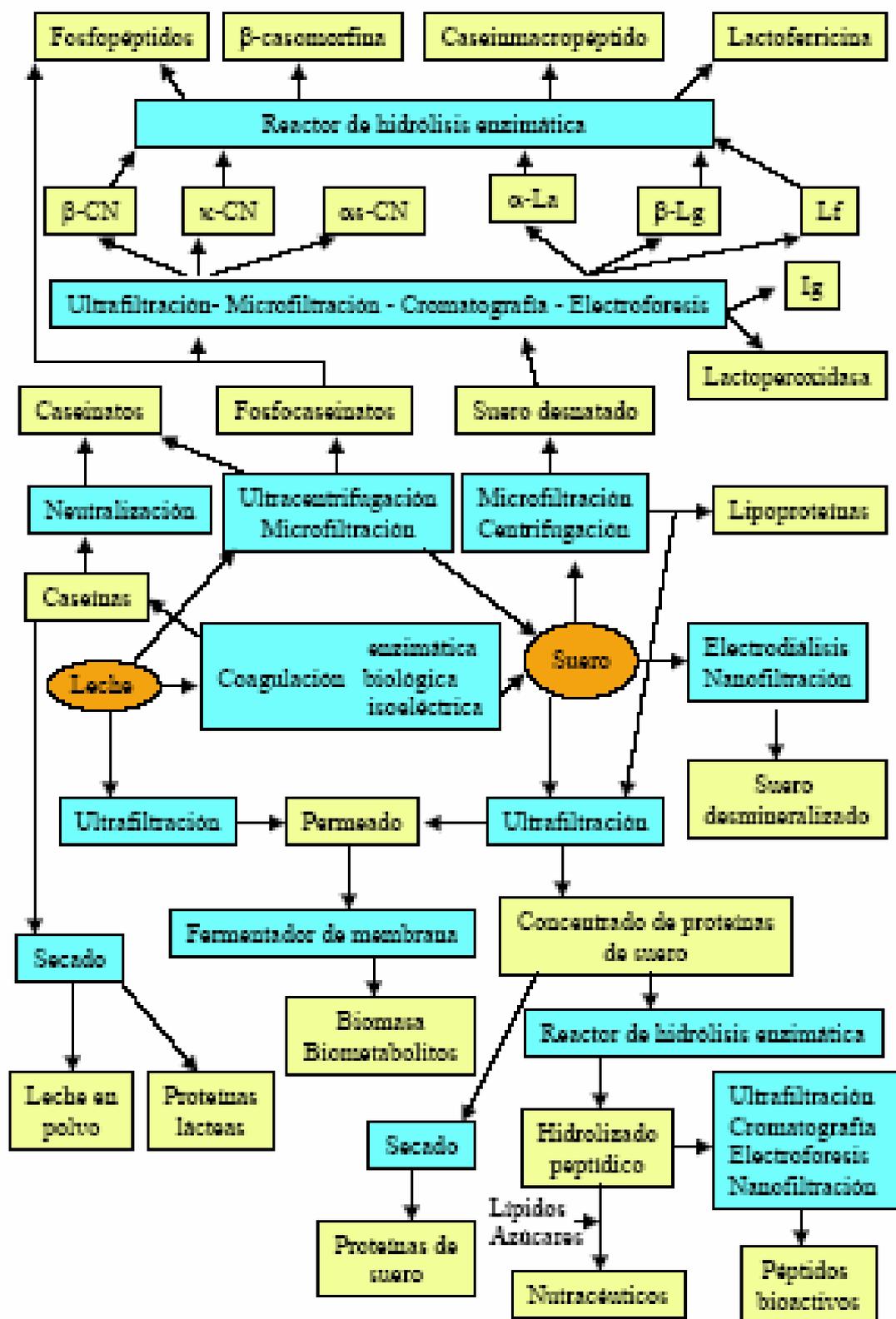


Figura 1.1 Separación de las proteínas lácteas (Maubois, 1998)

Se dispone de distintos procedimientos de membrana para estandarizar el contenido proteico de una leche:

Ultrafiltración (UF): Mediante la selección de membranas adecuadas, con diferente tamaño de poro (normalmente de 0.001 a 0.1 μm), es posible separar las proteínas de la leche de los constituyentes de bajo peso molecular como el agua, la lactosa, las sales y otros componentes menores. Con este proceso, se obtiene un retenido que puede ser utilizado para aumentar la concentración proteica de una leche pobre en proteínas y un permeado, que puede ser útil en el caso de un exceso de proteínas. Sin embargo, la fracción proteica de menor peso molecular podría pasar al permeado durante el proceso. Se ha calculado que este efecto podría cambiar la relación caseínas/proteínas de suero en un 7-8% (Burgess, 1994).

Ósmosis inversa (OI): Se trata de un proceso en el que las membranas utilizadas son permeables prácticamente sólo al agua, pues su tamaño de poro es de 0.0001 a 0.001 μm , por lo que, mediante la utilización de presiones relativamente altas (10-50 bar), se obtiene un producto con una concentración elevada en sólidos totales, aunque la relación proteínas/sólidos se mantiene como en el producto original. El líquido que se obtiene no contiene constituyentes de valor nutritivo importante pues incluso pequeñas moléculas disueltas como las sales son retenidas por la membrana (Amigo y Fernández -García, 1992).

Microfiltración (MF): Este proceso, dependiendo del tamaño de poro utilizado, que puede oscilar entre 0.1 y 10 μm , permite concentrar la fracción caseínica de las proteínas lácteas. Si se utiliza un tamaño de poro de 0.2 μm , se obtiene la denominada caseína micelar (Maubois, 1998). Así, la relación caseína/proteínas de suero se altera respecto a la leche de partida.

1.1.2.1.1 Adición de permeado

Para disminuir la concentración de proteínas en una leche, la única alternativa actualmente disponible es la adición de permeado. Puesto que el permeado es un subproducto de la UF de la leche pero también del suero de quesería, la cuestión que se plantea es qué permeado es más apropiado para su adición a la leche.

El permeado de la leche sólo contiene los constituyentes solubles en agua y, de los que contienen nitrógeno, sólo el nitrógeno no proteico (NPN), por lo que esta fracción no se vería alterada si se añadiera permeado a una leche muy rica en proteína. Sin embargo, si se añade permeado de suero de quesería, en el cual se encuentra el caseinmacropéptido (CMP), que se libera con la acción del cuajo sobre la κ -CN y permanece en la fracción soluble a pH 4.6, aumentaría la fracción no proteica del producto final (Puhan, 1996). Además, algunos productos de la hidrólisis u oxidación de las grasas responsables del sabor podrían afectar a las características sensoriales del producto final. Por todo ello, sólo el permeado de la leche podría ser adecuado para el ajuste del contenido proteico de la leche. Por otro lado, es necesario prestar atención a su calidad microbiológica, particularmente si se trata de un permeado que proviene de otra industria.

1.1.2.1.2 Adición de retenido

Cuando se aumenta el contenido proteico mediante la adición del retenido de UF o de OI hay que tener en cuenta, además de la relación proteína/sólidos totales, el contenido en otros componentes que también contribuyen al valor nutricional de la leche, pues el contenido Ca + P se ve aumentado y el de vitaminas hidrosolubles puede disminuir (Burgess, 1997).

1.1.2.2 Adición de proteínas a la leche

Para ajustar la concentración proteica de la leche otra posibilidad es la adición de proteínas lácteas, como caseína en forma de caseinatos, proteínas de suero o coprecipitados de proteínas lácteas totales. Esta es la forma de estandarización más sencilla tecnológicamente pues no es necesaria ninguna inversión. Sin embargo, puede dar lugar a problemas en el sabor, en el etiquetado o en la actitud del consumidor.

1.1.2.2.1 Adición de concentrados de proteínas de suero (WPC)

La adulteración de la leche y especialmente de la leche en polvo con concentrados de proteínas de suero (WPC) puede ser importante en Europa. Los WPC se producen en grandes cantidades en la industria y al no tener tantas aplicaciones como la leche en polvo en la elaboración de alimentos, tienen un precio menor.

1.1.2.2.2 Adición de suero de quesería

La adición de suero de quesería a la leche pasteurizada es un problema importante en algunos países de Latinoamérica (Wolfschoon-Pombo y Moreira, 1989). Para detectar adulteraciones con suero dulce se han propuesto métodos basados en la presencia del CMP. Se trata de un buen indicador por tratarse de un componente específico que debe estar ausente en la leche (López-Fandiño y Ramos, 1993).

Olieman y van den Bedem (1983) desarrollaron un método cromatográfico capaz de detectar la presencia del CMP, aunque tiene el inconveniente de dar falsos positivos en el caso de leches en las que se haya desarrollado una población relativamente alta de bacterias psicrotrofas durante el almacenamiento refrigerado antes de su procesado. Otros métodos de cromatografía líquida de alta eficacia

(HPLC) aplicados a la fracción soluble en ácido tricloroacético (TCA) al 8%, y el uso de un detector electroquímico con electrodo de Platino proporcionan resultados más selectivos (Olieman y van Riel, 1989; van Riel y Olieman, 1995a).

Por otro lado, se ha desarrollado un método de electroforesis capilar (CE) que permite una completa separación del CMP y pseudo-CMP (Van Riel y Olieman, 1995b), producto de degradación que procede de la degradación de la κ -CN por bacterias del género *Pseudomonas* y difiere en un aminoácido del CMP producido por la quimosina (Recio y col., 1996). Este método ha sido aplicado con éxito para detectar la adulteración de leche UHT con suero de quesería y se ha comprobado que la proteólisis de la leche no produce interferencia salvo en casos de proteólisis muy acentuada (Recio y col., 2000a).

Sin embargo, estos métodos no son útiles para la detección de suero ácido, en el que no hay ningún componente que no pueda encontrarse en la leche. La determinación de la relación proteínas de suero/caseínas en la leche podría resolver este problema.

1.1.3 Valor de la relación proteínas de suero/proteína total (PS/PT) en la leche

El Comité del Codex de leche y productos lácteos ha admitido la estandarización del contenido en proteína de la leche en polvo con las siguientes recomendaciones:

1. Para normalizar el contenido en proteína sólo pueden utilizarse lactosa y permeados o retenidos obtenidos mediante la ultrafiltración de la leche.
2. La cantidad de sólidos no grasos de la leche en polvo debe contener al menos un 34% de proteína.

La primera recomendación implica que la relación proteínas de suero/caseínas no debe ser afectada por el procedimiento de estandarización, al no contener ni la lactosa ni el permeado proteínas, mientras que el retenido de UF contiene caseínas y proteínas de suero en la misma relación que la leche genuina.

De hecho, este Comité ha propuesto límites para la relación proteínas de suero/caseínas en leches evaporadas, leches condensadas edulcoradas, queso, leche en polvo y nata en polvo (Codex Committee on milk and milk products, 1994).

Para evaluar si los ajustes en proteína de la leche mantienen la relación natural proteínas de suero/caseínas, habría que establecer un intervalo “normal” de esta relación que incluyera todos los intervalos que pudieran darse y desarrollar métodos que permitieran determinar la relación proteínas de suero/proteína total (PS/PT) en la leche. Debido a la importancia del tema, el Grupo de expertos en leche y productos lácteos de la Unión Europea está estudiando la introducción de un método con este propósito.

1.1.3.1 Variabilidad natural de la relación PS/PT en la leche

Hay numerosos trabajos sobre la variabilidad natural en la composición de la leche. Sin embargo, existen pocos datos sobre el valor de la relación proteínas de suero/proteína total. Un estudio de las fracciones proteicas en leches inglesas y galesas en el periodo 1947-1970 dio como resultado de la variabilidad regional y estacional un valor mínimo de relación PS/PT de 20.2% y un máximo de 21.6% (Harding y Royal, 1974). El largo periodo en el que se realizó este estudio permite afirmar que las variaciones irregulares debidas a factores distintos a los mencionados se compensaron al ser considerados todos los valores en la media, pues, si se consideraran leches individuales de distintos países, esta variación podría multiplicarse por cuatro (Higgins y col., 1995).

Otro estudio de las variaciones de caseína y proteínas de suero en la leche de vacas con diferentes fenotipos para la β -Lg dio como resultado un valor máximo para la relación (PS/PT) de 39.5% y como mínimo de 20.3% (Hill, 1993). El pronunciado efecto del polimorfismo de la β -Lg en la relación PS/PT está documentado, siendo el principal factor que afecta a la relación (Rahali y Menard, 1991; van den Berg y col., 1992; Lundén y col., 1997). La relación PS/PT se ve incrementada con la presencia de las variantes B de la β -Lg y de la κ -CN debido,

probablemente, al efecto supresor de estas variantes sobre otras proteínas lácteas. En el primer caso se incrementa la proporción de caseínas y disminuye la de proteínas de suero, mientras que en el caso de la presencia de κ -CN B aumenta la proporción de caseína de la leche (Ng-Kwai-Hang y col., 1987).

Además, existen otros factores que contribuyen a la variación natural de la relación PS/PT. Entre ellos destaca el estado de lactación del animal, pues la relación PS/PT disminuye inmediatamente después del parto, debido a la alta secreción de Ig en el calostro, recuperándose la proporción normal en la segunda semana de lactancia.

Otro factor es la cantidad de células somáticas, pues su incremento se ve acompañado de un aumento de la relación PS/PT. Este aumento es significativo por encima de 200000 células/l, aunque haya ausencia de mastitis clínica.

Se han realizado numerosos estudios relacionados con la alimentación pero no se ha encontrado influencia de factores dietéticos sobre la relación PS/PT, aunque estos factores sí afectan el contenido proteico total de la leche (van den Berg y van den Berg, 1996). Únicamente condiciones de alimentación extremas pueden dar lugar a modificaciones en la relación PS/PT (Coulon y col., 1998).

1.1.3.2 Efecto del procesado de la leche

La variabilidad de la relación PS/PT en las leches sometidas a tratamiento térmico, como la pasterización o la esterilización, o en la leche en polvo no ha sido estudiada, aunque es conocido que la temperatura es el factor externo más importante que influye sobre la estructura y comportamiento de las proteínas (Pearce, 1989).

1.1.3.2.1 Refrigeración de la leche

La leche recién ordeñada se suele mantener en refrigeración desde el momento del ordeño hasta su utilización en las industrias lácteas. Con temperaturas

próximas a los 4 °C se consigue que se reduzca el desarrollo de las bacterias lácticas, responsables de la acidificación de la leche, aunque no se impide el crecimiento de otros microorganismos como los psicrotrofos, capaces de producir enzimas proteolíticas y lipolíticas termorresistentes que pueden ocasionar alteraciones en la leche procesada durante su posterior vida útil, siendo especialmente importante la proteólisis (Celestino y col., 1997a).

1.1.3.2.2 Tratamiento térmico de la leche

El principal objetivo del tratamiento térmico de la leche es la mejora de la calidad microbiológica. El tratamiento térmico al que se somete la leche suele dividirse en tramos diferenciados de acuerdo con el intervalo de temperaturas empleadas (Tabla 1.2), aunque los tratamientos de las leches que se comercializan para el consumo son los de pasteurización y esterilización.

Tabla 1.2 Tratamientos térmicos a los que se somete la leche e intervalo de temperaturas (Pearce, 1989)

Tratamientos térmicos	Intervalo de temperaturas
Termización	50-65 °C
Pasteurización	65-75 °C
Funcionalización	75-90 °C
Esterilización	90-140 °C

Termización

El objetivo de la termización, que consiste en un calentamiento de la leche de 60 a 65 °C durante un tiempo que oscila entre 10 y 20 seg, es mejorar la conservación de la leche que va a mantenerse en refrigeración. La mayoría de las bacterias psicrotrofas son termosensibles de forma que un tratamiento a 62 °C

durante 15 seg es suficiente para mantener un recuento bajo durante el posterior almacenamiento a bajas temperaturas. Esto es debido probablemente a la desnaturalización/desactivación térmica de las enzimas que mantienen la viabilidad bacteriana (Griffiths, 1986).

Pasterización

La pasterización se aplica con el fin de destruir los microorganismos patógenos presentes en la leche y la mayoría de las formas vegetativas microbianas. Además, algunas enzimas se inactivan. En la denominada baja pasterización, se aplica una temperatura de 65 °C durante 30 min. Es más frecuente la pasterización mediante la utilización de intercambiadores de calor que funcionan en continuo. Si se aplican 71-75 °C durante 15-40 seg se trata de alta pasterización. Con una temperatura de 85-90 °C durante 2-10 seg se denomina pasterización ultra-alta. Con la pasterización se produce la desnaturalización de las proteínas más termosensibles, es decir las Ig, la BSA y una desnaturalización parcial de la β -Lg (Pearce, 1989).

Funcionalización

A temperaturas entre 75° y 90° C con tiempos que oscilan entre los 5 y los 30 min se llega a una desnaturalización de la mayoría de las proteínas de suero que es útil para conseguir algunas propiedades funcionales. Algunos ejemplos son la fabricación de leche en polvo de gran estabilidad térmica, para la elaboración de algunos quesos, o para conseguir la viscosidad deseada en productos tales como el yogur o la leche condensada edulcorada (Pearce, 1989). La total desnaturalización y unión de las proteínas de suero a las caseínas, previa a la evaporación y secado, evita interacciones indeseables durante la posterior elaboración de leche en polvo de alta temperatura. En el queso Ricotta se pretende una total insolubilización y coagulación de las proteínas de suero, y en los productos lácteos que requieren una viscosidad que se encuentre entre límites definidos, el desdoblamiento parcial de las proteínas de suero confiere una viscosidad mayor al producto. Aunque la

importancia relativa de las proteínas individuales no ha sido determinada se ha sugerido que este comportamiento es controlado por la fracción de β -Lg (Bernal y Jelen, 1985).

Esterilización: Tratamiento UHT

El tratamiento de la leche a temperaturas de esterilización se usa para destruir todos los microorganismos presentes en forma vegetativa y sus esporas, o al menos inhibirlas durante la vida comercial del producto. El objetivo es una larga conservación sin ayuda de refrigeración. Puede realizarse en recipientes herméticos que se somete a calentamientos de 110-120 °C durante 5-20 min, o en flujo continuo, tratamiento UHT, sometiendo la leche a temperaturas elevadas durante un periodo de tiempo corto (135-150 °C de 2 a 15 seg). Si se realiza por contacto directo de vapor de agua sobrecalentado se denomina UHT directo, mientras que con intercambiadores de calor tubulares o en placa se denomina UHT indirecto. En este proceso, al aumentar la temperatura hasta valores de 140-150 °C y disminuir el tiempo de tratamiento a unos pocos seg, se consigue aumentar la eficacia esporicida al tiempo que se minimizan los cambios químicos. Este tratamiento es el más frecuente en las leches comercializadas en España.

Las proteínas del suero se desnaturalizan durante el proceso UHT en una cuantía que depende de las condiciones tiempo/temperatura, pudiendo oscilar entre un 50 y un 90% (Burton, 1969). También tiene lugar una lactosilación de la β -Lg por condensación entre la lactosa y los grupos amino de esta proteína (Hambling y col., 1992). Los cambios que tienen lugar en las caseínas con el calentamiento son consecuencia de la interacción con las proteínas de suero, la lactosa, las sales y la grasa. Los complejos formados entre las proteínas de suero y las micelas de caseínas son los productos más importantes de las reacciones inducidas por el calor, jugando el grupo sulfhidrilo presente en la estructura nativa de la β -Lg un papel muy importante en la interacción (Corredig y Dalgleish, 1999). Otras reacciones que tienen lugar a partir de temperaturas de 90 °C son la desfosforilación, que

reduce las cargas de las caseínas, la liberación de nitrógeno no proteico (NPN) o la formación de enlaces covalentes como consecuencia de la combinación de las cadenas laterales de algunos aminoácidos, como la lisina, con otros residuos proteicos, formando enlaces intra e intermoleculares (Singh y Fox, 1989). También es conocida la relación entre el tratamiento UHT y la agregación de las micelas de caseínas. El incremento del tamaño de las micelas de caseína con el calentamiento es debido a los efectos combinados de la desnaturalización de las proteínas de suero y su deposición en la superficie micelar (Fairise y col., 1999). Todos estos cambios pueden tener influencia en la determinación de la relación proteína de suero/proteína total de la leche, si ésta se basa en métodos que separen las fracciones proteicas de la leche sin eliminar los complejos formados entre las proteínas de suero desnaturalizadas y las caseínas.

1.1.3.2.3 Enriquecimiento de la leche UHT con calcio

La importancia del calcio (Ca) en la dieta alimenticia se conoce desde hace muchos años, pero más recientemente se ha demostrado su utilidad en la prevención de diversos tipos de enfermedades que afectan especialmente a personas de edad media y avanzada. Aunque, tradicionalmente, se había dado importancia al Ca durante las fases de crecimiento de los niños, estudios recientes han demostrado también su relación con la prevención de osteoporosis e hipertensión (Miller, 1998). Como medida para asegurar una mayor ingesta y así paliar los efectos del menor índice de asimilación que presentan los adultos, en algunos países se han comercializado productos enriquecidos con Ca.

La leche proporciona una elevada biodisponibilidad para el Ca. Sin embargo, determinados procesos pueden mermar en parte esta biodisponibilidad, sobre todo las pérdidas ocasionadas por precipitación, inducidas por tratamientos térmicos inadecuados y la adición de fosfatos como aditivos estabilizantes, al modificar la relación Ca/P, de gran importancia en la asimilación. Esto justifica el desarrollo de

leches enriquecidas en calcio, que cada vez se comercializan más (Guamis López y Quevedo Terré, 1996).

Hay diversos métodos para añadir calcio a la leche de consumo. Los más habituales son la adición de lactato cálcico pentahidratado, de gluconato cálcico, carbonato cálcico y trifosfato cálcico. También se han descrito la adición de cloruro cálcico a la leche destinada a la fabricación de quesos, yogures o fórmulas infantiles (Omar y col., 1998). Existe un método patentado en el que se prepara un suero con calcio retirando la proteína y la lactosa del suero lácteo, concentrándolo posteriormente mediante UF y/o MF (Komatsu y col., 1999). Estos métodos son adecuados para conseguir la estabilidad térmica del producto final, pero se desconoce la posible influencia sobre la fracción proteica de la leche.

1.1.3.2.4 Leche en polvo

La leche en polvo se obtiene mediante la deshidratación de la leche natural entera, total o parcialmente desnatada, sometida a un tratamiento térmico equivalente a la pasterización. Este tratamiento no garantiza la esterilización del producto, pero la mínima cantidad de agua residual (menos de un 5% en peso) hace que la actividad de agua sea tan baja que hace imposible el desarrollo microbiano.

Las proteínas solubles se desnaturalizan en mayor o menor grado dependiendo de la intensidad del tratamiento térmico aplicado. La calidad de la leche en polvo depende, por una parte, del sistema de deshidratación de la leche, que es importante desde el punto de vista de su reconstitución, y del tratamiento térmico previo, que determina el grado de desnaturalización de las proteínas (Singh y Creamer, 1991). Es imposible impedir totalmente la desnaturalización durante la fabricación de la leche en polvo, pero, si el precalentamiento se limita a las condiciones de una pasterización a menos de 80° C, el producto resultante, que se denomina leche en polvo de bajo tratamiento térmico, tiene buenas características de reconstitución y es adecuado para leche de consumo. Si el tratamiento térmico ha sido más intenso, se obtienen leches en polvo de alto y medio tratamiento térmico.

Estas leches suelen emplearse en panadería u otras industrias alimentarias (Thomas y col., 1977). La diferencia de los tratamientos térmicos puede influir en la proporción final de proteínas desnaturalizadas y por lo tanto en la determinación de la relación PS/PT.

1.1.3.3 Efecto de la conservación de la leche

Una vez que la leche ha sido procesada puede sufrir un periodo de conservación variable en determinadas condiciones. En el caso de la leche pasterizada y productos de vida corta, el deterioro se debe principalmente al crecimiento de los microorganismos, mientras que las enzimas nativas de la leche juegan un papel secundario. En las leches sometidas a tratamiento UHT, los efectos se producen como consecuencia de los iniciados durante el tratamiento térmico que continúan a una velocidad menor, algunos acaecen debido a la no desactivación de ciertos agentes, como las enzimas termorresistentes producidas por las bacterias psicrotrofas y otros se deben a sustancias que llegan a la leche y no se han eliminado posteriormente, como el oxígeno.

Con la práctica del almacenamiento en la granja y el transporte de la leche refrigerados hasta su procesado, la flora dominante en las leches crudas son las bacterias psicrotrofas (Fairbain y Law, 1986) cuyas enzimas extracelulares con actividad proteolítica y lipolítica resisten los tratamientos de pasterización y UHT (Rowe y Gilmour, 1985). Las proteasas atacan preferentemente a ciertas fracciones caseínicas de la leche, degradándolas en el orden κ -CN > β -CN > α -CN (Law y col., 1977). Las modificaciones más importantes en las caseínas de la leche UHT son producidas por las proteasas termorresistentes de las bacterias psicrotrofas. La degradación de las proteínas de suero se ha observado menos frecuentemente y, normalmente, no se degradan por los microorganismos presentes en la leche.

Algunas proteasas de *Pseudomonas* degradan la κ -CN dando lugar a para- κ -CN y, por tanto, se pierde la capacidad de estabilizar las micelas de caseínas, pudiendo llegar a coagular la leche de forma similar a lo que ocurre por acción del

cuajo (Bengtsson y col., 1973). Se considera que la proteólisis en la que se observa un incremento del NNP y la formación de para- κ -CN, se debe a la acción de las proteasas bacterianas, mientras que la plasmina, enzima nativa de la leche, produce un aumento del nitrógeno no caseínico (NNC) y la formación de γ -CN (Renner, 1988).

Por una parte, la degradación de las caseínas anteriormente citada afectaría a la relación PS/PT. Por otra, los péptidos que aparecen por la acción de las enzimas dificultan su determinación mediante los métodos utilizados habitualmente.

El almacenamiento de la leche en polvo después de su procesado parece ser la causa de las modificaciones que se observan en la fracción proteica (Celestino y col., 1997b). El principal factor es la combinación de la temperatura de conservación y el contenido de humedad, por lo que es muy importante conservar el producto en recipientes herméticos. Una importante reacción, que tiene lugar durante el almacenamiento a temperatura ambiente de la leche en polvo si el contenido de humedad es mayor de un 5%, es la reacción de Maillard, en la que azúcares reductores, como la lactosa, reaccionan con proteínas y productos de su hidrólisis por medio de los grupos ϵ -amino de la lisina (Renner, 1988).

1.1.4 Métodos para la determinación de la relación PS/PT de la leche

Sería de gran utilidad disponer de una herramienta analítica para la determinación de la relación PS/PT de la leche, ya que permitiría establecer su intervalo natural y detectar las posibles adiciones fraudulentas.

1.1.4.1 Métodos basados en el contenido en nitrógeno. Método Kjeldahl.

El método Kjeldahl es uno de los procedimientos más utilizados para determinar el nitrógeno proteico en los alimentos y es utilizado como método de referencia en muchos métodos analíticos de medida de proteína, como el infrarrojo

(Manji y Kakuda, 1987). En la determinación de la PS/PT, al estar basado en la medida del nitrógeno en las diferentes fracciones de la leche (Rowland, 1938), tiene el inconveniente de que se ve afectado por la desnaturalización de las proteínas de suero, que quedan unidas a las caseínas (Elfagm y Wheelock, 1978). Así, para la determinación de la relación PS/PT en productos lácteos en cuyo procesado se haya producido una desnaturalización de las proteínas de suero (por ejemplo, por tratamiento térmico), debe romperse el complejo entre estas proteínas desnaturalizadas y las caseínas, o bien, debe utilizarse alguna propiedad característica de las diferentes fracciones proteicas.

1.1.4.2 Métodos basados en el contenido de aminoácidos

1.1.4.2.1 Métodos cromatográficos

Mediante el análisis de la composición de los aminoácidos de las proteínas de suero y las caseínas, se han encontrado diferencias constantes entre los dos tipos de proteínas, especialmente para los aminoácidos ácido aspártico (Asp), treonina (Thr), prolina (Pro), alanina (Ala), glicina (Gly) y leucina (Leu). Resmini y col., (1971) desarrollaron un método en el que mediante la hidrólisis de muestras de proteínas lácteas y la determinación de Asp, Ala y Pro como % del total de aminoácidos se determinaba el cociente $(\text{Asp} \times \text{Ala})/\text{Pro}$. Este cociente era muy distinto en las caseínas, caseinatos y en las proteínas de suero. La adición de hasta un 30% de proteínas de suero a los caseinatos hacía aumentar el cociente de forma lineal, lo que permitió aplicar este método a la determinación de las proteínas de suero en coprecipitados y leches en polvo.

Posteriormente, se ha descrito un método cromatográfico basado en estos mismos aminoácidos para la detección de WPC en leche en polvo basándose en que el contenido en aminoácidos de las fracciones sérica y caseínica permanece constante aún después del almacenamiento independientemente del calentamiento aplicado durante el procesado. En este caso se utilizaba un modelo estadístico con

los tres aminoácidos: Asp, Ala y Pro para estimar el grado de adulteración. Mediante este método, era posible la detección de un 10% de WPC a la leche en polvo (Greenberg y Dower, 1986).

1.1.4.2.2 Métodos colorimétricos

La determinación de la relación PS/PT puede basarse en el diferente contenido en aminoácidos azufrados cisteína (Cys) y cistina (Cis) que tienen las proteínas de suero y las caseínas, siendo mucho mayor en las proteínas de suero (aproximadamente 235 μg por mg de nitrógeno) que en las caseínas (aproximadamente 19 μg por mg de nitrógeno). La medida del contenido de estos aminoácidos es lo que se denomina valor de cistina (mg de Cis /mg de nitrógeno proteico). De Koning y van Rooijen (1971) propusieron un método en el que se hidrolizaba la muestra proteica y la Cis se reducía a Cys mediante ditioneitol (DTT). La Cis total se determinaba mediante colorimetría por reacción con ninhidrina. Este método, que es independiente del estado de agregación de la muestra proteica, fue utilizado para estimar el contenido en proteínas de suero de coprecipitados de caseína, en los que se observaba la correlación entre el calentamiento aplicado durante el procesado y el contenido en proteínas de suero, y en mezclas de leche en polvo y proteínas de suero, en las que el contenido estimado difería del teórico en una proporción entre el 3 y el 5%. En fórmulas infantiles y otros productos lácteos, la presencia de gran cantidad de lactosa, que puede causar pérdidas de Cys, se puede evitar con el tratamiento de la muestra con ácido tricloroacético (TCA) (de Koning y col., 1976).

1.1.4.2.3 Métodos polarográficos

Basándose también en el diferente contenido en Cis de las proteínas de suero y de las caseínas, se ha desarrollado un método polarográfico (Mrowetz y Klostermeyer, 1976). Para la determinación, la muestra se suspende en ácido

clorhídrico y se disuelve en un tampón que contiene urea y anhídrido sulfuroso que permite la reducción de todos los residuos de Cis a Cys, la cual se hace reaccionar posteriormente con el cloruro de metil mercurio. La polarografía se usa para determinar la cantidad residual de cloruro de metil mercurio no consumida por los grupos SH libres y los procedentes de la cistina después de la adición del sulfuroso. El método ha sido validado y es oficial en Alemania (DIN, 1994). Aunque es útil para una gran variedad de muestras, su principal inconveniente es la toxicidad del cloruro de metil mercurio. Lechner y Klostermeyer (1981) utilizaron este método para detectar la adulteración de leche desnatada en polvo con suero en polvo y estimaron que el contenido medio de proteínas de suero en la leche en polvo era del 16.5%.

1.1.4.3 Métodos basados en la determinación del fósforo unido a la caseína

En la estructura primaria de las caseínas bovinas los grupos fosfato están presentes como ésteres de la Ser y ocasionalmente de la Thr, mientras que no se encuentran en las proteínas de suero (West, 1986). Por ello la determinación del fósforo (P) unido a la caseína permite determinar la caseína presente en la leche, realizando previamente una precipitación con TCA para excluir el P no proteico.

1.1.4.3.1 Métodos colorimétricos

El P presente en las muestras de leche o productos lácteos puede determinarse colorimétricamente mediante una reacción con molibdato amónico. El valor medio del contenido en P de la caseína es de 0.85 mg por 100 g de caseína (Mariani, 1985), por lo que se toma este dato como factor para calcular el contenido en nitrógeno caseínico. Se toma 6.34 como factor de conversión de nitrógeno en proteína para calcular el contenido en caseína de la muestra (Karman y van Boekel, 1986) que, sustraída al valor de proteína total, proporciona el valor de proteína de

suero para establecer la relación PS/PT (Douglas y col., 1982). Este método, que ha sido validado en diversos ensayos colaborativos y es un método oficial para la determinación del contenido de proteína de suero en proteína total en leche y productos lácteos (DIN, 1992), ha sido aplicado a la detección de la adulteración de leche pasteurizada con suero, permitiendo la detección de un 15% de suero en leche (Wolfschoon-Pombo y Moreira, 1989). Sin embargo, es un método muy laborioso y no es aplicable a productos proteolizados, como el queso maduro.

1.1.4.3.2 Métodos de resonancia magnética nuclear (NMR)

En las muestras de leche es posible determinar por separado el P unido a las caseínas y el P soluble mediante NMR puesto que las resonancias de los dos tipos de P son diferentes (Belton y col., 1985). Recientemente, se ha puesto a punto un método de ^{31}P -NMR con el que es posible determinar cuantitativamente el P unido a la caseína, utilizando patrones externos, en un tiempo de 1.7 h aproximadamente (Belloque y col., 2000).

1.1.4.4 Métodos basados en la relación de los aminoácidos triptófano y tirosina

Como alternativa a los métodos anteriormente propuestos para la determinación de la relación PS/PT en productos lácteos, algunos de los cuales son muy laboriosos, se han propuesto métodos más rápidos y no invasivos, como son los métodos espectroscópicos (Dufour y Riaublanc, 1997). Estos métodos permiten una cuantificación directa de las fracciones de proteínas de suero y de caseínas y están basados en la diferente respuesta espectroscópica de los aminoácidos triptófano (Trp) y tirosina (Tyr), pues es conocido que la relación Trp/Tyr es de 0.59 para las proteínas de suero y de 0.19 para las caseínas.

1.1.4.4.1 Espectroscopía ultravioleta de orden cero y primer orden

El espectro de absorción de la Tyr y el Trp coinciden a pH neutro. Se ha descrito un método a pH alcalino basándose en que el espectro de la Tyr, que se ioniza a un pH mayor de 10, vira hacia una longitud de onda (λ) más alta y duplica su máximo de absorción. Debido a la mejor resolución entre los espectros de los dos aminoácidos, tanto los espectros de orden cero como los de primer orden pueden usarse para cuantificar la relación Tyr/Trp. La representación de los cocientes $(A_{280}-A_{276})/(A_{292}-A_{294})$ en el primer caso y $(\delta A_{278}/\delta\lambda - \delta A_{273}/\delta\lambda)/(\delta A_{288}/\delta\lambda - \delta A_{284,5}/\delta\lambda)$ en el segundo de unas mezclas de suero en polvo y leche en polvo frente a su relación PS/PT tiene un comportamiento lineal, por lo que el método es válido para la determinación de la relación PS/PT en muestras de leche (de Block y col., 1997).

El método ha sido simplificado por Cartuyvels y col., (1999) pues, con el fin de clarificar la muestra, se realiza una extracción de la grasa en lugar de una precipitación con TCA y una degradación proteolítica. Los mejores resultados se han obtenido mediante los espectros de orden cero, aunque después de la extracción de la grasa los tubos deben dejarse reposar al menos una hora antes de añadir el reactivo clarificante. Con este procedimiento se ha demostrado la posibilidad de detectar un 3% de suero en polvo (expresado en proteína) en muestras de leche en polvo a las que se habían añadido distintas cantidades de suero.

1.1.4.4.2 Espectroscopía ultravioleta de la 2ª derivada (UV 2nd DS)

Los espectros ultravioleta (UV) de la 2ª derivada del Trp y la Tyr permiten reducir la absorción de fondo y, sin embargo, presentan señales muy diferentes para los dos aminoácidos. Luf y Brandl (1987) han propuesto un método para la determinación de las proteínas de suero desnaturalizadas presentes en leche y leche en polvo basándose en estas diferencias. El método ha sido empleado también en muestras de queso fresco (Luf y Brandl, 1989) y en muestras de leche en polvo, caseínas y leche líquida (Luf, 1989). Aunque el objetivo del método era la

determinación del grado de desnaturalización, el contenido relativo de caseína puede determinarse mediante la relación entre las proteínas de suero desnaturalizadas dividido por la suma de todas las proteínas de suero y el nitrógeno caseínico, dividido por la suma del contenido en nitrógeno de las caseínas y las proteínas de suero desnaturalizadas. Por ello, el método podría utilizarse para la determinación de la relación PS/PT.

1.1.4.4.3 Espectroscopía ultravioleta de la 4ª derivada (UV 4th DS)

Se ha propuesto un método de determinación de la relación proteína de suero/proteína total que utiliza la espectroscopía ultravioleta de la 4ª derivada (Meisel, 1995). La cuantificación está basada en la absorción de los aminoácidos Trp y Tyr, que tienen unos máximos y unos mínimos característicos diferenciados. El cociente entre el mínimo del Trp a 296 nm ($\delta^4 A / \delta \lambda^4_{296 \text{ nm}}$) y el máximo correspondiente a Trp y Tyr ($\delta^4 A / \delta \lambda^4_{282 \text{ nm}}$) está relacionado linealmente con el contenido proteínas de suero y caseínas de unas mezclas que contienen diferente proporción de los dos tipos de proteína, obteniéndose coeficientes de variación entre estas muestras entre 0.8 y 3.5%. Lüthi-Peng y Puhan (1999) han empleado este método para determinar la relación PS/PT en muestras de leche cruda de vaca y búfala, habiendo realizado algunos experimentos de calentamiento, homogeneización, conservación a temperatura ambiente y proteólisis con tripsina o termolisina, en los que se indicaba la ausencia de influencia de estos procesos en los espectros de la 4ª derivada obtenidos para las muestras.

Sin embargo, no existen datos de la aplicación de estos métodos a la determinación de la relación PS/PT en leches procesadas comercialmente tanto líquidas como en polvo.

1.1.4.5 Métodos basados en la separación de las caseínas y las proteínas de suero

1.1.4.5.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Las fracciones de proteínas de suero y de caseínas se separan mediante SDS-PAGE. El tratamiento de la muestra de leche o producto lácteo con el detergente SDS y con el agente reductor ditioneitol (DTT) en un baño de agua a 100° C permite la formación de complejos SDS-proteína que se comportan como iones cuando se aplica un campo eléctrico. El gel de poliacrilamida de tamaño de poro reducido hace posible un efecto tamiz, con el cual las proteínas se separan en relación a su tamaño molecular (Basch y col., 1985), migrando las proteínas de suero a mayor velocidad que las caseínas por su menor tamaño molecular. El uso de geles que incorporan un gradiente de tamaño de poro (T = 4-23%; C = 3%) permiten una buena separación y cuantificación de las bandas correspondientes a cada proteína.

Este método, que ha sido validado oficialmente para la determinación de la relación PS/PT (DIN, 1996), tiene la ventaja frente a los anteriores de ser una medida directa de las fracciones y poder analizar simultáneamente muchas muestras, por lo que puede utilizarse fácilmente en los análisis de rutina. Sin embargo, son los métodos basados en el valor de Cis y en el P unido a la caseína los que se consideran hasta la fecha más adecuados para ser usados como referencia, debido a su mayor precisión (Meisel y Carstens, 1989).

1.1.4.5.2 Electroforesis capilar (CE)

La electroforesis capilar permite la separación de las moléculas en base a su relación carga/masa en el interior de capilares de sílice fundida rellenos de un tampón apropiado por efecto de un campo eléctrico. El uso de elevados campos

eléctricos permite efectuar los análisis rápidamente, y con gran eficiencia y resolución. La automatización y la mayor exactitud en la cuantificación que los métodos electroforéticos convencionales hace esta técnica muy interesante, por lo que está siendo usada cada vez con mayor frecuencia en el análisis y caracterización de los alimentos (Lindeberg, 1995; Recio y col., 2001), y en concreto en los productos lácteos (Kanning y col.; Recio y col., 1997a). En los últimos años la CE se ha diversificado, dando lugar a distintos modos de operación: electroforesis capilar en zona libre (CZE), cromatografía electrocinética micelar (MECC), electroforesis capilar en gel (CGE), isoelectroenfoque capilar (CIEF) e isotacoforesis capilar (CITP). La CZE, que es la técnica más universal debido a su versatilidad, se cita en esta memoria con el nombre de electroforesis capilar (CE).

Uno de los principales inconvenientes de la CE es la adsorción de las proteínas y péptidos a las paredes de los capilares de sílice. Para solventar este problema se han desarrollado métodos de CE a pH alcalino, mediante el cual se minimiza la adsorción a las paredes del capilar, lo que permite una cuantificación aceptable de las proteínas de suero (Cifuentes y col., 1993). Esta estrategia ha sido utilizada para evaluar el tratamiento térmico de la leche mediante la cuantificación de las proteínas de suero nativas (Recio y col., 1995) y para estudiar el polimorfismo de la β -Lg (Paterson y col., 1995; de Frutos y col., 1996).

De Jong y col. (1993) introdujeron el uso de capilares con un recubrimiento hidrofílico. Mediante un tampón de pH 3 y el uso de aditivos poliméricos, como es la metilhidroxietil celulosa (MHEC), fue posible la separación simultánea de las proteínas de suero y las caseínas, incluyendo algunas variantes genéticas, lo que ha sido el punto de partida numerosos métodos de separación desarrollados posteriormente.

Se han modificado estas condiciones para desarrollar un método directo de cuantificación de las proteínas de suero desnaturalizadas en la fracción caseínica que permite evaluar con mejores resultados que los métodos anteriores el tratamiento térmico de la leche (Recio y Olieman, 1996).

Mediante este método se ha estudiado también el polimorfismo de las proteínas lácteas con análisis más rápidos y mejores cuantificaciones que los métodos electroforéticos convencionales (Cattaneo y col., 1996; Recio y col., 1997*c*). También ha sido posible la determinación simultánea de las caseínas y sus productos de degradación, tanto en sistemas modelo con distintas enzimas (Kristiansen y col., 1994; Recio y col., 1997*b*), como en estudios de seguimiento de la proteólisis y maduración de los quesos (Benfeldt y col., 1997; Otte y col., 1999).

En el campo de las adulteraciones de la leche, se han utilizado métodos con tampones alcalinos para determinar las diferencias entre las proteínas de suero de la leche de vaca y oveja (Cartoni y col., 1998) y tampones ácidos en capilares recubiertos para caracterizar las leches de vaca, oveja y cabra utilizando la fracción caseínica (Molina y col., 2000). Como ya se ha comentado en el apartado 1.1.2.2.2., se ha desarrollado un método que permite la detección de la adulteración de la leche en polvo con suero de quesería mediante la determinación del CMP (van Riel y Olieman, 1995*a*).

De lo anteriormente expuesto se puede deducir que los métodos de CE que permitan la cuantificación simultánea de las proteínas de suero y las caseínas podrían ser empleados para detectar la adición de suero ácido a la leche por medio de la determinación de la relación PS/PT, aunque no hay referencias de su utilización con este propósito.

1.1.4.5.3 Electroforesis capilar con SDS (SDS-CE)

Aunque la CE con SDS es estrictamente una electroforesis capilar en gel (CGE), la mayoría de las aplicaciones en análisis de alimentos se realizan utilizando capilares recubiertos de poliacrilamida entrecruzada y tampones comerciales de polietilenglicol que constituyen el gel. Debido a la similitud de este procedimiento con el de CE, es frecuente utilizar esta última terminología.

Existen pocas referencias del uso de métodos de SDS-CE aplicados al análisis de proteínas, aunque es una técnica muy adecuada para proteínas con masas

moleculares mayores de 10000 Da, obteniéndose mejores resultados si no hay modificaciones postraduccionales como la glicosilación o la fosforilación, que contribuyen a la carga de la molécula (Guttman, 1996). Esta técnica ha sido empleada con el fin de separar las proteínas de suero, dando lugar a una buena separación entre la β -Lg y la α -La (Kinghorn y col., 1995). También se ha utilizado en la separación de proteínas de altramuz y de trigo (Pollard y col., 1996; Bean y Lookhart, 1999).

Recientemente, se ha desarrollado un método para la detección de proteína de soja en leche en polvo (López-Tapia y col., 1999) mediante el cual, además de poder caracterizar las subunidades correspondientes a la proteína de soja, se han separado las proteínas de la leche en polvo, obteniéndose en los electroforegramas tres picos correspondientes, en orden creciente de pesos moleculares, a la α -La, la β -Lg y las caseínas.

Este procedimiento de SDS-CE podría ser válido para la determinación de la relación PS/PT en la leche, teniendo en cuenta que podrían cuantificarse por separado las principales proteínas de suero y las caseínas, aunque la eficacia del método no sea suficiente para resolver bien estas últimas.

De los métodos citados para determinar el contenido en proteínas de suero en la proteína total de la leche y productos lácteos, sólo algunos han sido validados mediante análisis colaborativos, por lo que sería de gran utilidad una evaluación de aquellos con mejores posibilidades.

1.2 OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

Para llevar a cabo el objetivo parcial **“Optimización de distintos métodos espectroscópicos y electroforéticos para la determinación de la relación proteína de suero/proteína total en leche”** se ha seguido el siguiente plan de trabajo:

-Optimización de un método de espectroscopía ultravioleta de la 4ª derivada (UV 4th DS) para la determinación de la relación PS/PT en leche mediante el estudio de la interferencia de la grasa, del efecto de la conservación de la leche cruda, del tratamiento térmico y del almacenamiento de la leche UHT. Aplicación a la detección de adulteraciones con suero y caseinato.

-Evaluación de distintos métodos electroforéticos: PAGE-SDS, CE y SDS-CE para la determinación de la relación PS/PT en leche. Estudio del efecto del tratamiento térmico y de la proteólisis de la leche en su determinación, y de la posibilidad de detectar adiciones de suero a la leche.

-Comparación de la determinación de la relación PS/PT mediante diferentes métodos analíticos en muestras de leche sometidas a diferentes tratamientos térmicos, leches en polvo, caseínas y caseinatos con el fin de establecer el valor de la relación PS/PT en estos productos.

1.3 MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1 Muestras

1.3.1.1 Muestras de referencia

Para establecer la relación PS/PT se prepararon muestras de calibrado de proteína de suero en proteína total al 5, 10, 15, 20, 25 y 30% mezclando una disolución de caseína (Merck, Darmstadt, Alemania) en tampón fosfato 0.1M de pH 6.6 y una disolución de BSA, α -La y β -Lg comerciales (Sigma) en agua (β -Lg: α -La:BSA = 12:5:1). La concentración de las proteínas de suero en la disolución acuosa se estableció teniendo en cuenta la pureza de las proteínas determinada por el fabricante. Además, como muestras de referencia de la relación PS/PT se utilizaron las muestras NISECAS 0, 15, 20, 25 y 100 procedentes del NIZO Food Research (Ede, Holanda), que tienen una relación PS/PT de 0, 15, 20, 25 y 100%, respectivamente. Estas muestras se fabricaron a partir de leche desnatada mediante técnicas de filtración de membrana con las que se obtiene una solución concentrada de suero y una solución concentrada de caseína que se mezclan para obtener los porcentajes correspondientes, y posteriormente se someten a atomización.

Para la identificación de las proteínas lácteas mediante SDS-CE se utilizaron, además de las proteínas de suero citadas anteriormente, α -CN, β -CN y κ -CN comerciales (Sigma).

1.3.1.2 Muestras de leche y productos lácteos

1.3.1.2.1 Leches crudas

Se analizaron veinticuatro muestras de leche cruda procedente de diferentes zonas de España y Francia.

Se almacenaron cuatro muestras de leche cruda durante 4 días a 6° C en diferentes contenedores industriales refrigerados y se tomaron muestras a los 0, 2 y 4 días. En estas muestras se realizaron recuentos bacterianos de microorganismos mesófilos y psicrotrofos.

Se tomaron muestras de leche cruda de dos industrias lácteas, antes de ser sometidas al tratamiento térmico UHT y después del mismo.

1.3.1.2.2 Leches pasteurizadas

Se analizaron siete muestras de leche pasteurizada comerciales entera y desnatada procesadas en diferentes lugares de la Comunidad de Madrid y Castilla-León.

Para estudiar la interferencia de la grasa, se utilizaron una muestra de leche pasteurizada entera y una muestra desnatada de la misma marca comercial. Se desnató la leche entera y la grasa extraída a un cierto volumen de leche entera fue añadida y mezclada con el mismo volumen de leche desnatada. Esta leche enriquecida se desnató de nuevo.

1.3.1.2.3 Leches UHT

Para estudiar la interferencia de la grasa, se utilizaron una muestra de leche UHT entera y una muestra desnatada de la misma marca comercial. Se sometieron a los mismos procedimientos de desnatado y adición de grasa descritos en el apartado anterior.

Se analizaron cuarenta y cuatro muestras de leche UHT entera y desnatada de comercios locales procesadas en diferentes comunidades autónomas (Galicia, Asturias, Cantabria, Castilla-León, Cataluña, Andalucía y Madrid). Las muestras fueron tomadas en diferentes periodos del año, pero en una fecha próxima a la de su procesado, y se analizaron inmediatamente, salvo en los casos en los que se estudió su almacenamiento. En este caso, se almacenaron tres lotes de leche UHT desnatada

y dos de leche UHT entera a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ \text{C}$) durante 120 días. Se tomaron muestras cada 30 días. También se analizaron cuatro muestras de leche UHT comercial enriquecidas en Ca. Se añadió suero ácido o dulce a una muestra de leche UHT comercial en proporción de 2.5 a 15% de suero en leche expresado en proteína. Asimismo, se añadió caseinato sódico a una leche UHT comercial en proporciones entre 1 y 5% de caseinato en leche expresado en proteína.

1.3.1.2.4 Leches en polvo

Se emplearon tres leches en polvo proporcionadas a través del ensayo colaborativo “Determination of serum protein to casein ratio” organizado por el Grupo de expertos en leche y productos lácteos de la Unión Europea.

1.3.1.2.5 Obtención de suero ácido

Se preparó suero ácido a partir de leche cruda desnatada mediante acidificación a pH 4.6 con HCl 1M y centrifugación durante 15 min a 4500 g. El sobrenadante se filtró con papel Whatman nº 41.

1.3.1.2.6 Obtención de suero dulce

Se preparó suero dulce incubando 100 ml de leche cruda desnatada con 8 ml de una solución al 0.3% de cuajo comercial (Chr. Hansen’s Laboratorium A/S, Copenhagen, Dinamarca) que contenía 85% de quimosina y 15% de pepsina bovina durante 30 min a 37°C . Para inactivar la quimosina, se añadió NaOH 0.2M hasta alcanzar pH 9.0-9.5, seguido de calentamiento durante 15 min a 60°C (Léonil y Mollé, 1991). La mezcla se ajustó a pH 7.0 con HCl 1M y se centrifugó a 4500 g durante 15 min. El sobrenadante se filtró con papel Whatman nº 41.

1.3.1.2.7 Caseinatos y leches en polvo

Se emplearon cuatro muestras de caseinato sódico y siete muestras de leche en polvo comerciales.

1.3.2 Métodos de análisis

1.3.2.1 Determinación de proteína

El contenido en nitrógeno total (TN), en NCN correspondiente a la fracción soluble de la leche a pH 4.6 y en NPN correspondiente a la fracción no precipitada con TCA al 12% de la leche fueron determinados mediante el método de Kjeldahl según la norma IDF (1993). También se determinó el contenido en proteína del suero ácido, del suero dulce y de los caseinatos.

1.3.2.2 Recuentos bacterianos

El recuento de bacterias mesófilas viables de las muestras de leche cruda almacenada fue realizado en la industria láctea mediante siembra en espiral sobre agar leche (Difco, Detroit, MI, USA) que se incubó a 30 °C durante 24 horas. El recuento de psicrotrofos se llevó a cabo también mediante siembra en espiral sobre agar leche que se incubó a 6-8 °C durante 7 días. Los datos se expresaron como unidades formadoras de colonias (ufc) por ml de leche.

1.3.2.3 Espectroscopía ultravioleta de la 4^a derivada (UV-4th DS)

El método empleado fue el descrito por Meisel (1995) con algunas modificaciones. Este método se basa en la diferente respuesta del espectro de la 4^a derivada de los aminoácidos Trp y Tyr, siendo conocido que el cociente Trp/Tyr es de 0.59 para las proteínas de suero y de 0.19 para las caseínas.

1.3.2.3.1 Preparación de la muestra

Las muestras de leche se desnataron antes de su análisis por centrifugación a 3500 g durante 30 min, a temperatura ambiente, seguida de incubación en un baño de agua/ hielo durante 30 min y filtración por lana de vidrio. Algunas muestras de leche también se desnataron por el método de Röse Gottlieb (IDF, 1963). Se colocaron 170 μ l de leche, de las muestras de calibrado o de las muestras de referencia reconstituidas en un matraz aforado y se llevaron a 5 ml con tampón guanidina-HCl (6M) en tampón acetato sódico 0.1 M de pH 5. Los matraces se agitaron en un baño de ultrasonidos durante 20 min y su absorción UV fue medida inmediatamente. Todas las muestras fueron preparadas al menos por duplicado.

1.3.2.3.2 Instrumentación y método

Como compuestos modelo para estudiar el espectro de absorción UV de los aminoácidos aromáticos Trp y Tyr se utilizaron los tripéptidos Lys-Tyr-Lys y Lys-Trp-Lys y el dipéptido Lys-Lys (Sigma, St. Louis, MO, USA). El análisis se realizó en un espectrofotómetro Beckman DU[®]-70. Los espectros UV fueron tomados frente a tampón guanidina-HCl entre 250 y 310 nm con una velocidad de 600 nm/min y una resolución de 0.5 nm. Se calculó la 4^a derivada de los espectros de absorción mediante el equipo. Se registraron los valores absolutos de $\delta^4 A / \delta^4$ a las longitudes de onda (λ) correspondientes a los diferentes máximos y mínimos.

1.3.2.3.3 Cuantificación

El cociente $(\delta^4 A / \delta^4_{294.5}) / (\delta^4 A / \delta^4_{283}) \times 100$ fue correlacionado con la relación de PS/PT utilizando una recta de calibrado obtenida mediante las muestras de calibrado con porcentajes de PS/PT de 5, 10, 15, 20, 25 y 30% preparados en el laboratorio o mediante las muestras de referencia NISECAS.

La repetibilidad del método se estudió con el análisis de una muestra de leche 6 veces en diferentes días, calculándose el valor de desviación estándar relativa (RSD).

1.3.2.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Se empleó el método descrito por Basch y col. (1985)

1.3.2.4.1 Preparación de la muestra

Se mezclaron 100 μ l de leche o de las muestras de calibrado con 900 μ l de tampón de la muestra (10 mM de Tris/HCl (Sigma), 1mM de EDTA (Merck), 2.5% de SDS (Merck) y 5% de mercaptoetanol (Merck)) y se mantuvieron en agitación a 95° C durante 10 min.

1.3.2.4.2 Instrumentación y método

El análisis se realizó en un equipo de electroforesis PhastSystem (Pharmacia, Uppsala, Suecia) dotado de una unidad de separación y control, y una unidad de desarrollo (tinción). Se utilizaron geles comerciales (PhastGel Homogeneous 20) y tiras de tampón comerciales (SDS Buffer Strips) de Pharmacia. Se siguieron las condiciones electroforéticas del manual de instrucciones del equipo (Pharmacia, 1987). La tinción se realizó automáticamente con Coomassie R-350 (PhastGel Blue R) siguiendo las condiciones que se describen en el manual de instrucciones (Pharmacia, 1986). En los geles se incluyó una mezcla de proteínas estándar de masas relativas (M_r) compuesta por fosforilasa B (97 kDa), BSA (66 kDa), ovoalbúmina (kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20.1 kDa) y α -La (14.4 kDa).

Las lecturas densitométricas de los geles se obtuvieron con un analizador de imágenes conectado a un escáner (Bioimage and Visage, Millipore) siguiendo las

instrucciones del manual. Los datos se procesaron con el programa Whole Band Analyzer v. 3.2, que permite la estimación de la intensidad integrada de las bandas electroforéticas.

1.3.2.4.3 Cuantificación

En cada gel se analizaron las muestras de calibrado y las muestras de leche. En las muestras de calibrado se correlacionó la suma de los porcentajes de intensidad integrada de la α -La y la β -Lg con su relación de PS/PT, determinándose una curva de calibrado para cada gel. A la suma de porcentajes de intensidad integrada de α -La y β -Lg obtenidos en las muestras de leche se les aplicó la recta de calibrado del mismo gel, obteniéndose el valor de PS/PT.

1.3.2.5 Electroforesis capilar en dodecil sulfato sódico (SDS-CE)

Se empleó el método desarrollado por López-Tapia y col. (1999) para la detección de proteínas de soja en leche en polvo.

1.3.2.5.1 Preparación de la muestra

Se mezclaron 33 μ l de leche, de muestra de calibrado o de muestra de referencia reconstituida con 100 μ l de tampón de la muestra SDS, 61 μ l de agua y 5 μ l de mercaptoetanol (Merck) y se mantuvieron en agitación a 95 °C durante 10 min. El tampón de la muestra utilizado, SDS Sample Buffer (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) era una disolución 0.12 M Tris/HCl (Sigma), 1% SDS (Merck) de pH 6.6.

1.3.2.5.2 Instrumentación y método

El análisis se realizó en un equipo Beckman P/ACE System 2050 controlado por el software System Gold version 810 (Beckman). Se utilizó un capilar de sílice con un recubrimiento hidrofílico neutro (Beckman) de dimensiones 37 cm de longitud \times 100 μm de diámetro interno (di). La distancia entre la ventana de detección y la salida era de 7 cm, con lo que la longitud efectiva fue de 30 cm. Antes de cada separación, el capilar se lavó con tampón de separación SDS Gel Buffer (Beckman) durante 6 min a 0.14 mPa. Las inyecciones se realizaron en el extremo anódico por inyección hidrodinámica durante 30 seg a una presión de 0.14 mPa. El voltaje aplicado fue de 14.1 kV y la temperatura de 20 °C, siguiendo las condiciones sugeridas por el fabricante. Todas las muestras fueron analizadas, al menos, por duplicado.

Para la identificación de las proteínas lácteas por SDS-CE se utilizaron, las proteínas de suero comerciales α -La y β -Lg y las caseínas comerciales: α_s -CN, β -CN y κ -CN, todas ellas de Sigma. Para la estimación de las M_r se utilizó una mezcla de proteínas estándar (SDS 14-200 Test Mix) que contenía miosina (200 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa B (97 kDa), BSA (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica bovina (30 kDa) y α -La (14.2 kDa).

1.3.2.5.3 Cuantificación

Se trazó una línea base de los picos correspondientes a las proteínas de suero y otra para los picos de caseínas. La relación PS/PT se determinó como el cociente entre la suma de las A_r de la α -La y la β -Lg y la suma de las A_r de todos los picos electroforéticos, expresado en porcentaje (%). En el caso de utilizar la curva de calibrado, se determinó este % en las muestras de calibrado o en las muestras de referencia NISECAS y se realizó el análisis de regresión lineal. A los % obtenidos en las muestras de leche se les aplicaron las rectas de calibrado, obteniéndose el

valor de PS/PT. La repetibilidad se calculó como se describe en el apartado 1.3.2.3.3.

1.3.2.6 Electroforesis capilar (CE)

El procedimiento empleado está basado en el método descrito por de Jong y col. (1993) y optimizado por Recio y Olieman (1996) para la separación de las proteínas lácteas.

1.3.2.6.1 Preparación de la muestra

Las muestras de referencia NISECAS fueron reconstituidas al 10% en agua. 300 µl de leche, de la muestra de calibrado o de la muestra de referencia reconstituida se disolvieron en 700 µl de tampón de la muestra. El tampón de la muestra era una disolución 167 mM de Tris (hidroximetil) aminometano (Merck), 67 mM de etilendiaminotetraacetato disódico dihidratado (EDTA) (Merck), 42 mM de ácido 3-morfolinopropanosulfónico (MOPS) (Fluka, Buchs, Alemania) y 17 mM de DTT (Sigma) en urea 6 M, de pH 8.6. La disolución de urea se había preparado con 0.05 % (p/v) de MHEC (Serva, Heidelberg, Alemania) y 2.5 % (p/v) de resina desionizante (lecho de mezcla de intercambio catiónico e iónico) (Bio Rad, Hercules, USA) y agitado hasta alcanzar una conductividad menor de 2 µS.

1.3.2.6.2 Instrumentación y método

El análisis fue realizado en un equipo Beckman P/ACE MDQ controlado por un software propio (Beckman Instruments Inc., Fullerton, USA). Se utilizó un capilar de sílice con un recubrimiento hidrofílico neutro CElect P1 (Supelco, Bellefonte, USA) de dimensiones 60 cm × 50 µm de d.i. La distancia entre la ventana de detección y la salida era de 10 cm, con lo que la longitud efectiva fue de

50 cm. Las inyecciones se realizaron en el extremo anódico por inyección hidrodinámica durante 18 seg a una presión de 3.4 kPa.

Las separaciones se llevaron a cabo a 45 °C con un gradiente lineal de voltaje de 0 a 25 kV en 3 min, seguido de voltaje constante a 25 kV. El tampón de separación, pH 3, estaba formado por citrato trisódico dihidratado (Sigma) 20 mM y ácido cítrico (Sigma) 0.32 M disueltos en urea 6 M como se ha descrito en el tampón de la muestra. La detección se realizó en el extremo catódico a 214 nm. Antes de cada separación, el capilar se lavó con tampón de separación en sentido inverso (del cátodo al ánodo) durante 6 min.

1.3.2.6.3 Cuantificación

La relación PS/PT se determinó como se describe en el apartado 1.3.2.5.3 para SDS-CE. El trazado de la línea base fue similar al descrito en ese apartado. Sin embargo, en la muestras de leche sometidas a un tratamiento térmico UHT o en las leche en polvo, se trazó una línea base parcial para cada pico o grupo de picos, debido a la falta de horizontalidad de la línea base (integración en modo “valle a valle”). La repetibilidad se calculó como se describe en el apartado 1.3.2.3.3.

1.3.2.7 Análisis estadístico

Los análisis de correlación y regresión para la selección de las variables fueron establecidos mediante el programa BMDP1R (Dixon, 1983) del paquete estadístico BMDP (BMDP Statistical Software, Los Angeles, CA, USA).

El análisis de regresión lineal de las muestras de calibración y de las muestras de referencia NISECAS se realizó mediante el programa Microsoft Excel 7.0 (Statistica for Windows, Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA). La exactitud de los métodos se calculó aplicando la recta de regresión a los valores obtenidos para cada punto del calibrado, analizados por duplicado y dividiendo el resultado entre el valor teórico. El promedio de estos valores se expresó en %.

Los análisis de varianza y varianza bidimensional fueron realizados usando un test de intervalos de confianza al 95% mediante el programa Statgraphics 5.0 (Graphic Software Systems, Rockville, MD, USA).

La comparación de los métodos analíticos fue realizada mediante un test de comparación de medias para muestras relacionadas utilizando el software SPSS para Windows 9.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se exponen los resultados obtenidos sobre la optimización y aplicación de varios métodos espectroscópicos y electroforéticos con el fin de determinar la relación PS/PT en leches sometidas a diferentes tratamientos térmicos y detectar posibles adulteraciones con suero.

1.4.1 Evaluación de la UV 4th DS para la determinación de la relación PS/PT en leche

Previamente a la aplicación de la UV-4th DS para la determinación de la relación PS/PT en las muestras de leche, se llevó a cabo un estudio y optimización del método propuesto por Meisel (1995).

1.4.1.1 Compuestos modelo y selección de variables

Los estudios publicados sobre los espectros de absorción UV de los aminoácidos aromáticos Trp y Tyr han sido realizados mediante sus N-acetil ésteres (Meisel, 1995; de Block y col., 1997; Lüthi-Peng y Puhan, 1999). Sin embargo con el fin de obtener una mejor aproximación al entorno químico de estos residuos aminoacídicos en las proteínas lácteas, se utilizaron como compuestos modelo los tripéptidos Lys-Tyr-Lys y Lys-Trp-Lys y el dipéptido Lys-Lys. Sus concentraciones se eligieron teniendo en cuenta la relación de Trp/Tyr que existe en la leche.

Puesto que el coeficiente de extinción molar del Trp es cinco veces mayor que el de la Tyr, y el de la Lys es muy pequeño comparado con ellos, la concentración del dipéptido Lys-Lys empleada fue 10 veces superior (1.08 mM) que la del tripéptido Lys-Trp-Lys (0.108 mM) y ésta a su vez 5 veces inferior que la del tripéptido Lys-Tyr-Lys (0.54 mM). La Figura 1.2 muestra los espectros de absorción UV de orden 0, 2 y 4 de los tripéptidos empleados como compuestos modelo.

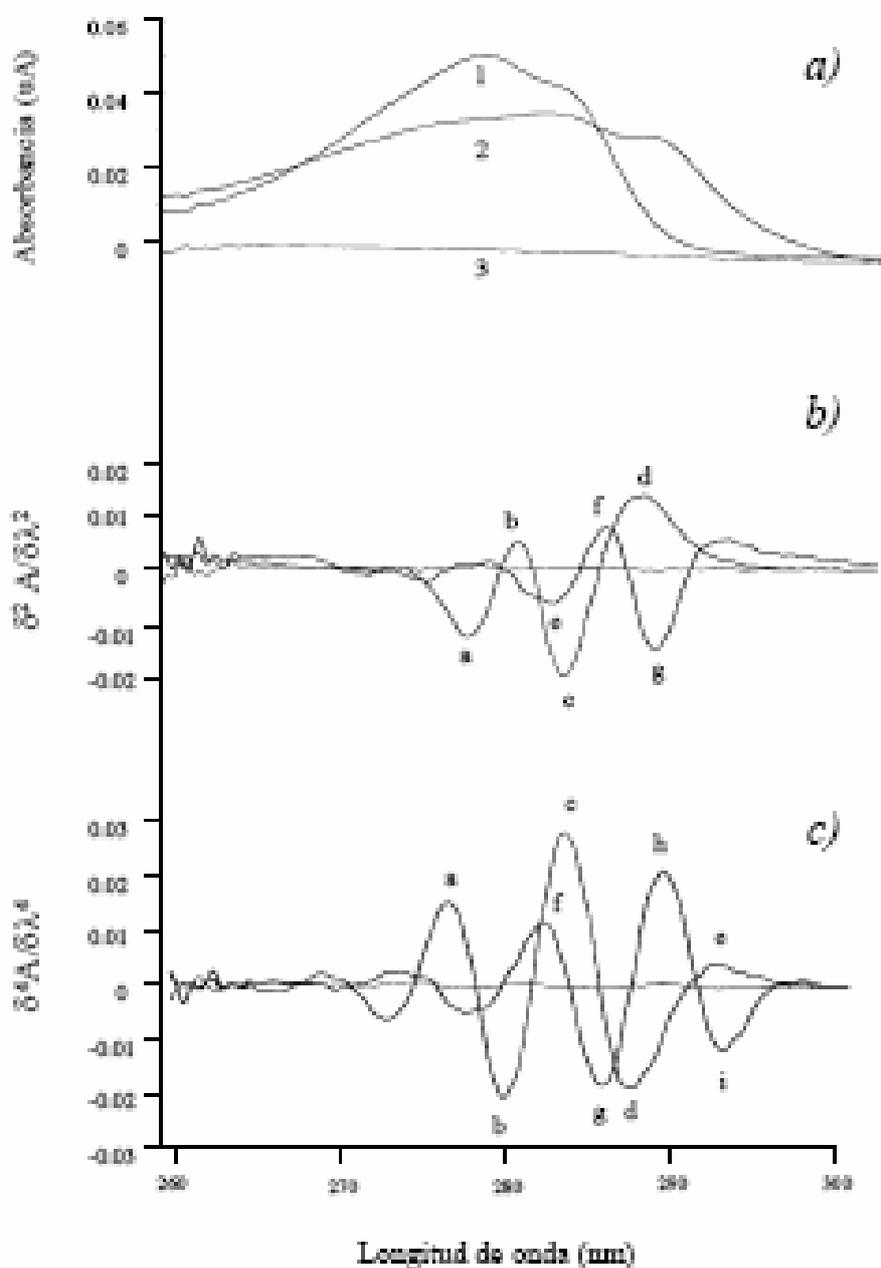


Figura 1.2 Espectro UV de los tripéptidos Lys-Tyr-Lys (0.54 mM), Lys-Trp-Lys (0.108 mM) y Lys-Lys (1.08 mM). *a)* Orden 0. 1: Lys-Tyr-Lys; 2: Lys-Trp-Lys; 3: Lys-Lys; *b)* Orden 2. Mínimos del Lys-Tyr-Lys a: 276.5 nm, c: 283 nm; Máximos del Lys-Tyr-Lys b: 279 nm, d: 290 nm; Mínimos del Lys-Trp-Lys e: 282.5 nm, g: 290 nm; Máximo del Lys-Trp-Lys f: 286 nm; *c)* Orden 4. Máximos del Lys-Tyr-Lys a: 275 nm, c: 283 nm, e: 293 nm; Mínimos del Lys-Tyr-Lys b: 279 nm, d: 287 nm; Máximos del Lys-Trp-Lys f: 283 nm h: 290.5 nm; Mínimos del Lys-Trp-Lys g: 286 nm, i: 294.5 nm.

Mientras que los espectros de orden cero presentaban un solapamiento para los máximos de los tripéptidos modelo Lys-Trp-Lys y Lys-Tyr-Lys (Fig 1.2a), los espectros de la 2ª y 4ª derivadas (Fig 1.2b y 1.2c) presentaban señales separadas para los dos tripéptidos con aminoácidos aromáticos. En el espectro de absorción de la 2ª derivada se observaron para la Tyr dos mínimos a 276.5 nm (a) y 283 nm (c) y dos máximos a 279 nm (b) y 290 nm (d) mientras que para el Trp se encontraron dos mínimos a 282.5 nm (e) y 290 nm (g) y un máximo a 286 (f) nm. En el espectro de la 4ª derivada se pudo observar cómo la Tyr presentaba máximos de absorción a 275 nm (a), 283 nm (c) y 293 nm (e) y mínimos a 279 nm (b) y 287 nm (d). El Trp presentaba máximos de absorción a 283 nm (f) y 290.5 nm (h) y mínimos de absorción a 286 nm (g) y 294.5 nm (i).

La Figura 1.3 muestra la superposición del espectro de la 4ª derivada de una muestra de leche y de los compuestos modelo. Los tres máximos 275 nm (a), 283 nm (b) y 290.5 nm (c) y los tres mínimos a 279 nm (d), 287 nm (e) y 294.5 (f) que aparecen en el espectro de la leche corresponden a la contribución de la Tyr (a, d), del Trp (c, f) o de ambos (b, e).

Con el objeto de elegir el mejor procedimiento para la determinación cuantitativa de la relación PS/PT se establecieron 9 variables definidas por las relaciones de los máximos y mínimos de los aminoácidos aromáticos Tyr y Trp en las muestras de calibrado que tenían una relación de PS/PT de 5, 10, 15, 20, 25 y 30%. Los resultados del análisis de regresión y correlación de cada una de las variables estudiadas respecto a la relación PS/PT en las muestras de calibrado se recogen en la Tabla 1.3.

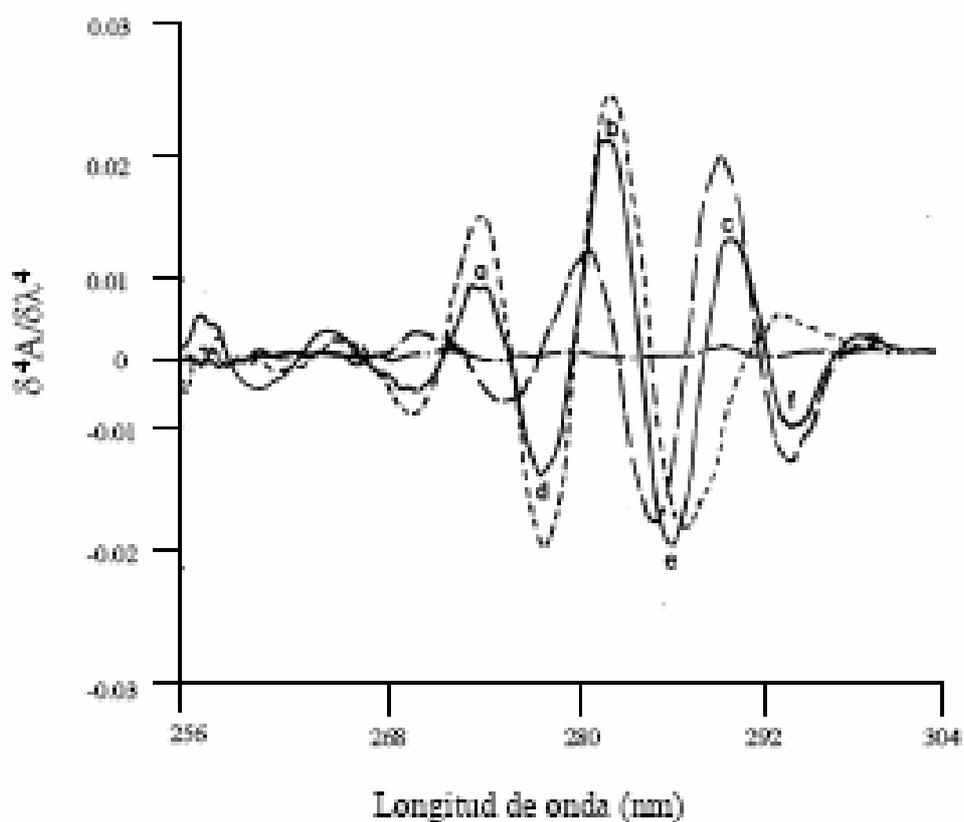


Figura 1.3. Espectros UV de la 4ª derivada de una muestra de leche UHT desnatada (—), de los tripéptidos Lys-Tyr-Lys (0.54 mM) (· · · ·) y Lys-Trp-Lys (0.108 mM) (— · —), y del dipéptido Lys-Lys (3.26 mM) (— · · ·) que se usaron como compuestos modelo. Máximos a 275 nm (a), 283 nm (b), y 290.5 nm (c) y mínimos a 279 nm (d), 287 nm (e) y 294.5 nm (f).

Tabla 1.3 Resultados de regresión lineal y correlación para cada una de las nueve variables $(\delta^4 A / \delta^4) / (\delta^4 A / \delta^4)$ respecto a la relación PS/PT presente en las muestras de calibrado, modelo $Y_n = a + b (\% \text{ PS/PT})$.

Variable	a	b	R ²	s
$Y_1 (\delta^{4a} / \delta^4_{287}) / (\delta^4 A / \delta^4_{275})$	210.64	4.37	0.963	8.36
$Y_2 (\delta^{4a} / \delta^4_{287}) / (\delta^4 A / \delta^4_{279})$	130.27	1.93	0.979	2.75
$Y_3 (\delta^{4a} / \delta^4_{287}) / (\delta^4 A / \delta^4_{283})$	81.78	0.64	0.954	1.38
$Y_4 (\delta^{4a} / \delta^4_{290.5}) / (\delta^4 A / \delta^4_{275})$	89.75	5.00	0.974	8.0
$Y_5 (\delta^{4a} / \delta^4_{290.5}) / (\delta^4 A / \delta^4_{279})$	56.96	2.51	0.975	3.93
$Y_6 (\delta^{4a} / \delta^4_{290.5}) / (\delta^4 A / \delta^4_{283})$	39.70	1.16	0.958	2.39
$Y_7 (\delta^{4a} / \delta^4_{294.5}) / (\delta^4 A / \delta^4_{275})$	53.86	3.20	0.976	4.94
$Y_8 (\delta^{4a} / \delta^4_{294.5}) / (\delta^4 A / \delta^4_{279})$	34.30	1.61	0.983	2.10
$Y_9 (\delta^{4a} / \delta^4_{294.5}) / (\delta^4 A / \delta^4_{283})$	22.21	0.75	0.981	1.02

Todas las variables podrían ser utilizadas para la determinación de la PS/PT puesto que todas presentaron correlaciones significativas ($p < 0.05$) y todos los coeficientes de determinación (R^2) fueron superiores a 0.95. Sin embargo, la variable $Y_9 (\delta^4 A / \delta^4_{294.5}) / (\delta^4 A / \delta^4_{283})$, era la que presentaba menor desviación estándar residual (s) (1.02) y un alto R^2 (0.981). Aunque también la variable $Y_6 (\delta^4 A / \delta^4_{290.5}) / (\delta^4 A / \delta^4_{283})$ daba lugar a buenos valores para la s (2.39) y el R^2 (0.958), para determinar la relación PS/PT se eligió la expresión $(\delta^4 A / \delta^4_{294.5}) / (\delta^4 A / \delta^4_{283}) \times 100$. Meisel (1995) y Lüthi-Peng y Puhan (1999) también han usado esta relación, aunque las longitudes de onda correspondientes a sus máximos y mínimos difieren ligeramente, siendo 296 y 282 nm, y 294.5 y 283.5 nm, respectivamente.

1.4.1.2 Características analíticas del método de UV-4th DS

Puesto que las distintas leches a analizar podrían presentar diferentes contenidos en proteína se hizo un estudio de la linealidad de la absorbancia frente a

distintos volúmenes de leche. Se tomaron volúmenes entre 80 y 200 μl y se completó el volumen hasta 5 ml con tampón guanidina-HCl 6M, determinándose la absorbancia del espectro de la 4ª derivada a 283 y 294.5 nm. La relación $(\delta^4 A / \delta^4_{294.5}) / (\delta^4 A / \delta^4_{283})$ se mantuvo constante a partir de volúmenes de leche de 160 μl . Así, para los análisis posteriores, se disolvieron 170 μl de leche en 5 ml de tampón guanidina-HCl. Esta preparación permite utilizar menor cantidad de reactivos que en el método de Meisel (1995).

La exactitud de la UV-4th DS en la determinación de la relación PS/PT depende en gran medida de la disponibilidad de al menos dos muestras de referencia que tengan diferente relación (Meisel, 1995). Con el objeto de establecer una recta de calibrado, se determinó la relación PS/PT en las muestras preparadas en el laboratorio con caseína y proteínas de suero con una relación de PS/PT de 5, 10, 15, 20, 25 y 30% respectivamente. La Figura 1.4 muestra los espectros de la 4ª derivada obtenidos. Puede observarse la coincidencia de los máximos a 283 nm, y la diferente respuesta de los mínimos a 294.5 nm.

El resultado del análisis de regresión de la determinación PS/PT en estas muestras y en las muestras NISECAS se recoge en la Tabla 1.4. La exactitud media del método calculada como el cociente entre el valor encontrado para las muestras de calibrado y su valor teórico fue de 104.8%. La repetibilidad del método expresada en RSD fue de 2.49%.

Tabla 1.4. Resultados del análisis de regresión lineal para la variable Y_9 respecto a la relación PS/PT presente en las muestras de calibrado y en las muestras NISECAS, modelo $Y_n = a + b (\% \text{ PS/PT})$.

Muestras	a	b	R^2
Muestras de calibrado (n = 10)	24.54 ± 0.69	0.705 ± 0.025	0.982
Muestras NISECAS (n = 10)	25.85 ± 0.51	0.658 ± 0.025	0.986

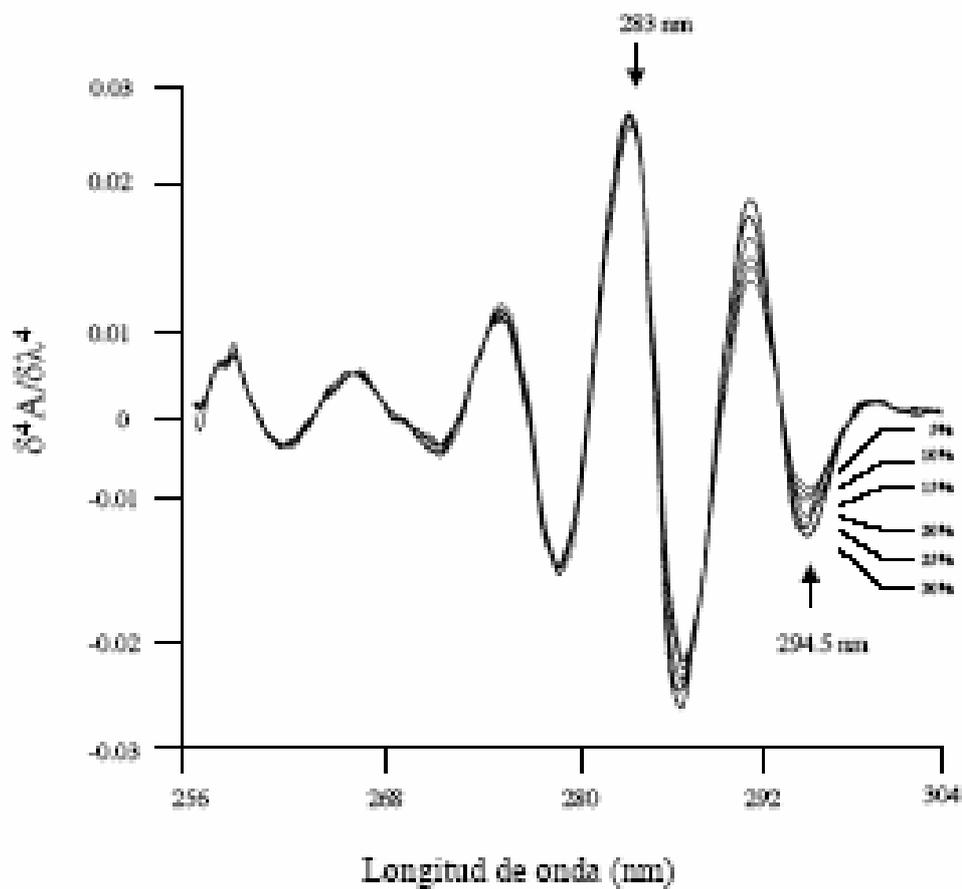


Figura 1.4 Espectros de la 4ª derivada de mezclas de caseínas y proteínas de suero con una relación PS/PT de 5, 10, 15, 20, 25 y 30%.

1.4.1.3 Interferencia de la grasa

La presencia de los glóbulos de grasa y de agregados insolubles puede causar dispersión de la luz, disminuyendo la exactitud de las determinaciones espectroscópicas (Kuaye, 1994). Con el fin de determinar la influencia de la grasa de la leche en el método, algunas muestras comerciales de leche pasteurizada y de leche UHT entera fueron desnatadas y a las muestras desnatadas de la misma marca comercial les fue añadida en la misma proporción la grasa de las leches enteras. La Tabla 1.5 recoge los datos obtenidos.

Tanto para la leche pasteurizada como para la leche UHT la relación PS/PT fue significativamente inferior para las muestras de leche enteras y de aquéllas a las que se había añadido grasa que para las muestras de leche desnatadas en el laboratorio o desnatadas comerciales. Además, los valores de RSD fueron más altos para las muestras de leche entera y con grasa añadida que para cualquier muestra de leche desnatada. No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras de leche antes o después de aplicar la adición de grasa y el desnatado. Estos resultados demostraron la interferencia de la grasa en la medida de la relación PS/PT por UV-4th DS e indican la necesidad de desnatar las muestras de leche antes del análisis.

La interferencia de la grasa en la determinación de la relación PS/PT es un tema controvertido. De Block y col. (1997) y Cartuyvels y col. (1999) han indicado que las muestras que contengan gran cantidad de grasa deberían ser desnatadas mediante disolventes orgánicos (Método de Röse-Gottlieb, IDF, 1963) antes de la determinación de la relación PS/PT por espectroscopía de orden cero y primer orden, aunque la interferencia de la grasa podría ser incluso más importante en la UV-4th DS, ya que una derivada de orden mayor disminuye la relación señal/ruido. Pero la 4^a derivada está considerada como el máximo compromiso entre la relación señal/ruido y el poder de resolución (Bray y col., 1994). Sin embargo, Meisel (1995) considera que la espectroscopía derivada no está afectada por el material no

proteico de la disolución de la muestra puesto que una absorción de fondo no afecta a la señal (ya que la función toma valor cero).

Tabla 1.5 Determinación de la relación PS/PT (%) en leches sometidas a desnatado o adición de grasa por espectroscopía UV de la 4ª derivada.

Muestra de leche	Proceso	Determinación de la relación PS/PT (%) ¹	
		Antes del proceso	Después del proceso
Pasterizada entera	Desnatado	14.3 ^a ± 3.0	17.2 ^b ± 1.0
Pasterizada desnatada	Adición de grasa	17.8 ^a ± 0.5	16.1 ^b ± 1.2
Pasterizada desnatada	Adición de grasa + desnatado	17.8 ^a ± 0.5	18.0 ^a ± 0.8
UHT entera	Desnatado	13.9 ^a ± 0.4	18.4 ^b ± 0.2
UHT desnatada	Adición de grasa	16.6 ^a ± 0.4	15.0 ^b ± 0.4
UHT desnatada	Adición de grasa + desnatado	16.6 ^a ± 0.4	16.5 ^a ± 0.5

n = 6

¹ La misma letra (a, b) en la misma fila indica ausencia de diferencia significativa (p<0.05)

La centrifugación de la muestra demostró ser un método adecuado para el desnatado. Es un método simple que permite manejar un gran número de muestras y es ecológico. Sin embargo, hay que considerar que las muestras de leche UHT que han sido almacenadas en congelación durante un largo período de tiempo son más difíciles de desnatar que las almacenadas en refrigeración o a temperatura ambiente. Probablemente se debe a la desestabilización que sufren, por lo que en el caso de tener que analizar un gran número de muestras habría que desnatarlas antes de su almacenamiento en congelación.

1.4.1.4 Efecto de la conservación de la leche cruda

Antes del procesado, la leche cruda se transporta y almacena a temperatura de refrigeración para evitar el crecimiento microbiano. Durante ese tiempo las

proteínas pueden ser degradadas por los microorganismos presentes en la leche cruda, que las usan como nutriente (Fairbain y Law, 1986). Esta degradación es importante porque la aparición de algunos productos de proteólisis en la leche UHT se atribuye a la mala calidad de la leche cruda de partida (López-Fandiño, 1993c). Para evaluar el efecto del almacenamiento de la leche cruda en la determinación de la relación PS/PT, se analizaron cuatro muestras de leche cruda conservadas en tanques industriales refrigerados durante 4 días. La Figura 1.5 muestra que aunque el recuento bacteriano de microorganismos mesófilos y psicrotrofos aumentaba considerablemente durante el tiempo de almacenamiento, no existía influencia en la determinación de la relación PS/PT. Por lo tanto, el crecimiento bacteriano no parece tener influencia en la determinación de la relación PS/PT en leche cruda mediante UV-4th DS en las condiciones estudiadas.

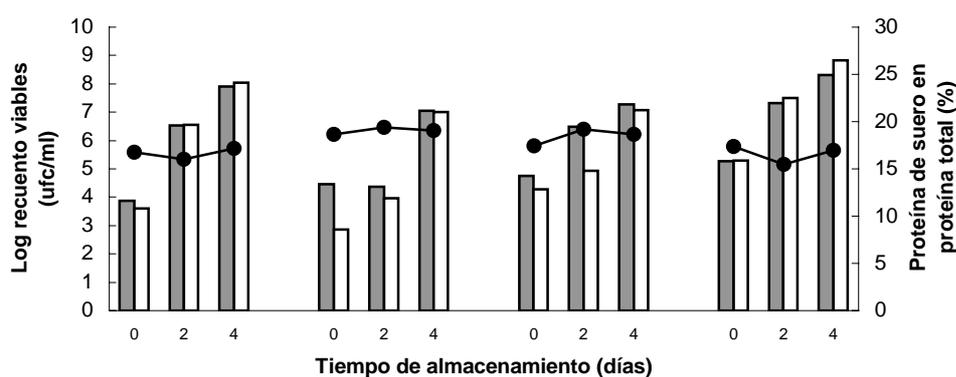


Figura 1.5. Número de microorganismos mesófilos (gris) y psicrotrofos (blanco) expresado como logaritmo del recuento de viables (ufc/ml) y relación PS/PT (%) (●-●) determinada por espectroscopía UV de la 4^a derivada en cuatro muestras de leche cruda conservadas a 6° C durante 0, 2 y 4 días.

1.4.1.5 Efecto del tratamiento térmico de la leche: pasterización y UHT

La Figura 1.6 muestra los espectros de la 4^a derivada de una leche cruda, una leche pasterizada y una leche UHT. Como puede observarse, se trata de espectros de

absorción en los que los máximos y mínimos coinciden, independientemente del tratamiento térmico al que haya sido sometida la leche.

Para evaluar cuantitativamente la influencia del tratamiento UHT, que es el más severo, en la determinación de la relación PS/PT por UV-4th DS, se realizó un experimento con dos muestras de leche suministradas por diferentes industrias lácteas que fueron analizadas antes y después del tratamiento UHT. Los resultados se recogen en la Tabla 1.6.

Tabla 1.6 Determinación de la relación PS/PT en muestras de leche antes y después del tratamiento UHT (%) mediante UV-4th DS.

Muestras de leche	Determinación de la relación PS/PT (%) ¹	
	Antes del tratamiento UHT	Después del tratamiento UHT
1	18.3 ^a ± 0.4	19.2 ^a ± 0.4
2	19.2 ^a ± 0.5	18.7 ^a ± 0.8

n = 6

¹ La misma letra (a, b) en la misma fila indica ausencia de diferencia significativa (p<0.05)

Como se puede observar, no hay diferencias significativas (p<0.05) entre las muestras de leche antes y después del tratamiento UHT. El efecto de desdoblamiento producido por la guanidina en las proteínas da lugar a una absorción uniforme en el UV para los cromóforos Tyr y Trp independientemente del estado de desnaturalización de las proteínas (Wilson y col., 1989, Bray y col., 1994). Así, el efecto de desnaturalización producido por el procesado de la leche no tiene influencia en el espectro obtenido. Lüthi-Peng y Puhan (1999) tampoco han encontrado diferencias significativas en la relación PS/PT determinada por UV-4th DS tras someter la leche a un calentamiento a 95° C durante 10 min.

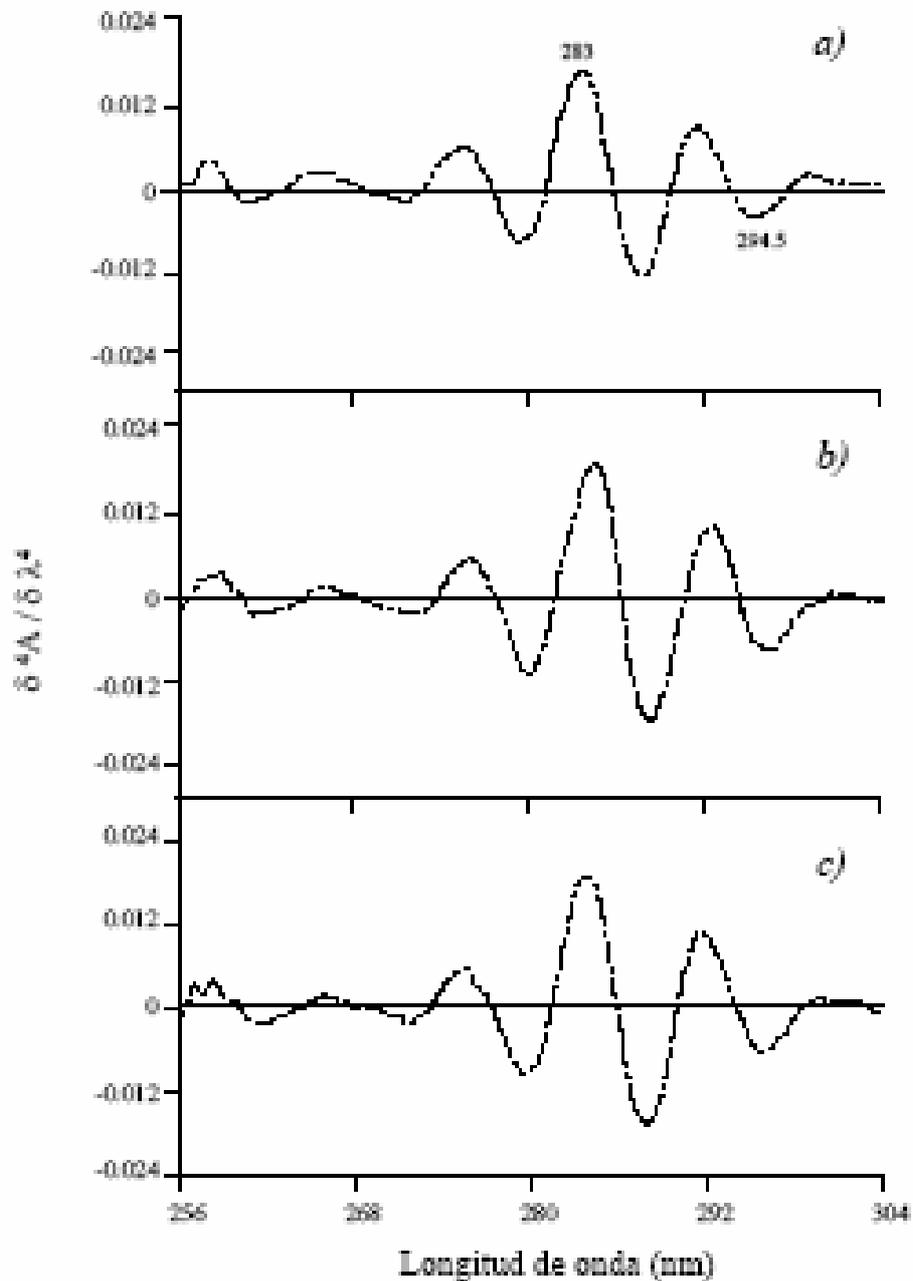


Figura 1.6. Espectros UV de la 4ª derivada de muestras de *a)* leche cruda, *b)* leche pasteurizada y *c)* leche UHT. El máximo a 283 nm es debido a la contribución de la absorción de los residuos de Tyr y Trp mientras que el mínimo a 294.5 nm se debe a la absorción de los residuos de Trp.

1.4.1.6 Efecto del almacenamiento de la leche UHT

Para conocer la influencia del tiempo de almacenamiento de la leche UHT a temperatura ambiente en la determinación de la relación PS/PT, se almacenaron dos lotes de leche UHT entera y tres lotes de leche UHT desnatada hasta su fecha de caducidad, tomando una muestra de leche cada 30 días. En primer lugar, se comprobó que para el mismo tiempo de almacenamiento la relación PS/PT no mostraba diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes lotes.

La actividad proteolítica aumenta durante el almacenamiento de la leche UHT a temperatura ambiente (Corzo y col., 1994), aunque el efecto es mayor para la leche desnatada que para la entera (López-Fandiño y col., 1993a). Para evaluar la proteólisis inducida durante el almacenamiento, se determinó el contenido en TN, en NCN y en NP en las muestras de leche desnatada (Tabla 1.7). Para las determinaciones de NCN y NPN se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre muestras de diferentes tiempos de almacenamiento, lo que evidenció la degradación proteolítica que tuvo lugar durante éste. Sin embargo, no se encontró una influencia significativa ($p < 0.05$) del tiempo de almacenamiento de la leche UHT entera o desnatada en la determinación de la relación PS/PT mediante este método.

Por lo tanto, pudo demostrarse que la determinación de la relación PS/PT mediante UV-4th DS no estaba influenciada por la degradación proteolítica de las proteínas lácteas, pues aunque existía dicha degradación, la determinación de la relación PS/PT no variaba.

1.4.1.7 Determinación de la relación PS/PT en leches UHT

Los valores obtenidos tras el análisis de cincuenta y cinco muestras de leches comerciales UHT enteras y desnatadas permitieron establecer una relación PS/PT media de 18.1%. Valores alejados de esta cifra podrían indicar adiciones de suero si fueran superiores a ella o de caseína o caseinatos si estuvieran por debajo.

Tabla 1.7. Determinación de la relación PS/PT (%) mediante UV-4th DS de dos lotes de leche entera UHT y tres lotes de leche desnatada UHT, y determinación del TN, NCN y NPN de tres lotes de leche desnatada UHT.

Tiempo de almacenamiento (días)	Relación PS/PT (%)		Fracciones nitrogenadas		
	Leche entera	Leche desnatada	TN (%)	NCN (%)	NPN (%)
0	18.2 ^a ± 0.2	18.5 ^a ± 0.4	0.49 ^a ± 1.9 · 10 ⁻³	0.071 ^a ± 4.9 · 10 ⁻³	0.024 ^a ± 1.6 · 10 ⁻³
30	18.4 ^a ± 0.2	18.7 ^a ± 0.8	0.50 ^a ± 10.9 · 10 ⁻³	0.090 ^b ± 7.8 · 10 ⁻³	0.026 ^{a, b, c} ± 1.0 · 10 ⁻³
60	18.7 ^a ± 0.8	19.3 ^a ± 0.3	0.50 ^a ± 1.48 · 10 ⁻³	0.101 ^b ± 4.1 · 10 ⁻³	0.025 ^{a, b} ± 3.1 · 10 ⁻³
90	18.3 ^a ± 0.4	18.3 ^a ± 0.6	0.48 ^a ± 4.5 · 10 ⁻³	0.097 ^b ± 8.0 · 10 ⁻³	0.032 ^c ± 2.5 · 10 ⁻³
120	18.5 ^a ± 0.3	19.2 ^a ± 0.6	0.48 ^a ± 7.8 · 10 ⁻³	0.121 ^c ± 5.4 · 10 ⁻³	0.032 ^{b, c} ± 2.7 · 10 ⁻³

n = 6

1.4.2 Detección de adulteraciones con suero y caseinato en leche mediante la determinación de la relación PS/PT por UV-4th DS

1.4.2.1 Detección de la adición de suero

La Tabla 1.8 recoge la determinación cuantitativa de la relación PS/PT de muestras de leche UHT a las que se había añadido suero ácido, cuyo contenido en proteína fue de 6.9 g/L, y suero dulce, con un contenido de 8.4 g/L, en una proporción entre un 2.5 y un 15% de proteína de suero en proteína de leche.

Tabla 1.8 Determinación de PS/PT mediante UV-4th DS en una muestra de leche UHT con adición de suero ácido y suero dulce entre 2.5 y 15% de suero en leche expresado en proteína.

Adición de suero a leche UHT (% en proteína)	Determinación de la relación PS/PT (%) ¹	
	Suero ácido	Suero dulce
0	18.6 ^a ± 0.5	18.1 ^a ± 0.8
2.5	19.6 ^a ± 0.7	19.1 ^{a, b} ± 1.0
5	22.7 ^b ± 0.5	20.3 ^{b, c} ± 0.6
7.5	23.1 ^b ± 0.5	20.6 ^{b, c} ± 0.3
10	24.1 ^b ± 0.4	21.8 ^{c, d} ± 0.4
12.5	26.3 ^c ± 0.5	22.6 ^d ± 0.5
15	27.6 ^{c, d} ± 0.6	25.4 ^e ± 0.2

n = 6

¹ La misma letra (a, b) en la misma columna indica ausencia de diferencia significativa (p<0.05)

El incremento observado en la relación PS/PT fue mayor para el suero ácido que para el suero dulce. A pesar de ello, tanto para el suero ácido como para el dulce se encontraron diferencias significativas (p<0.05) entre la relación PS/PT de la leche inicial y la que tenía una adición de suero de un 5%, lo que significa que

valores por encima de un 20% de PS/PT podrían ser indicativos de adición de suero a la leche.

1.4.2.2 Detección de la adición de caseinato

Con el propósito de evaluar si la adición de caseína o caseinato a la leche podría detectarse mediante la determinación de la relación PS/PT por este método de UV-4th DS, se añadió a una leche UHT un caseinato sódico del que se conocía el contenido en proteína (83.1%), en proporciones entre 1 y 5% de caseinato en leche expresado en proteína. La Tabla 1.9 recoge la determinación cuantitativa de la relación PS/PT de la muestra de leche con diferentes contenidos en caseinato. Se puede observar que el incremento en la adición de caseinato sódico a la leche UHT provoca una disminución en la relación PS/PT.

A partir de una adición de un 5% de caseinato sódico a la leche, expresado como proteína, existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las determinaciones de la relación PS/PT, lo que puede traducirse en que valores de relación PS/PT inferiores a 13% indicarían la presencia de caseína/caseinato añadido.

Tabla 1.9 Determinación de la relación PS/PT (%) mediante UV-4th DS en una muestra de leche UHT con adición de caseinato sódico entre 1 y 5% de caseinato en leche expresado en proteína.

Adición de caseinato sódico a leche UHT (% en proteína)	Determinación de la relación PS/PT (%) ¹
0	17.3 ^a ± 1.1
1	17.2 ^a ± 2.2
1.5	16.9 ^a ± 1.1
2.5	16.0 ^a ± 1.0
5	13.4 ^b ± 1.4

n = 4

¹ La misma letra (a, b) en la misma columna indica ausencia de diferencia significativa ($p < 0.05$)

1.4.3 Determinación de la relación PS/PT en leche mediante distintos métodos electroforéticos

Puesto que existen diferentes métodos electroforéticos que permiten la separación de las proteínas lácteas (fracción seroproteica y caseínica), bien mediante la relación carga/masa, o mediante el peso molecular, se evaluaron las posibilidades de estos métodos en la determinación de la relación PS/PT en leche.

1.4.3.1 Estudio de la determinación de la relación PS/PT en leche mediante SDS-PAGE

La Figura 1.7 muestra los perfiles electroforéticos obtenidos mediante SDS-PAGE de dos muestras de leche pasterizada, dos leches UHT, una leche en polvo y tres muestras de calibrado analizadas por duplicado.

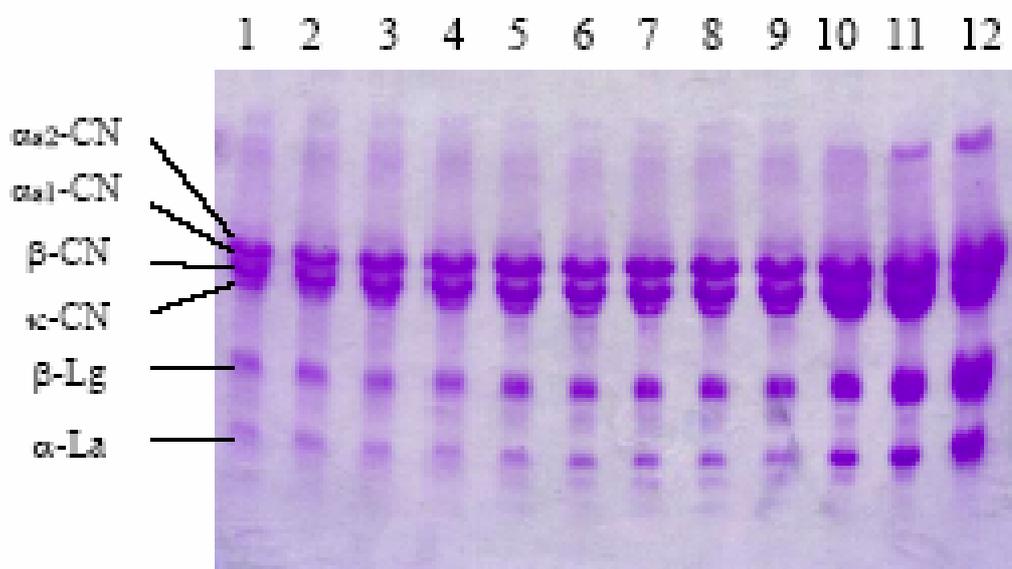


Figura 1.7. Perfil electroforético obtenido mediante SDS-PAGE de diferentes muestras de leche. Calles 1 a 4: leche pasterizada; Calles 5 a 8: leche UHT; Calle 9: leche en polvo; Calle 10: muestra de calibrado con una relación PS/PT de 10%; Calle 11: muestra de calibrado con una relación PS/PT de 15%; Calle 12: muestra de calibrado con una relación PS/PT de 25%.

Puede observarse la separación de las bandas correspondientes a α_{s2} -CN, α_{s1} -CN, β -CN, κ -CN, β -Lg y α -La en orden decreciente de M_r . La Lf, BSA e Ig se resolvían como tres bandas tenues en la parte superior del gel en las muestras de leche cruda o pasteurizada, pero que no aparecían en las muestras de leche UHT. Para simplificar la cuantificación, estas proteínas no se consideraron en la fracción seroproteica, que fue determinada como el área relativa correspondiente a las bandas de α -La y β -Lg, expresando en % la relación PS/PT. En cada placa analizada se incluyeron tres muestras de calibrado para que se pudiera corregir la variabilidad debida a la tinción en cada gel.

La reproducibilidad del método expresada como valor de RSD obtenido en cuatro determinaciones en diferentes geles para los puntos de 10, 15 y 25% de relación PS/PT fue de 6.9, 6.1 y 3.5%, respectivamente. Valores similares de variabilidad fueron encontrados por Recio (1996). Esta variabilidad es menor que la que se alcanza en los equipos convencionales, pues las separaciones se llevan a cabo en geles comerciales y en un equipo automatizado que permite el procesado de dos geles en las mismas condiciones. Para evitar esta variabilidad, Basch y col. (1985) han propuesto el uso en cada gel de una muestra que actúe como “patrón interno”. Por ello, en cada gel analizado se calculó una recta de calibrado, y se aplicó esta recta a los porcentajes de intensidad integrada obtenidos en las muestras de leche del gel. Los valores medios, máximos y mínimos para la relación de PS/PT en muestras de leche con diferente tratamiento térmico se recogen en la Tabla 1.10.

Los resultados medios de relación PS/PT en leches UHT fueron inferiores a los obtenidos previamente mediante UV-4th DS. A pesar del uso de muestras de calibrado en cada gel, el método mostró una gran variabilidad, pues los valores de RSD para las repeticiones de las muestras de leche oscilaron entre el 2.5% y el 14.1%.

Tabla 1.10 Determinación de la relación PS/PT (%) en muestras de leche con diferentes tratamientos térmicos mediante SDS-PAGE

Determinación de la relación PS/PT (%)	Leche pasteurizada	Leche UHT
Valor medio	16.4	14.7
Valor mínimo	13.3	12.6
Valor máximo	20.9	17.1
n	5	6

1.4.3.2 Estudio de la determinación de la relación PS/PT en leche mediante SDS-CE

La Figura 1.8 muestra los electroforegramas de una leche cruda, una leche pasteurizada y una leche UHT. Para identificar los picos que aparecían en las muestras de leche y estimar las M_r de las proteínas lácteas se inyectaron distintas proteínas lácteas comerciales: α_s -CN, β -CN, κ -CN, β -Lg α -La y BSA.

Se representó el logaritmo de las M_r de las proteínas estándar comerciales frente a la inversa de su tiempo de migración relativo (RTM), que es el tiempo de migración de la proteína dividido entre el tiempo de migración del punto de referencia, dando lugar a la recta de calibrado [$\log M_r = 6.85 - 3.60 \times (1/RTM)$; $r = 0.997$]. Mediante esta recta se calcularon las M_r de las proteínas lácteas. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 1.11.

En general, las M_r de las proteínas calculadas por SDS-CE fueron distintas de las obtenidas mediante SDS-PAGE debido al uso de diferentes matrices y campos eléctricos (Guttman, 1996). Las caseínas presentaron unas M_r muy parecidas entre ellas y diferentes a los que se obtendrían según su composición de aminoácidos. Este hecho puede explicarse por la diferente capacidad de unión del SDS a las caseínas individuales, que se debe al equilibrio competitivo existente, pues las caseínas pueden unirse al SDS o interactuar con otras moléculas de

caseína. Sin embargo, debido a la buena separación entre las proteínas de suero y las caseínas, el método podría ser utilizado para determinar la relación PS/PT en leche.

Tabla 1.11 Comparación de la masa relativa de las proteínas lácteas determinada mediante SDS-CE y su composición de aminoácidos.

Proteína comercial	M_r encontrada por SDS-CE	M_r teórica (Eigel, 1984)
α -La	14407 ± 488	14400
β -Lg	16963 ± 537	18400
κ -CN	44862 ± 1015	19000
β -CN	47790 ± 1054	24000
α_s -CN ¹	48550 ± 2129	α_{s1} -CN: 23600 α_{s2} -CN: 22500
κ -CN	44862 ± 1015	19000
BSA	53980 ± 1134	66267

¹ La proteína comercial es una mezcla de las proteínas α_{s1} - y α_{s2} -CN

n = 4

Entre los electroforegramas de las muestras de leche cruda y pasteurizada (Fig 1.8 *a,b*) y los de la leche UHT (Fig 1.8*c*) se pueden observar ligeras modificaciones. Sin embargo, en todas ellas aparecen dos picos correspondientes a α -La y β -Lg, y un pico grande correspondiente a las caseínas.

Para comprobar si la SDS-CE era una técnica válida para la determinación de la relación PS/PT, se analizaron muestras de calibrado preparadas en el laboratorio con una relación PS/PT entre 5 y 30%. La Tabla 1.12 recoge el resultado del análisis de regresión obtenido para las muestras de calibrado y las muestras NISECAS. La exactitud del método fue de 104.5% y la repetibilidad en RSD de 2.85%. El uso de SDS-CE permite una cuantificación más exacta de las bandas, con la ventaja de la automatización.

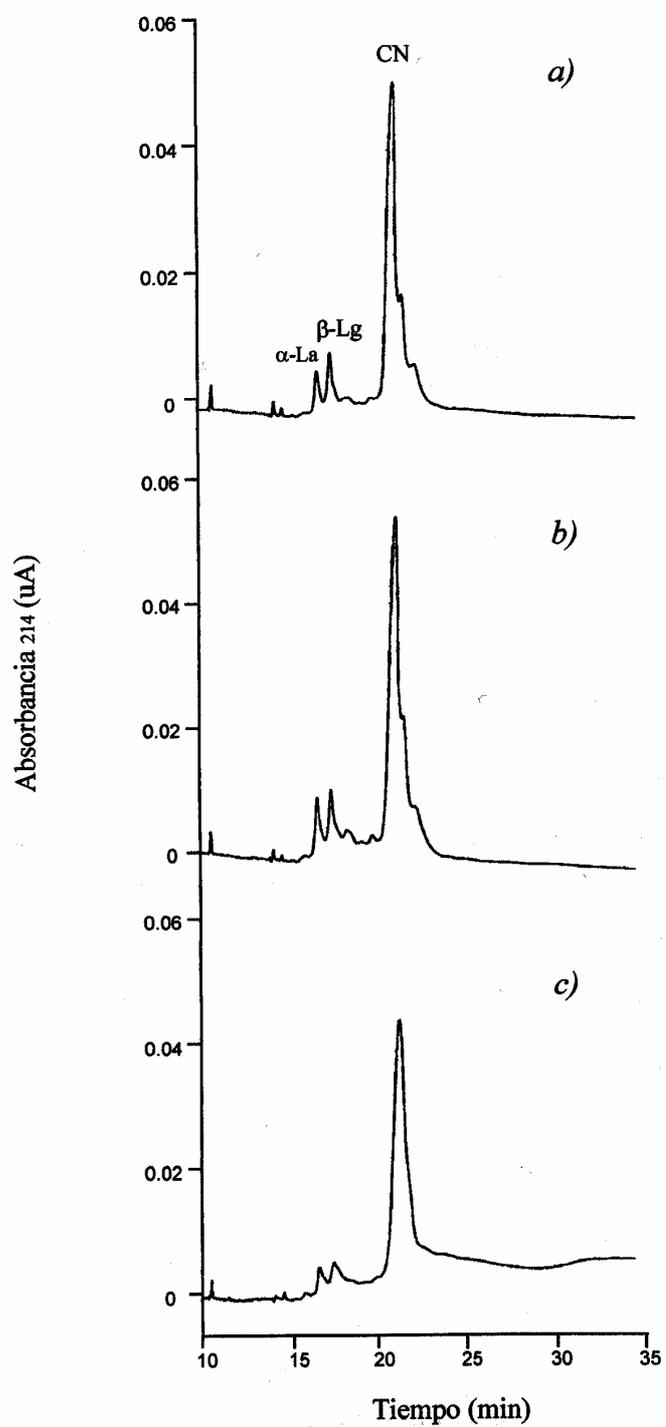


Figura 1.8 Electroforegramas obtenidos mediante SDS-CE de muestras de *a)* Leche cruda; *b)* Leche pasteurizada; *c)* Leche UHT.

Tabla 1.12 Resultados del análisis de regresión lineal para la variable Y_9 respecto a la relación PS/PT presente en las muestras de calibrado y en las muestras NISECAS, modelo $Y_n = a + b (\% \text{ PS/PT})$.

Muestras	a	b	R^2
Muestras de calibrado (n = 10)	0.903 ± 0.073	0.277 ± 1.144	0.969
Muestras NISECAS (n = 10)	0.969 ± 0.045	0.237 ± 0.857	0.974

1.4.3.3 Estudio de la determinación de la relación PS/PT mediante CE

La Figura 1.9 muestra los electroforegramas de una leche cruda, una leche pasteurizada, una leche UHT y una leche en polvo. La identificación de los picos se realizó de acuerdo con los resultados obtenidos por Recio y col. (1997*b, c*). Se pueden observar los picos correspondientes a las proteínas de suero α -La y β -Lg, a las caseínas α_{s2} -CN, α_{s1} -CN, α_{s0} -CN, κ -CN, β -CNB, β -CN A¹, β -CN A², y a las γ -CN. La disolución de las muestras de leche en urea 6M en presencia de un agente reductor, como el DTT, permite la disociación de las micelas de caseínas y de los agregados formados por enlaces disulfuro (Hekken y Thompson, 1992).

Los perfiles electroforéticos de las muestras de leche cruda y pasteurizada fueron similares (Fig 1.9*a, b*), mientras que los correspondientes a las muestras de leche UHT y leche en polvo presentaron picos deformados para todas las proteínas (Fig 1.9*c, d*). Mediante el análisis visual del electroforegrama de una muestra de leche puede estimarse cualitativamente el tipo de tratamiento térmico aplicado durante su procesado. En la β -Lg, la distorsión de los picos puede ser debida a la lactosilación que tiene lugar por condensación entre la lactosa y los grupos amino unidos a la proteína a través de la reacción de Maillard, que depende tanto de la duración y la severidad del tratamiento térmico aplicado como de la actividad de agua (Otte y col., 1998).

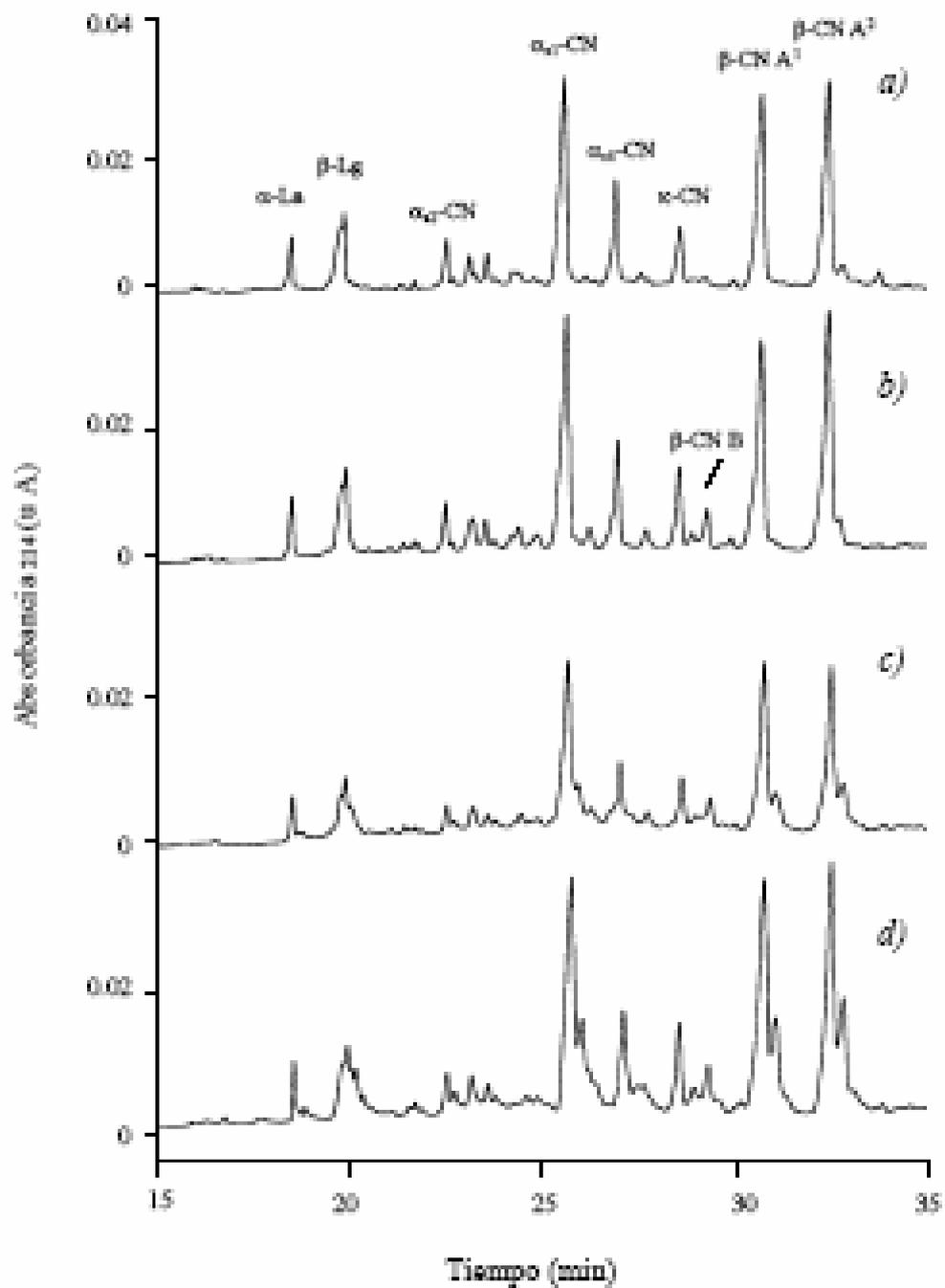


Figura 1.9 Electroforegramas de muestras de leche a) cruda; b) pasteurizada; c) UHT; d) en polvo.

Se pudo observar que la distorsión de los picos proteicos de algunas muestras de leche UHT provocaba una falta de horizontalidad de la línea base del electroforegrama. La Figura 1.10 refleja las dos formas de establecer la línea base para integrar los electroforegramas de una muestra de leche UHT. De la primera forma se traza una línea base horizontal (Fig 1.10a), mientras que de la segunda forma se traza una línea base parcial debajo de los picos o grupos de picos principales: proteínas de suero, α_{s2} -CN y γ -CN, α_{s1} -CN, κ -CN y β -CN B y β -CN A¹ y A², modo que se conoce como “integración valle a valle” (Fig 1.10b). Cuando se traza una línea base horizontal (modo “línea recta”) se puede dar una sobreestimación del área de todos los picos, aunque esta es mayor para la fracción caseínica, lo que da lugar a una subestimación en la determinación de la relación PS/PT. La Tabla 1.13 refleja la comparación de los dos modos de integración en la determinación de la relación PS/PT en tres muestras de leche UHT, en tres muestras de leche en polvo que presentaban una línea base irregular y en tres muestras de referencia NISECAS analizadas por duplicado en distintos días.

Tabla 1.13 Resultados de la comparación de la determinación de la relación PS/PT en tres muestras de leche UHT, en tres muestras de leche en polvo y en tres muestras NISECAS (15, 20 y 25%) mediante CE con integración en “línea recta” y “valle a valle”.

Diferencias relacionadas en la determinación de la relación PS/PT mediante CE “línea recta”-“valle a valle”				
Muestras	Media	Desviación típica	Grados de libertad	Significación (bilateral)
Leche UHT	-2.27	0.432	5	0.00 *
Leche en polvo	-2.27	0.015	5	0.00 *
Muestras NISECAS	-0.23	0.763	17	0.22 ns

* Resultados significativamente diferentes
ns Resultados no significativamente diferentes

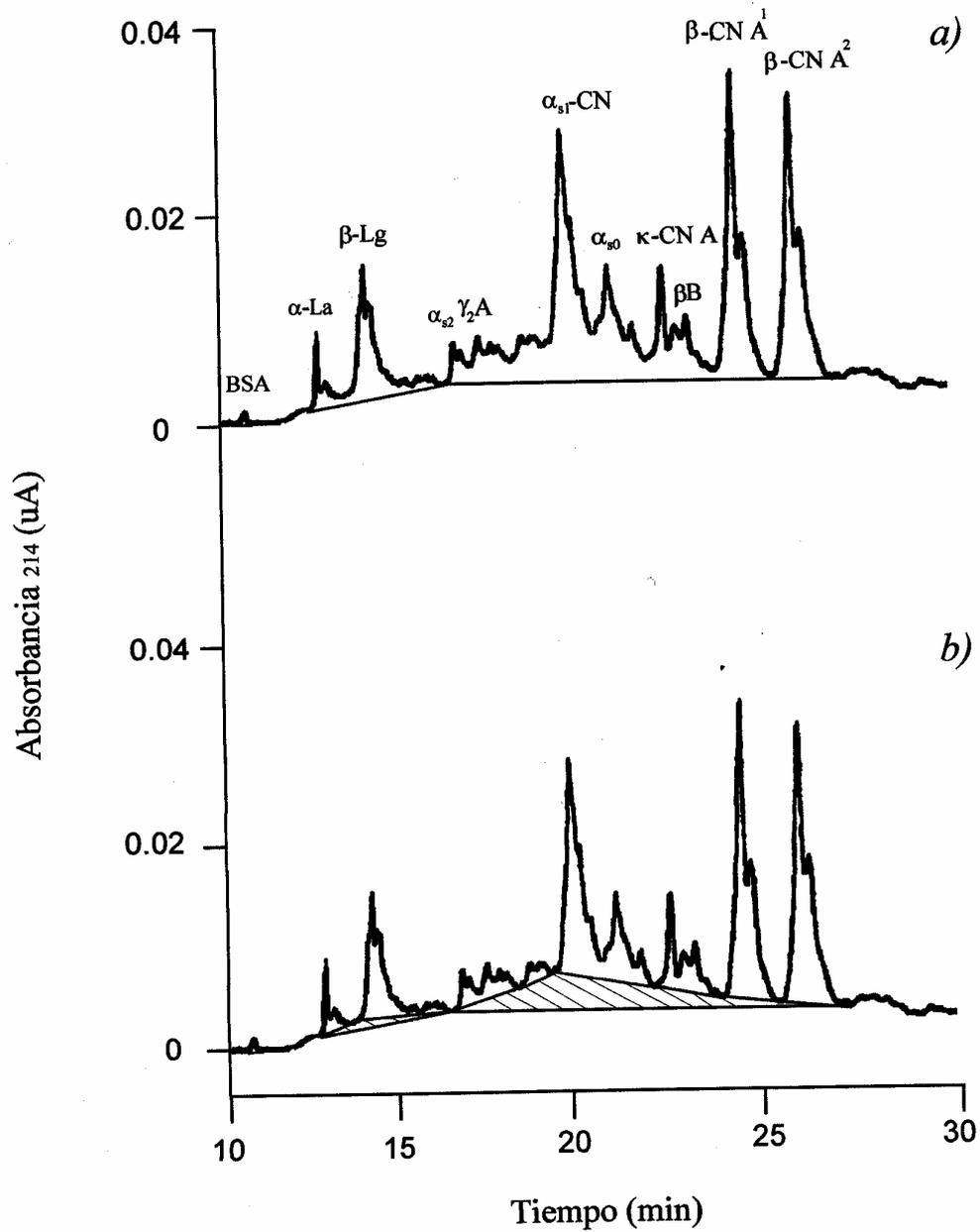


Figura 1.10. Electroforegramas de una muestra de leche UHT con falta de horizontalidad en la línea base de los picos proteicos. Trazado de la línea base para la integración en forma a) “línea recta” y b) “valle a valle”. α_{s1} : α_{s1} -CN, γ_2A : γ_2A -CN, α_{s0} : α_{s0} -CN, β B: β -CN B.

Los valores de la relación PS/PT encontrados mediante la integración en “línea recta” fueron significativamente inferiores a los encontrados mediante la integración “valle a valle” para las muestras de leche UHT y de leche en polvo (media de las diferencias: -2.26). Sin embargo, en el caso de los electroforegramas de leche con una línea base horizontal, los valores de la relación PS/PT obtenidos integrando de los dos modos no eran diferentes, pues el área sobreestimada al trazar una “línea recta” era despreciable. Lo mismo sucedía en las muestras de referencia NISECAS 15, 20 y 25 cuando se realizó la determinación de la relación PS/PT por duplicado en seis días diferentes mediante CE utilizando los dos modos de integración (media de las diferencias: -0.22). Los resultados al utilizar los dos modos de integración no fueron significativamente ($p < 0.05$) diferentes (Tabla 1.13).

Se han descrito algunos casos en los que la integración “valle a valle” en electroforegramas con falta de horizontalidad en la línea base proporciona resultados más correctos debido a que se evita la falta de reproducibilidad del trazado de la línea base (Rothbauer, 1999). Aunque conduce a una subestimación del área de los picos, en cromatografía está admitido forzar a la línea base a ir hasta el valle entre dos picos cuando la resolución entre ellos es mayor de 1.5 (Guiochon y Guillemin, 1988). Por ello, a partir de este momento se integraron todas los electroforegramas con el modo “valle a valle”.

La Tabla 1.14 recoge el resultado del análisis de regresión obtenido mediante las muestras de calibrado y las muestras NISECAS. La exactitud media del método fue de 103.2%. La repetibilidad expresada en RSD fue de 2.63%.

Tabla 1.14 Resultados del análisis de regresión lineal para la variable y_9 respecto a la relación PS/PT presente en las muestras de calibrado y en las muestras NISECAS, modelo $Y_n = a + b (\% \text{ PS/PT})$.

Muestras	a	b	R ²
Muestras de calibrado (n = 10)	0.280 ± 0.412	1.008 ± 0.280	0.986
Muestras NISECAS (n = 10)	0.061 ± 0.338	1.091 ± 0.019	0.995

1.4.3.3.1 Efecto del tratamiento térmico de la leche

Los resultados de la determinación de la relación PS/PT en dos muestras de leche, antes y después de ser sometida a un tratamiento industrial UHT, se recogen en la Tabla 1.15.

Tabla 1.15 Determinación de la relación PS/PT (%) en muestras de leche antes y después del tratamiento UHT mediante CE.

Muestras de leche	Determinación de la relación PS/PT (%) ¹	
	Antes del tratamiento UHT	Después del tratamiento UHT
1	15.6 ^a ± 0.6	16.1 ^a ± 0.3
2	17.2 ^a ± 0.9	16.2 ^a ± 0.3

n = 6

¹ La misma letra (a, b) en la misma fila indica ausencia de diferencia significativa (p<0.05)

Como se puede observar, no se encontraron diferencias significativas (p<0.05) entre la relación PS/PT determinada en las muestras de leche antes y después del tratamiento UHT.

1.4.3.3.2 Influencia de la conservación de la leche cruda

Con el objeto de evaluar si la proteólisis de la leche previa al tratamiento térmico podría afectar a la determinación de la relación PS/PT mediante CE se estudió el efecto de la conservación de la leche cruda. Las muestras de leche cruda descritas en el apartado 1.4.1.4, se analizaron mediante CE y se determinó su relación PS/PT.

La Figura 1.11 muestra los electroforegramas correspondientes a una muestra tomada a los 0, a los 2 y a los 4 días de almacenamiento.

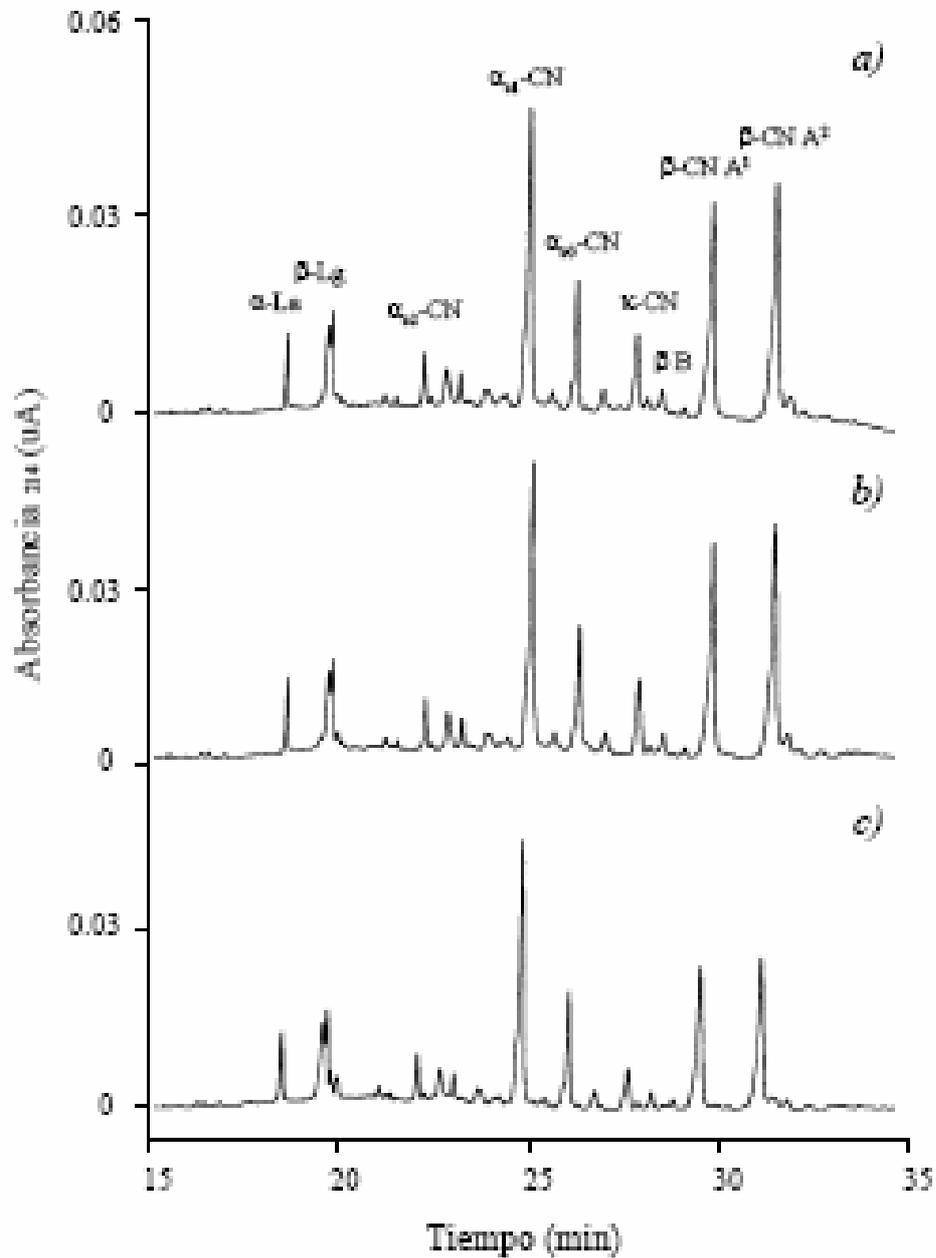


Figura 1.11 Electroforegramas correspondientes a muestras de leche cruda conservadas a 6° C durante a) 0 días; b) 2 días; c) 4 días.

Se puede observar un progresivo ensanchamiento de los picos de la zona de la β -Lg y una disminución de la altura de los picos correspondientes a las β -CN A¹ y A², y a la κ -CN. En las condiciones empleadas, la para- κ -CN tiene un tiempo de migración similar al de la β -Lg, lo que produce una interferencia entre sus picos y una sobreestimación del área de la β -Lg.

La Tabla 1.16 recoge los relación PS/PT obtenida en las muestras de leche cruda analizadas.

Tabla 1.16 Determinación de la relación PS/PT en cuatro muestras de leche cruda almacenadas a 6° C durante 0, 2 y 4 días mediante CE.

Tiempo de almacenamiento (días)	Determinación de la relación PS/PT (%) ¹
0	16.8 ^a ± 0.1
2	17.9 ^a ± 0.4
4	23.4 ^b ± 1.2

n = 4

¹ La misma letra (a, b) en la misma columna indica ausencia de diferencia significativa (p<0.05)

La relación de PS/PT determinada a los cuatro días de almacenamiento fue significativamente (p<0.05) más alta, debido a la sobreestimación del área de las proteínas de suero y a la disminución del área total de las caseínas. En leches UHT ha sido descrita la presencia de para- κ -CN por la acción de proteasas termorresistentes de origen bacteriano que permanecen en la leche (Snoeren y col., 1979; López-Fandiño y col. 1993*a, b*). La cantidad de estas proteasas depende de su presencia en la leche de partida, por lo que podrían provenir de una leche cruda de mala calidad bacteriológica. Las proteínas más susceptibles a la acción de las enzimas proteolíticas que pueden existir en la leche son la κ -CN, que es la caseína más sensible a la acción de las proteasas bacterianas (Miranda y Gripon, 1986) y las β -CN, que son las caseínas degradadas preferentemente por la plasmina, pero también son susceptibles de ser degradadas por proteasas de bacterias (Grieve y Kitchen, 1985). Se realizó una medida relativa de estas dos caseínas por medio de

las relaciones α_{s1} -CN/ κ -CN y α_{s1} -CN/ β -CN, ya que la α_{s1} -CN es mucho menos sensible a la proteólisis (Swaisgood, 1992) (Tabla 1.17).

Tabla 1.17 Valores de la relación α_{s1} -CN/ κ -CN y α_{s1} -CN/ β -CN encontrados en cuatro muestras de leche cruda almacenadas a 6° C durante 0, 2 y 4 días mediante CE.

Tiempo de almacenamiento de la leche cruda (días)	Relación α_{s1} -CN/ κ -CN	Relación α_{s1} -CN/ β -CN
0	4.2 ^a ± 0.28	0.59 ^a ± 0.01
2	4.2 ^a ± 0.24	0.62 ^a ± 0.02
4	7.7 ^b ± 4.76	0.87 ^b ± 0.08

n = 5

¹ La misma letra (a, b) en la misma columna indica ausencia de diferencia significativa ($p < 0.05$)

Se pudo observar que a los cuatro días de almacenamiento los valores medios de las dos relaciones aumentaban. Este aumento fue significativo en el caso de la relación α_{s1} -CN/ β -CN, pero en el caso de la relación α_{s1} -CN/ κ -CN había una gran dispersión en los valores, pudiéndose encontrar en leches muy proteolizadas valores propios de los 0 y 2 días de almacenamiento, lo que se debe probablemente al distinto contenido en bacterias psicrotrofas en las muestras de leche cruda, o bien a su distinta actividad, pues es sabido que dependiendo de la cepa, las bacterias psicrotrofas producen distinta cantidad de enzimas proteolíticas (Renner, 1988). Por ello, se consideró que la relación α_{s1} -CN/ β -CN era un índice más adecuado, lo que está de acuerdo con la mayor actividad de la plasmina en la leche cruda, que degrada las β -CN. Estos resultados permiten sugerir que la relación α_{s1} -CN/ β -CN en una leche cruda puede servir como índice de su grado de proteólisis.

En las muestras de leche que había sido almacenada durante 4 días, los recuentos de bacterias mesófilas fueron mayores de $8 \cdot 10^7$ ufc/ml y de $11 \cdot 10^7$ ufc/ml de bacterias psicrotrofas. Otros autores han observado el incremento en el número de bacterias lipolíticas y proteolíticas, predominando los de tipo psicrotrofo, en

leche cruda almacenada a 4 °C durante 2 días. Su presencia ha sido relacionada con cambios fisicoquímicos con efectos negativos en las propiedades funcionales y sensoriales en la leche en polvo elaborada posteriormente (Celestino y col., 1997a). Por lo tanto, la relación PS/PT mediante CE puede verse afectada por la proteólisis en leches crudas.

1.4.3.3.3 Efecto del almacenamiento de la leche UHT

En el apartado 1.4.1.6 se había comprobado mediante el aumento de las fracciones nitrogenadas NCN y NPN la existencia de proteólisis en las muestras de leche UHT desnatadas almacenadas a temperatura ambiente, aunque no afectaba a la determinación de la relación PS/PT mediante UV 4th DS. Para conocer la posible influencia de la proteólisis en la determinación de la relación PS/PT mediante este método de CE, se analizaron dos lotes de leche desnatada UHT almacenada a 20° C durante 90 días, tomando muestras de leche cada 30 días.

La Figura 1.12 muestra los electroforegramas correspondientes a las muestras de leche UHT pertenecientes al lote 1 tomadas a los 0, 30, 60 y 90 días de almacenamiento. Se pudo observar un progresivo aumento del área correspondiente al pico de la β -Lg por interferencia de otros picos, mientras que el área de los picos de caseínas disminuía ligeramente.

En la Tabla 1.18 se recoge la determinación de la relación PS/PT en los distintos tiempos de almacenamiento de las muestras de leche. A diferencia de lo que ocurría utilizando el método de UV 4th DS, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la relación PS/PT entre las muestras de leche UHT recién procesadas y las almacenadas durante 30 días (lote 1) y 60 días (lote 2). Este hecho podría atribuirse a la peor calidad microbiológica inicial de la leche del lote 1, en la que la degradación proteolítica fue más acusada, lo que está de acuerdo con los resultados encontrados por García-Risco y col. (1999).

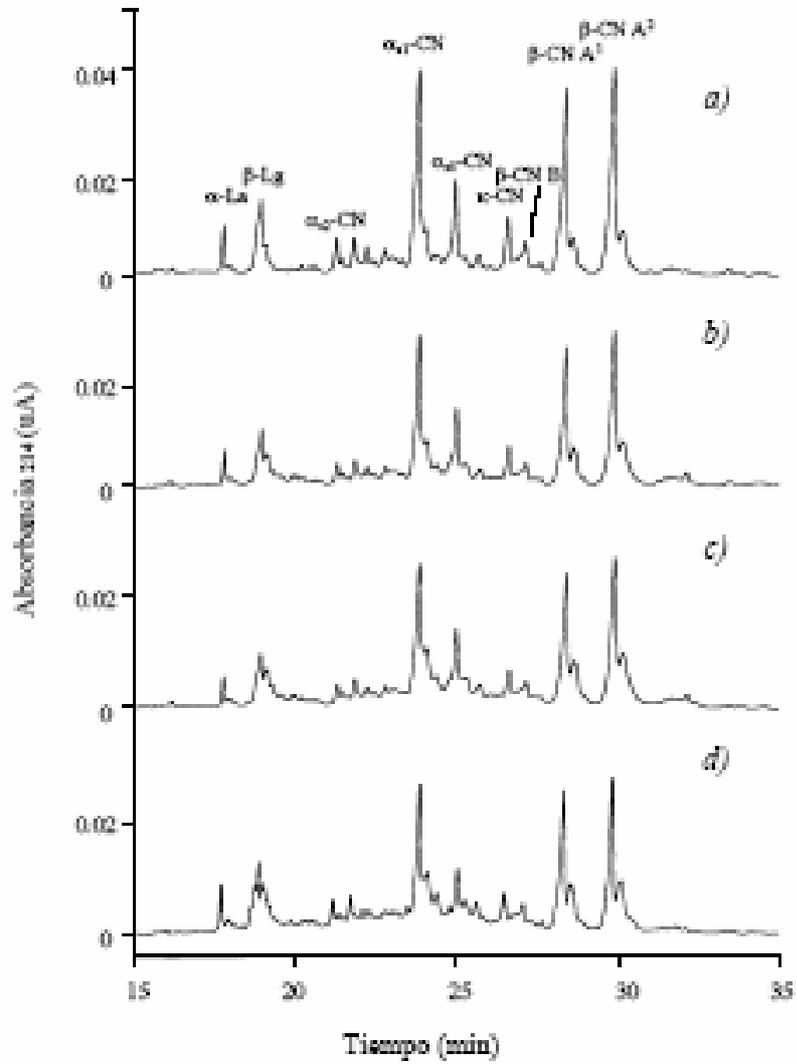


Figura 1.12 Electroforegramas correspondientes a muestras de leche UHT desnatada pertenecientes al lote 1 almacenadas a 20° C durante a) 0 días; b) 30 días; c) 60 días; d) 90 días.

Tabla 1.18 Determinación de la relación PS/PT (%) en muestras de leche UHT desnatada almacenadas durante 90 días a 20° C mediante CE.

Tiempo de almacenamiento de la leche UHT (días)	Determinación de la relación PS/PT (%)	
	Lote 1	Lote 2
0	16.3 ^a ± 0.3	16.2 ^a ± 0.6
30	20.4 ^b ± 0.4	15.5 ^a ± 0.4
60	22.0 ^c ± 0.5	19.2 ^b ± 0.6
90	24.0 ^d ± 0.2	20.8 ^b ± 2.6

n = 4

¹ La misma letra en la misma fila o columna indica ausencia de diferencia significativa (p<0.05)

Al igual que en las leches crudas, sería conveniente disponer de un índice que permitiera conocer si una muestra de leche tiene un grado de proteolisis que impide la determinación de la relación PS/PT mediante el método de CE. Los valores de las relaciones α_{s1} -CN/ κ -CN, α_{s1} -CN/ β -CN y del A_r de la κ -CN obtenidos para las muestras de los lotes 1 y 2 se recogen en la Tabla 1.19.

Los valores de la relación α_{s1} -CN/ β -CN fueron del mismo orden en los dos lotes de leche UHT estudiados a diferentes tiempos de almacenamiento, lo que está de acuerdo con la casi total inactivación de la plasmina con el tratamiento térmico aplicado a la leche.

En cambio, los valores de la relación α_{s1} -CN/ κ -CN aumentaron significativamente con relación al tiempo de almacenamiento, aunque de forma diferente entre los dos lotes de leche estudiados. Se encontró un cambio en la relación a los 30 días en el lote 1 y a los 60 días en el lote 2, lo que coincide con los resultados observados en la determinación de la relación PS/PT mediante CE. Sin embargo, los valores absolutos de esta relación diferían, pues en el lote 2 podría considerarse proteolisis un valor de la relación α_{s1} -CN/ κ -CN que puede encontrarse en el caso del lote 1 para una leche que no se considera afectada por degradación proteolítica.

Tabla 1.19 Valores de las relaciones α_{s1} -CN/ κ -CN y α_{s1} -CN/ β -CN, y A_r de la κ -CN encontrados en muestras de leche UHT (lotes 1 y 2) almacenadas a 20° C durante 0, 30, 60 y 90 días.

Tiempo de almacenamiento de la leche UHT (días)	Relación α_{s1} -CN/ κ -CN		Relación α_{s1} -CN/ β -CN		A_r de κ -CN	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
0	6.0 ^a ± 0.4	4.7 ^a ± 0.3	0.52 ^a ± 0.02	0.54 ^a ± 0.01	3.4 ^a ± 0.3	4.3 ^a ± 0.2
30	9.5 ^b ± 1.5	4.3 ^a ± 0.4	0.47 ^a ± 0.01	0.44 ^a ± 0.04	2.0 ^b ± 0.3	4.2 ^a ± 0.3
60	10.2 ^b ± 0.4	6.6 ^b ± 1.0	0.48 ^a ± 0.01	0.46 ^a ± 0.05	1.9 ^b ± 0.1	2.8 ^b ± 0.1
90	10.4 ^b ± 0.8	8.0 ^c ± 0.3	0.47 ^a ± 0.03	0.49 ^a ± 0.06	1.7 ^b ± 0.2	2.5 ^b ± 0.1

n = 4

¹ La misma letra (a, b, c) en la misma columna indica ausencia de diferencia significativa (p<0.05)

Esto puede atribuirse a la diferente cantidad de bacterias psicotrofas que se encontraban en las muestras antes de ser sometidas al tratamiento térmico, que se traduce en la diferente actividad remanente que se observa con el almacenamiento de la leche (López-Fandiño y col., 1993c). El área relativa de la κ -CN también sufría una disminución con el aumento de la proteólisis, por lo que también podría servir también de índice de proteólisis de las leches UHT (Tabla 1.19). Al igual que en las leches crudas, si en la leche se comprueba la existencia de proteólisis, no puede determinarse correctamente la relación PS/PT mediante CE.

1.4.3.3.4 Detección de la adición de suero a la leche

La Tabla 1.20 recoge la determinación de la relación PS/PT de leche UHT a las que se había añadido suero ácido (6.9 g de proteína/L) en proporción entre un 2.5 y un 12.5% de proteína de suero en leche, expresado en proteína. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la relación PS/PT de la leche UHT inicial y la leche con una adición de suero de un 5% expresado en proteína.

Tabla 1.20 Determinación de la relación PS/PT (%) en una muestra de leche UHT con adición de suero ácido y suero dulce entre 2.5 y 12.5% de suero en leche expresado en proteína mediante CE.

Adición de suero a leche UHT (% en proteína)	Determinación de la relación PS/PT (%) ¹
0	16.3 ^a ± 0.3
2.5	17.0 ^a ± 0.3
5	19.7 ^b ± 0.6
10	21.1 ^b ± 0.6
12.5	24.3 ^c ± 0.2

n = 3

¹ La misma letra (a, b) en la misma columna indica ausencia de diferencia significativa ($p < 0.05$)

Para poder elucidar si una muestra de leche que presente una elevada relación PS/PT determinada mediante CE se debe a una adición de suero o, por el contrario, es debida a proteólisis, podrían aplicarse las relaciones descritas en el apartado anterior para descartar las muestras con proteólisis.

1.4.3.3.5 Determinación de la relación PS/PT en leches UHT enriquecidas en calcio, leches en polvo y caseinatos

Con el fin de conocer los valores de la relación PS/PT obtenidos mediante CE en muestras de leche y productos lácteos, se determinó esta relación en muestras comerciales de leches UHT enriquecidas en calcio, en leches en polvo y en distintos caseinatos (Tabla 1.21).

Tabla 1.21 Determinación de la relación PS/PT en muestras comerciales de leche UHT enriquecida en calcio, en leches en polvo y en caseinatos mediante CE.

Determinación de la relación PS/PT (%)	Leches UHT enriquecidas en Ca	Leches en polvo	Caseinatos
Valor medio	16.7	15.6	6.2 ¹
Valor mínimo	14.4	14.4	0
Valor máximo	20.2	17.5	6.7

¹ Sin considerar la muestra de caseinato cuya relación PS/PT era 0
n = 4

Todos los valores encontrados para la determinación de la relación PS/PT en las muestras de leche UHT y en polvo se encontraron entre un 14.4 y un 20.2%. Dado que los valores de relación PS/PT en las leches en polvo son similares a los obtenidos en las leches líquidas, es posible asumir que en la determinación de la relación PS/PT no existe una influencia del proceso de obtención de estas leches, que se someten a una pasterización antes de su procesado mediante evaporación y spray-drying (Singh y Creamer, 1991).

Entre los caseinatos, se encontró una muestra sin proteínas de suero, y dos en las que la proporción oscilaba entre un 5.6 y un 6.7%, lo que indica la presencia de proteínas de suero en estos productos lácteos, debido a su desnaturalización y precipitación junto con las caseínas en el proceso de obtención.

1.4.4 Comparación de la determinación de la relación PS/PT en leche y productos lácteos mediante diferentes métodos analíticos

1.4.4.1 Determinación de la relación PS/PT en leches sometidas a diferentes tratamientos térmicos.

Se utilizaron los tres métodos que habían proporcionado los mejores resultados: CE, SDS-CE y UV 4th DS para determinar la relación PS/PT en varias muestras de leche con diferente tratamiento térmico, con el fin de establecer el valor de esta relación en los distintos tipos de leche.

1.4.4.1.1 Determinación de la relación PS/PT en muestras de referencia

Previamente, se analizaron mediante los métodos elegidos las muestras de referencia NISECAS 15, 20 y 25. La Tabla 1.22 recoge el análisis de regresión para los tres métodos elegidos: CE, SDS-CE y UV 4th DS.

Tabla 1.22 Resultados del análisis de regresión obtenidos mediante los métodos de CE, SDS-CE y UV 4th DS, para las muestras NISECAS 0, 15, 20, 25 y 100, modelo $Y_n = a + b$ (% PS/PT)

Técnica analítica	a	b	R ²
CE	-0.061 ± 0.338	1.091 ± 0.019	0.995
SDS-CE	0.237 ± 0.857	0.969 ± 0.045	0.974
UV 4 th DS	25.85 ± 0.051	0.658 ± 0.025	0.986

La relación PS/PT determinada mediante CE y SDS-CE se expresó como el A_r de las proteínas de suero antes y después de aplicar la curva de calibrado obtenida con las muestras NISECAS de 0, 15, 20 y 25% (Tabla 1.23). En el método de UV 4th DS siempre es necesario utilizar una curva de calibrado. Para evaluar la exactitud de los métodos, en las determinaciones de las muestras NISECAS se calculó el cociente ($|\text{valor verdadero} - \text{media}|$)/valor verdadero $\times 100$. En el caso de la CE y de la SDS-CE, este cociente aumentó cuando se utilizaron las curvas de calibrado, excepto en la muestra NISECAS 25. La repetibilidad de la CE y de la SDS-CE, expresada como SD, fue casi la misma con y sin la utilización de las curvas de calibrado. Estos resultados indican que cuando se utilizan la CE o la SDS-CE no es necesario el empleo de una curva de calibrado. Así, en los análisis posteriores, la relación PS/PT se determinó directamente mediante el A_r de los picos correspondientes a las proteínas de suero.

Tabla 1.23 Determinación de la relación PS/PT (%) en las muestras de referencia (NISECAS 15, 20 y 25) que contienen un 15%, un 20% y 25% de PS/PT mediante CE, SDS-CE y UV-4th DS.

Muestra de referencia	Determinación de la relación PS/PT (%)				
	A_r de las proteínas de suero		Después de aplicar la curva de calibrado al A_r de las proteínas de suero		
	CE	SDS-CE	CE	SDS-CE	UV 4 th DS
NISECAS 15	14.5 \pm 0.4 (3.3) ¹	14.9 \pm 2.1 (0.7) ¹	14.2 \pm 0.4 (5.3) ¹	15.4 \pm 2.2 (2.7) ¹	15.9 \pm 0.6 (6.0) ¹
NISECAS 20	19.4 \pm 0.8 (3.0) ¹	20.1 \pm 1.5 (0.1) ¹	19.2 \pm 0.8 (4.0) ¹	20.7 \pm 1.5 (3.5) ¹	20.4 \pm 0.6 (2.0) ¹
NISECAS 25	25.6 \pm 0.1 (2.4) ¹	24.1 \pm 0.6 (3.6) ¹	25.5 \pm 0.1 (2.0) ¹	25.1 \pm 0.6 (0.1) ¹	25.3 \pm 0.3 (1.2) ¹

n = 4

¹Exactitud del método calculada como ($|\text{valor verdadero} - \text{media}|$)/valor verdadero $\times 100$.

La comparación de los resultados obtenidos para las muestras de referencia NISECAS por los tres métodos indicó que la SD era inferior para la CE y la UV-4th DS, mientras que la SDS-CE proporcionaba resultados más exactos. Sin embargo, como puede observarse en la representación de los intervalos de confianza al 95% del análisis ANOVA bidimensional (Figura 1.13), no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las determinaciones de la relación PS/PT obtenidas mediante los tres métodos. Este hecho es de destacar si se tiene en cuenta que cuando se emplea la CE se detecta la absorbancia de todas las proteínas separadas a 214 nm, mientras que en UV 4th DS se mide la relación de absorbancias a 283 y 294.5 nm entre los residuos Tyr y Trp de las proteínas.

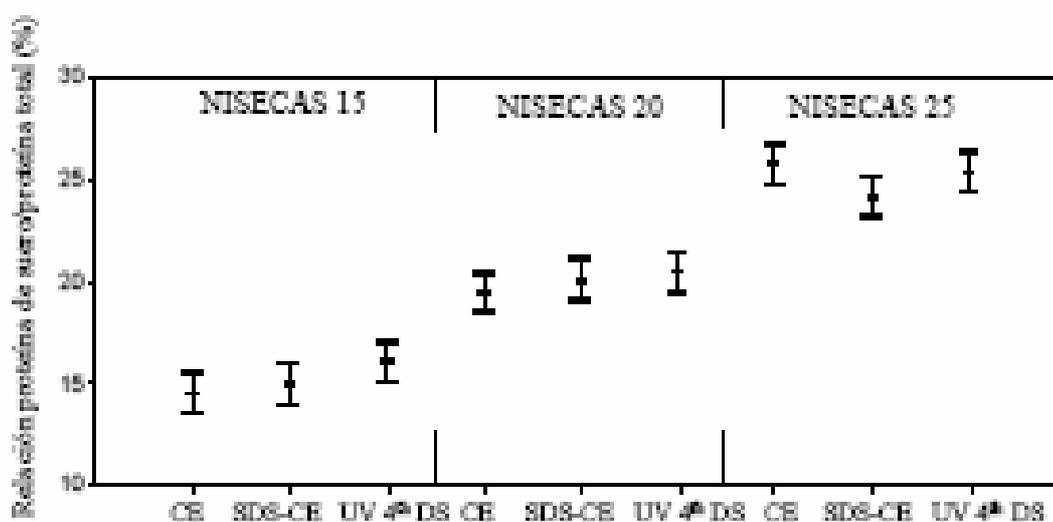


Figura 1.13. Análisis ANOVA bidimensional de la determinación de la relación PS/PT en las muestras NISECAS 15, 20 y 25 mediante CE, SDS-CE y UV 4th DS. Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95% de las medias.

1.4.4.1.2 Determinación de la relación PS/PT en muestras de leche sometidas a diferentes tratamientos térmicos

Con el propósito de establecer los valores medios de la relación PS/PT en muestras de leche, se analizó un elevado número de muestras de diferentes orígenes que podían haber sido sometidas a distintos tratamientos: leches crudas, pasterizadas y UHT. En el caso de muestras UHT comerciales, el estudio se realizó en muestras de leche recientemente procesada para evitar la influencia de la proteólisis. La Tabla 1.24 recoge los valores medios, máximos y mínimos de la relación PS/PT obtenidos en estas muestras de leche UV 4th DS, CE y SDS-CE.

Para una de las muestras de leche cruda se encontró una relación PS/PT mayor del 25% por los tres métodos. Esta muestra podría provenir de una leche mamítica, pues se han descrito aumentos en la relación PS/PT en muestras con un recuento de células somáticas por encima de 250000 células/ml (Rogers y col., 1989). Esta muestra no fue incluida en la Tabla 1.24.

Cuando se consideraron todas las muestras de leche comerciales analizadas (n = 44), la relación PS/PT tuvo un valor medio de 17.4 %. El intervalo de la relación natural de PS/PT de la leche no ha sido bien establecido. Los valores que encontraron Lüthi-Peng y Puhan (1999) utilizando un método espectroscópico eran para leche cruda de vaca (n = 34) entre 12.7 y 21 % y para leche cruda de búfala (n = 11) entre 12.7 y 17.6%. Coulon y col., (1998) han revisado los factores genéticos, fisiológicos y dietéticos que afectan a la proporción de caseína en proteína verdadera en la leche. La variante genética de la β -Lg es el principal factor que afecta la relación caseína/proteína en la leche, mientras que los factores ligados a la dieta tienen una influencia menor, aunque afectan al contenido total en proteína de la leche. La relación PS/PT que estos autores encuentran es de 16.8% en la leche con β -Lg BB, de 18.4% en la leche con β -Lg AB y 19.6% en la leche con β -Lg AA. Sin embargo, aunque este factor tiene influencia a nivel individual, no sería detectable en leche de gran mezcla. No es posible comparar los resultados obtenidos

para las leches sometidas a tratamiento UHT, pues no se han encontrado referencias de autores que hayan determinado esta relación en leches con dicho tratamiento.

Tabla 1.24 Determinación de la relación PS/PT en muestras de leche cruda, pasteurizada y UHT enteras y desnatadas mediante CE, SDS-CE y UV-4th DS.

Muestras de leche	Valor	Determinación de la relación PS/PT (%)		
		CE	SDS-CE	UV-4 th DS
Cruda	Medio	17.1	18.5	17.2
	Mínimo	14.4	14.4	14.2
	Máximo	22.7	23.4	19.9
	n	21	21	19
Pasteurizada	Medio	16.6	17.7	18.8
	Mínimo	13.6	15.4	15.4
	Máximo	18.2	20.8	21.4
	n	5	5	5
UHT	Medio	16.8	17.0	17.2
	Mínimo	13.8	13.7	13.5
	Máximo	20.7	20.8	20.2
	n	14	18	18

¹ RSD en porcentaje

Se realizó una comparación estadística de los métodos y del tratamiento térmico mediante un análisis de varianza bidimensional. Ni las variables de agrupamiento (método y tratamiento térmico) ni sus interacciones fueron significativas ($p < 0.05$). La superposición de los intervalos de confianza al 95% para las leches crudas, pasteurizadas y UHT determinadas mediante los tres métodos analíticos indican que el tratamiento térmico UHT, aunque es lo suficientemente severo como para producir la desnaturalización de las proteínas, no tiene influencia en la relación PS/PT de la leche determinada mediante estos tres métodos (Figura 1.14).

Se puede concluir que la CE, la SDS-CE y UV-4th DS, son métodos efectivos para determinar la relación PS/PT en muestras de leche. Este estudio ha incrementado la información disponible sobre el intervalo de la relación PS/PT en leches, en su mayor parte españolas, sometidas a diferentes tratamientos térmicos, aunque para establecer este intervalo de manera más definitiva serían necesarios más estudios tanto con un mayor número de muestras de leche como con muestras de diferentes países.

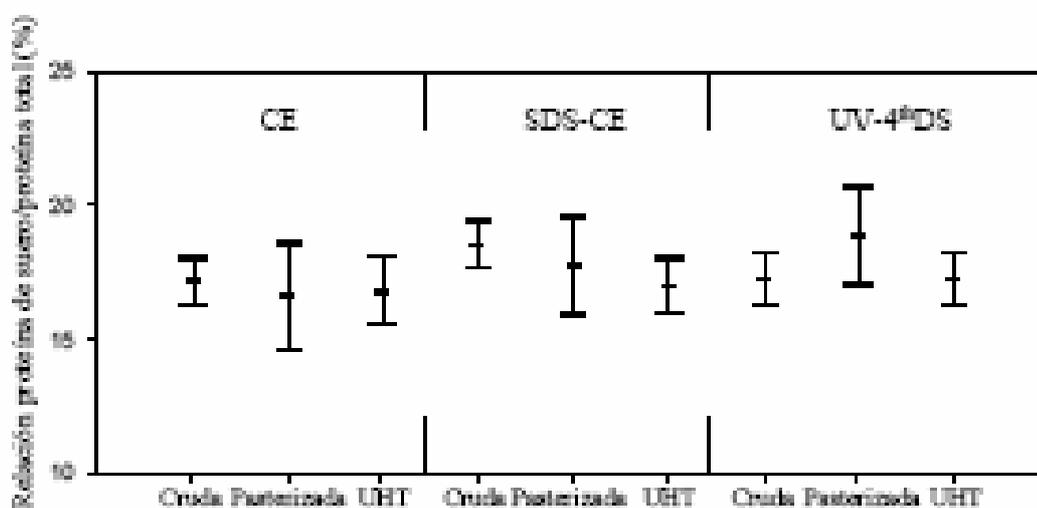


Figura 1.14 Análisis ANOVA bidimensional de la determinación de la relación PS/PT en leches crudas (n=21), leches pasterizadas enteras y desnatadas (n=5) y leches UHT enteras y desnatadas (n=18) mediante CE, SDS-CE y UV 4th DS. Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95% de las medias.

CAPÍTULO 2. DETECCIÓN DE LA ADICIÓN DE CASEÍNA Y CASEINATOS EN QUESOS

2.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1 Antecedentes

Como ya se ha comentado en el Capítulo 1, las caseínas son un grupo específico de las proteínas de la leche que se caracterizan por precipitar en la leche a pH 4.6. La fabricación industrial de caseína conlleva, por tanto, una precipitación por acidificación (caseína isoelectrica) o tratamiento con cuajo (caseína de cuajo) de la leche desnatada, separación del suero y lavado. El producto resultante es sometido a diversas operaciones de secado (Varnam y Sutherland, 1994) (Figura 2.1). Los caseinatos se producen disolviendo la caseína isoelectrica en un álcali para producir los derivados solubles en agua (Figura 2.2), los caseinatos sódicos, potásicos, cálcicos o amónicos (Lynch y col., 1997).

La caseína y los caseinatos son aprovechados por la industria química en la fabricación de aglutinantes, colas y colorantes, como excipiente en la industria del jabón y del papel, y como sustancia base del cuerno artificial, que se utiliza para la fabricación de botones, peines o imitaciones de mármol y ámbar. La cada vez más amplia utilización de los plásticos hace que la caseína vaya perdiendo importancia en la industria química (Spreer, 1991). Esto ha provocado un incremento de la utilización de los excedentes de caseínas y caseinatos en otros productos. Los caseinatos se usan frecuentemente como ingredientes alimentarios por sus adecuadas propiedades funcionales y fisico-químicas, como su solubilidad, su capacidad de formar geles y de atrapar agua, su viscosidad, su capacidad de disminuir la tensión superficial y sus propiedades espumantes y emulsificantes. Por ello, es corriente su uso en pastelería, en bebidas, en panadería, en la fabricación de pasta, en confitería, en la industria cárnica, en preparaciones dietéticas y en productos lácteos (Mulvihill, 1992).

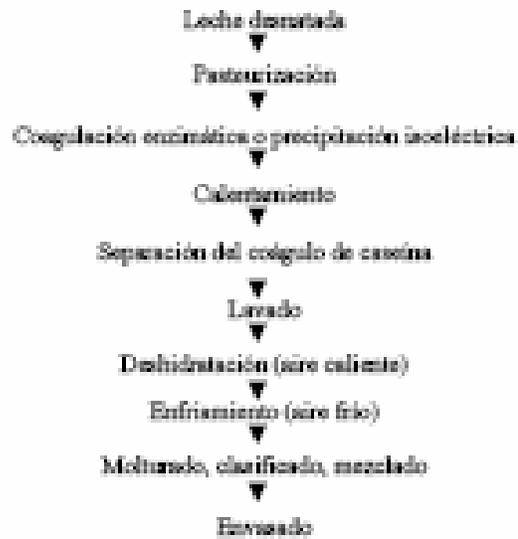


Figura 2.1 Obtención industrial de los diversos tipos de caseínas (Varnam y Sutherland, 1994)



Figura 2.2. Obtención industrial de los caseinatos (Varnam y Sutherland, 1994)

2.1.2 Adición de caseína y caseinatos en diferentes tipos de queso

Los quesos son uno de los productos alimentarios más susceptibles de sufrir adiciones de caseína o caseinatos ya que es un medio de ajustar el contenido proteico, facilitando, así, el proceso de producción. Aunque existen diferentes procesos tecnológicos de elaboración dependiendo del tipo de queso, desde los frescos como el Quarg, los semi-blandos como el de Mahón, los duros como el Manchego hasta los muy duros como el Parmesano, en todos ellos hay un paso de coagulación de la leche similar al de la producción de caseínas. En el caso de una coagulación por acidificación, en lugar de un descenso brusco del pH por adición de un ácido mineral u orgánico, la leche se acidifica progresivamente por fermentación láctica, lo que determina la formación de un coágulo liso, homogéneo, que ocupa totalmente el volumen inicial de la leche. En el caso de utilización del cuajo, mezcla de quimosina y pepsina excretada en el estómago de los rumiantes lactantes, la proteína κ -CN es hidrolizada por la enzima quimosina para formar para- κ -CN (fragmento κ -CN 1-105) y CMP (fragmento κ -CN 106-169), dando lugar a una desestabilización de las micelas seguida de una agregación de las caseínas, provocando la formación de la cuajada (Brule y Lenoir, 1990).

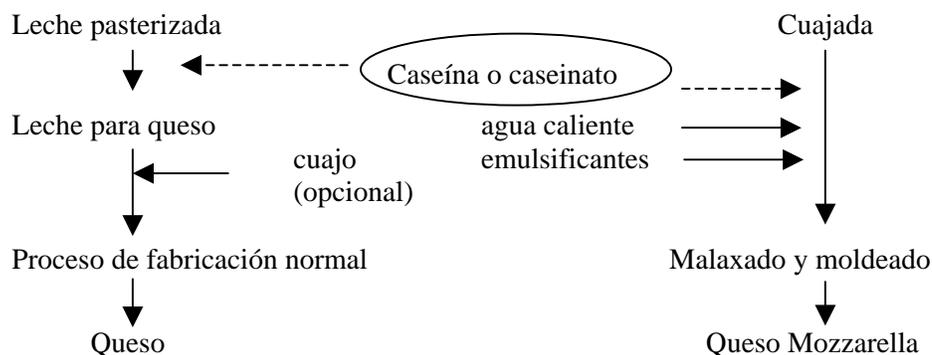


Figura 2.3. Representación esquemática del posible empleo de caseína y caseinatos en la elaboración de la mayoría de los quesos y en quesos Mozzarella

La principal razón para la adición de caseína o caseinato al queso es económica. Sin embargo, pueden aducirse razones tecnológicas para la adición de pequeñas cantidades, como es la estandarización en el contenido en proteína. Pero existen otras alternativas tecnológicas para realizarlo, como es la UF. En el caso del queso fundido la adición de caseína o caseinatos permite mejorar la consistencia del producto final.

El Reglamento 804/68 del Consejo de la Comunidad Europea estableció la organización común de mercados en el sector de la leche y de los productos lácteos (DOCE, 1968). La modificación realizada en 1989 indicó en su artículo 11 la concesión de una ayuda a la leche desnatada producida en la Unión Europea y transformada para fabricar caseína y caseinatos. Dicha ayuda debía garantizar a los productores comunitarios interesados una situación de mercado idéntica a la de los productores no comunitarios de caseínas y caseinatos cuyos productos, debido a la consolidación de los derechos de aduana, estaban disponibles en el mercado comunitario al precio del mercado mundial (DOCE, 1989). El Consejo adoptó en 1990 un Reglamento (2204/90), posteriormente desarrollado con el Reglamento 2742/90, que prohíbe la adición de caseína/ caseinato a quesos y fija como porcentaje máximo de incorporación a quesos fundidos un 5% en peso de producto. El productor de queso fundido debe declarar la cantidad de caseína/ caseinato añadido y hacer una corrección del reembolso correspondiente por exportación.

Los tipos de queso más susceptibles de tener adición de caseínas o caseinatos son, además de los quesos fundidos, en los que una adición por encima del 5% en peso de queso supone una adulteración, los quesos Quarg y los quesos Mozzarella.

2.1.2.1 Queso Quarg

El queso Quarg se clasifica dentro de los quesos en los que la leche, nata o suero son coagulados por acidificación o una combinación de ácido y calor, y están listos para el consumo una vez completadas las operaciones de elaboración. Estos quesos tienen diferentes denominaciones según los países en los que se fabrican: Cottage cheese, Fromage frais, Tvorog o Quarg, siendo este último el más consumido en Europa occidental (Guinee y col, 1993). El queso Quarg es un queso fresco blando, homogéneo, de ligero sabor ácido. Normalmente se fabrica a partir de leche desnatada pasteurizada que se enfría a 20-23° C y a la que se añade un cultivo iniciador (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y/o *Lc. lactis* subsp. *cremoris*), aunque existen otros procedimientos (Capítulo 3). La leche se mantiene durante 14-18 horas hasta que se alcanza el pH deseado, que se sitúa entre 4.6 y 4.8. En ocasiones se añade una pequeña cantidad de cuajo (35-70 unidades de quimosina por litro) al cabo de 1-2 horas de la adición del cultivo iniciador. El cuajo, debido a la hidrólisis parcial de la κ -CN, permite obtener una cuajada más firme. Su adición minimiza las pérdidas de caseína por separación del suero e impide alcanzar una acidez demasiado elevada (en ausencia de cuajo se requiere un pH menor para obtener el mismo grado de firmeza en la cuajada). La leche fermentada ya coagulada se agita suavemente (100-200 rpm) hasta que se obtiene una consistencia ligeramente fluida y se bombea a una centrífuga donde se separa en cuajada (queso Quarg) y suero (Figura 2.4). Este queso puede conservarse hasta 4 semanas a temperatura menor de 8° C. Es un queso de gran importancia comercial. A título de ejemplo, en Alemania el consumo anual per cápita alcanza los 8 kg, representando su producción en este país un 45% del total de queso (Guinee y col., 1993). Hay que tener en cuenta su versatilidad, ya que puede utilizarse para salsas bajas en calorías, ensaladas, pasteles o postres (Mara y Kelly, 1998).

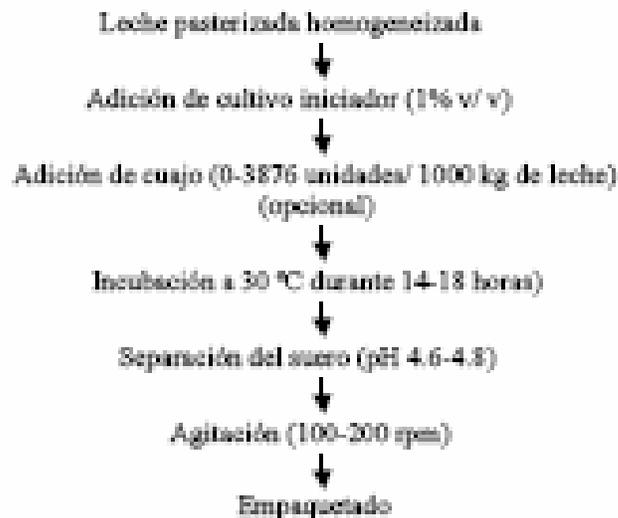


Figura 2.4 Diagrama de flujo de la producción tradicional del queso Quarg (Sohal y col., 1988)

2.1.2.2 Queso Mozzarella

El queso Mozzarella es un queso semi-duro que se clasifica dentro de los del tipo pasta-filata o pasta ahilada. Se fabrica con leche de vaca pasteurizada (aunque tradicionalmente con leche de búfala) tratada con cuajo (Figura 2.5). La cuajada obtenida se calienta en agua para someterla a un proceso de estiramiento y malaxado a 64-68° C, siendo el pH óptimo de desuerado 5.2-5.6 (Fox y Guinee, 1987). Sus propiedades reológicas son probablemente las más importantes. Un queso Mozzarella de buena calidad se caracteriza por estructura fibrosa y su facilidad para el estiramiento y la fusión, que lo hacen apto para su uso en pizza y otros platos. Se consume fresco y su nivel de proteolisis es pequeño, probablemente debido a la inactivación térmica del cuajo durante el proceso de elaboración, y al pH de la cuajada, que reduce en parte la acción de la plasmina. El consumo de queso Mozzarella está extendiéndose enormemente, y debido a que representa el ingrediente más costoso de los platos para

los que se usa, la atención se ha centrado en el desarrollo de sustitutos. La formulación de queso Mozzarella de imitación permite a los fabricantes la posibilidad de manipular los ingredientes con fines nutricionales, texturales o económicos. En algunos casos se sustituyen los sólidos y la grasa lácteas por caseinatos y aceites vegetales, y en otros, se utilizan almidones modificados, aislados de soja o gelatina para reemplazar a los caseinatos (Kiely y col, 1991). De este tipo de queso Mozzarella de imitación se produjeron en Estados Unidos en 1998 más de un millón de toneladas (Tunick y col., 2000).

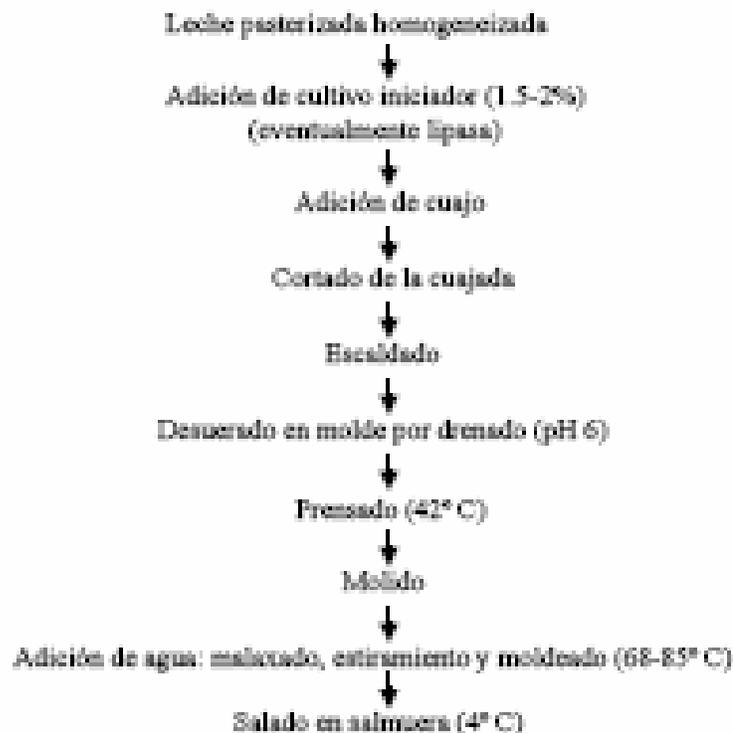


Figura 2.5 Diagrama de flujo de la fabricación de queso Mozzarella por un procedimiento tradicional (Kindstedt, 1993).

2.1.2.3 Queso fundido

A finales del siglo pasado y principios de este, se hicieron esfuerzos importantes, especialmente por alemanes y suizos, para exportar queso a países cálidos, ya que el frío artificial no existía de forma organizada. El envasado de quesos de pasta blanda (Camembert) o quesos tipo holandés en pequeñas cajas metálicas sometiéndolos a un tratamiento térmico próximo a la pasteurización, dio lugar a resultados relativamente satisfactorios. El queso afinado, poco mineralizado, soportaba relativamente bien este tratamiento térmico. Sin embargo, en los quesos de pasta prensada cocida, tales como el Gruyère o Emmental, el tratamiento afectaba a la estructura, transformándolos en una masa heterogénea de paracaseinato cálcico, materia grasa y solución acuosa.

En 1911, la firma suiza Gerber encontró una solución. El queso de pasta dura, descortezado, era triturado y calentado hasta unos 80° C, con agitación continua y una solución de citrato sódico. Posiblemente la "fondue", elaborada con vino blanco, que contiene tartratos, había dado la idea de emplear una sal sódica de un ácido pluribásico. Y el citrato tenía la ventaja de formar parte de los componentes naturales de la leche. Se constató que el queso formaba un "sol" que podía ser envasado en caliente en una hoja metálica y por enfriamiento daba lugar a un "gel" de consumo agradable, sin corteza, que recordaba el gusto del queso original, y si la acidez estaba bien regulada, de buena conservación (Patart, 1989).

El queso fundido es un producto muy importante de la industria láctea. Actualmente se produce mezclando diversos quesos (principalmente Cheddar, Emmental, Gouda), sales fundentes, sal y colorantes de quesería, pero además pueden contener leche, suero, mantequilla, nata, albúmina, gomas, caseína, caseinatos y grasas vegetales que incrementan el valor dietético o mejoran sus propiedades sensoriales o texturales (Figura 2.6) (Aimutis, 1995). Se agita la mezcla a una temperatura que oscila entre 75 y 140° C y se envasan. Los quesos fundidos resistentes al corte se fabrican con

un tratamiento moderado en la caldera de fusión, agitación lenta y predominio de quesos jóvenes en su composición. En cambio, los quesos fundidos para untar, denominados de pasta corta, requieren un tratamiento intenso de fusión, agitación larga y adición de quesos semicurados o curados, de pastas profundidas y de agua. Cuando se añaden productos de carnicería y pescadería, se denominan quesos fundidos aromatizados o preparados de queso fundido (Spreer, 1991).

Su consumo está aumentando en todo el mundo debido a que es un producto versátil, de larga conservación, en envases individuales es apropiado para la alimentación colectiva, y ofrece la posibilidad de aprovechar para la alimentación humana una parte de los quesos al cuajo no aptos para ser comercializados pero aún organolépticamente aceptables (Caric y Kaláb, 1993). Desde 1990 el rendimiento de la industria del queso fundido ha crecido un 2.15% por año frente al 1.74% por año para el queso natural (Anónimo, 1997). En la Unión Europea, en el año 1998, se produjeron 520 millones de toneladas de queso fundido, es decir, un 7.3% de la producción total de queso (Rothbauer, 1999).



Figura 2.6 Ingredientes que pueden usarse en la fabricación de quesos fundidos (Caric y Kaláb, 1993)

2.1.3 Métodos de análisis para la detección de caseína/caseinatos en quesos

En el marco del proyecto SMT CT97-2208 de la Unión Europea (“Determination of added casein/caseinate in cheese and processed cheeses”) se ha realizado una revisión bibliográfica sobre las posibilidades teóricas de diferentes métodos analíticos de determinación de caseína/caseinato en quesos. De lo expuesto en esta revisión se deduce que cuando se empezó a realizar esta tesis no había ningún método publicado que permitiera la detección de caseína o caseinato en quesos.

La determinación de caseínas o caseinatos añadidos al queso es un problema complejo desde el punto de vista analítico, porque los productos añadidos son químicamente iguales a la caseína presente en el queso. En la obtención de las caseínas o caseinatos la precipitación puede ser por acidificación, o mediante cuajo, lo que da lugar a una distinta composición proteica del producto final. En un caso, al no haber hidrólisis por quimosina, hay presencia κ -CN intacta y en el otro caso, la actuación del cuajo provoca la formación de para- κ -CN. Hay que tener en cuenta, además, la variedad de procesos industriales existentes para la obtención de caseínas y caseinatos.

Por otra parte, las distintas tecnologías que pueden emplearse en la elaboración de los quesos, que afectan al tipo de coagulación, la temperatura y pH empleados, los procedimientos de corte de la cuajada o el tratamiento a que ésta se somete, aumentan la complejidad del problema. También la etapa de la elaboración en la que se adicionen estas caseínas o caseinatos influye en la composición final de los quesos. Por todo ello, para poder resolver los diferentes casos de adulteración posibles en cualquier tipo de queso es necesario el uso de estrategias analíticas complementarias. El método analítico a aplicar no puede estar basado en la caseína *per se* sino que debe abordar la detección de un compuesto marcador generado en las operaciones de calentamiento y secado en la obtención de las caseínas o caseinatos, o la detección de un cambio cuantitativo en alguna de las proteínas presentes en el queso.

2.1.3.1 Métodos basados en la detección de un compuesto marcador

Una estrategia analítica a emplear es la determinación de un compuesto marcador que se encuentre sólo en la caseína o caseinatos producidos industrialmente.

El proceso industrial de obtención de caseína o caseinatos, independientemente de que se trate de precipitación isoelectrica (caseína isoelectrica) seguida en su caso de neutralización alcalina (caseinatos) o de coagulación enzimática (caseína de cuajo), incluye tratamientos térmicos de desuerado y lavado del material proteico a pH neutro o alcalino. Esto hace que la caseína esté expuesta a un calentamiento, alcalinización y secado en condiciones oxidantes y en ausencia de otros componentes de la leche. En estas condiciones, pueden aparecer ciertos compuestos producidos por varios mecanismos de reacción que pueden considerarse marcadores de caseína o caseinato comerciales en quesos naturales (Resmini y Pellegrino, 1998).

De acuerdo con la bibliografía, hay tres mecanismos de reacción que llevan a la formación de estas formas combinadas de proteínas:

2.1.3.2 Racemización de aminoácidos

La racemización de los residuos de aminoácidos de la caseína tiene lugar a valores altos de pH incluso en condiciones de calentamiento moderado (por ejemplo 65° C durante 3 h). Los aminoácidos Asp, Phe, Ser y Thr son los más sensibles. Aunque hoy en día hay métodos robustos para la separación de enantiómeros mediante HPLC (Ekborg-Ott. y Armstrong, 1997), hay dos grandes inconvenientes para emplear los D-aminoácidos como compuestos marcadores. En primer lugar, los microorganismos pueden producir D-aminoácidos libres en los productos fermentados, lo que haría necesaria la extracción de la fracción proteica del queso antes de su hidrólisis. En segundo lugar, habría que determinar selectivamente los D-aminoácidos

presentes inicialmente en la muestra porque durante una hidrólisis ácida puede tener lugar una racemización parcial de los aminoácidos.

2.1.3.2.1 Formación de isopéptidos

La reacción de condensación inducida por el calor entre los residuos lisil, glutamil o aspartil da lugar a la formación de isopéptidos ϵ -(γ -glutamil)-lisina o ϵ -(β -aspartil)-lisina respectivamente. Estos enlaces estables, que ocurren a nivel tanto intramolecular como intermolecular, llevan a una progresiva pérdida de solubilidad y digestibilidad de la proteína y a la formación de agregados de elevada masa molecular. Los escasos datos disponibles sobre los isopéptidos en alimentos sugieren que se pueden formar en las proteínas con el tratamiento térmico elevado. Pero como la determinación analítica requiere que estén separados de las proteínas por hidrólisis enzimática, es difícil una recuperación suficiente si el material proteico se encuentra muy agregado.

2.1.3.2.2 Reacción de β -eliminación

Los residuos de fosfoserina, serina o cisteína dan lugar a la formación del residuo dehidroalanina (DHA) mediante una reacción de β -eliminación. Este residuo puede combinarse con las cadenas laterales de la lisina, ornitina, cisteína o histidina dando lugar a la formación de las correspondientes moléculas entrecruzadas de lisinoalanina (LAL), ornitinoalanina (OAL), lantionina (LAT) e histidinoalanina (HAL) (Figura 2.7). Estos entrecruzamientos dan lugar a una disminución en la digestibilidad de las proteínas y a la pérdida del aminoácido esencial lisina. Además, son conocidos los potenciales efectos tóxicos, pues la LAL puede inducir lesiones renales que reciben el nombre de nefrocitomegalia en ratas y ratones, y se ha demostrado que es un potente inhibidor de metaloenzimas (Henle y col., 1993). En los

productos lácteos calentados sólo se han encontrado cantidades grandes de las moléculas LAL e HAL, siendo mucho mayor la concentración de LAL en el caseinato sódico (Fritsch y Klostermeyer, 1981*a*). Pellegrino y col. (1996) han encontrado entre 128 y 5390 ppm en seis muestras de caseinato analizadas, lo que representa entre 20 y 5000 veces más de los valores encontrados en leche tratada térmicamente.

2.1.3.2.3 Determinación de LAL mediante métodos cromatográficos

Para la determinación de LAL se han desarrollado varios procedimientos analíticos basados en la cromatografía de gases (Bueser y Erbersdobler, 1984) y la cromatografía líquida de intercambio iónico (Fritsch y Klostermeyer, 1981*b*) tanto en aislados de proteínas como en matrices complejas tales como leche, nata, bebidas de chocolate o productos dietéticos sometidos a diferentes tratamientos térmicos. Pellegrino y col. (1996) han propuesto un método capaz de determinar la presencia de pequeñas cantidades de LAL en queso Mozzarella de imitación, con el objetivo de diferenciarlo del queso Mozzarella genuino. El método incluye una derivatización precolumna del hidrolizado ácido de la muestra con 9-fluorenilmetilcloroformiato (FMOC), un paso de extracción en fase sólida para eliminar el exceso de reactivo y una separación de los aductos mediante cromatografía líquida en fase inversa (RP-HPLC) con detección de fluorescencia. Con este método ha sido posible detectar que en el queso Mozzarella genuino pueden formarse hasta 2 ppm de LAL, mientras que las cantidades en los quesos de imitación son muy superiores (entre 15 y 421 ppm). No ha sido comprobado si la determinación de LAL mediante este método permite detectar la adición de caseína o caseinatos a otros tipos de quesos, pero sería muy interesante explorar esta posibilidad.

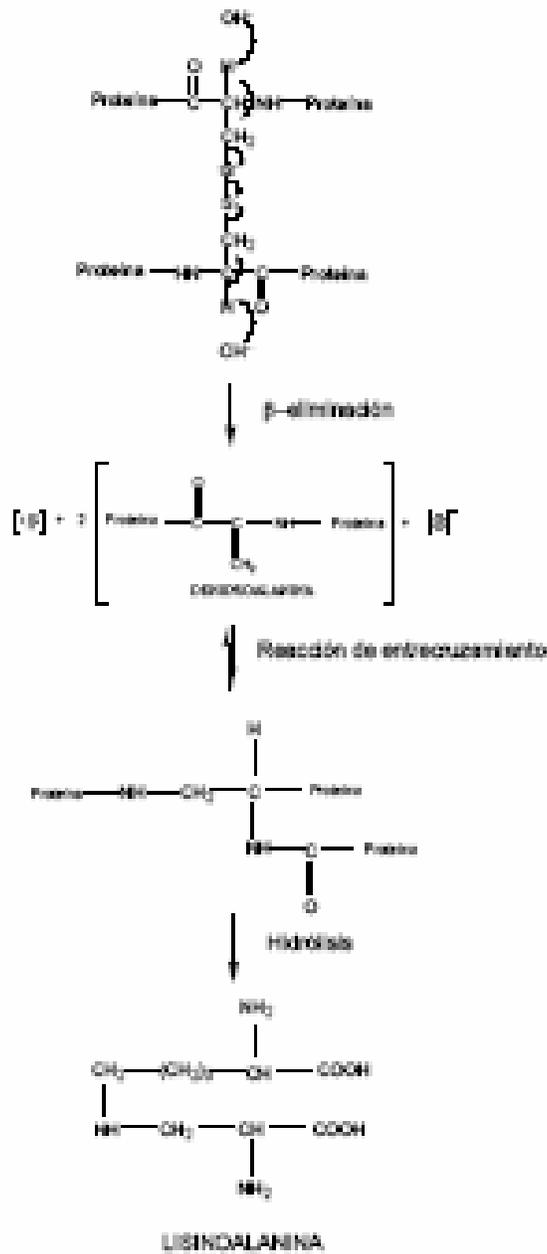


Figura 2.7 Mecanismo de formación de la dehidroalanina y transformación en lisinoalanina (Friedman, 1999)

A priori, el método tiene dos limitaciones. En primer lugar, las condiciones de calentamiento de algunas tecnologías queseras, como el queso fundido, favorecen la formación de LAL, por lo que en el caso de estos quesos no sería aplicable. En segundo lugar, los niveles de las moléculas marcadoras varían entre las caseínas y los caseinatos de acuerdo con las condiciones de producción, lo que implica que las cantidades encontradas en el queso no pueden ser cuantificadas con precisión si no se dispone de la caseína o caseinato añadido.

2.1.3.3 Métodos basados en la detección de cambios cuantitativos en las proteínas

2.1.3.3.1 Determinación de la relación proteína de suero/caseína

Cuando se añaden caseína o caseinato a la leche destinada a fabricar el queso, se altera la relación proteína de suero/ caseína del queso. Como se ha indicado en el Capítulo 1, mediante SDS-PAGE se pueden determinar las diferentes fracciones proteicas (Basch y col., 1985; Meisel y Carstens, 1989) y establecer la relación natural de proteína de PS/PT en leche o productos lácteos. Con el método oficial alemán de determinación de la relación proteína de suero/caseína, que utiliza SDS-PAGE (DIN, 1996), se obtienen valores de 1.4 g de proteínas de suero por 100 g de proteína total en leche en polvo y queso fresco con una confianza del 95%. Un inconveniente del método es la degradación de las caseínas durante la maduración del queso. En este caso, la determinación de la caseína total mediante SDS-PAGE se ve comprometida, puesto que la fracción de proteínas de suero es sobreestimada por superposición de productos de la proteólisis de las caseínas (Lechner, 1990). Además, durante la tinción, los péptidos de bajo peso molecular se pierden de los geles de electroforesis. Así, la determinación de la relación proteínas de suero/ caseínas por SDS-PAGE sólo debería realizarse en quesos frescos como el Quarg o en quesos tipo Mozzarella, que sufren

una proteólisis mínima. Los métodos electroforéticos con mayor eficacia de separación, como el isoelectroenfoque o la electroforesis capilar proporcionarían mejores resultados en el caso de existir proteólisis, aunque la precisión podría verse comprometida por el mayor número de fracciones proteicas a determinar (Krause, 1998).

2.1.3.3.2 Determinación de κ -CN intacta

Puesto que en la fabricación de la mayoría de los quesos la leche se trata con cuajo, originándose para- κ -CN (Dalglish, 1993), la presencia de κ -CN intacta en esos quesos puede ser un indicador muy adecuado de la adición de caseína isoelectrica o caseinato. Un inconveniente de esta determinación es que sólo es válida en los casos en los que la caseína isoelectrica o caseinato hayan sido añadidos después de la coagulación de la leche por el cuajo.

En ocasiones se emplea la coagulación ácida para la elaboración de queso. En este caso con la adición de caseína isoelectrica o caseinato se podría detectar un aumento en la proporción de κ -CN (Figura 2.8). Para cuantificar la κ -CN procedente de esta adición sería necesario disponer de un queso control al que no se le hubiera adicionado caseína para conocer la cantidad inicial de κ -CN, o bien realizar el análisis de un gran número de muestras, con el fin de conocer el contenido medio en κ -CN que contienen los quesos de coagulación ácida.

Métodos cromatográficos

La RP-HPLC es el modo de HPLC más empleado en la actualidad. Este hecho se debe a la comercialización de rellenos específicos para esta modalidad, que son estables, reproducibles, de pequeño tamaño de partícula, y que permiten alcanzar una elevada velocidad de transferencia de materia, lo que da lugar a columnas con elevada

eficacia (Dabrio, 2000). El método propuesto por Visser y col. (1991) permite la separación de las variantes A y B de la κ -CN en muestras de leche y caseína. Por tanto, se podrían aplicar métodos de HPLC para determinar la κ -CN intacta presente en los quesos.

Métodos electroforéticos

Los métodos electroforéticos son herramientas eficaces en la determinación de las proteínas de suero (Cifuentes y col., 1993, Recio y Olieman, 1996) y las caseínas (Zeece y col., 1989; Recio y col., 1997*b*). El isoelectroenfoque en gradiente de pH inmovilizado (IPG-IEF) ha sido propuesto por Krause (1998) para la determinación de caseína o caseinato añadido a queso. El IPG-IEF es una técnica que proporciona una buena resolución, debido a que permite separar proteínas con pI muy próximos. Cuando se utilizan geles comerciales, es posible obtener separaciones reproducibles, muy útiles para los análisis de rutina. Además, si se utiliza un procesador de imágenes con el software apropiado, la integración de las bandas se realiza automáticamente.

Aunque en los últimos años se han desarrollado diferentes métodos de electroforesis capilar para evaluar la calidad de los productos lácteos (Recio y col. 1997*a*) no se han aplicado a la determinación de caseínas o caseinatos en quesos.

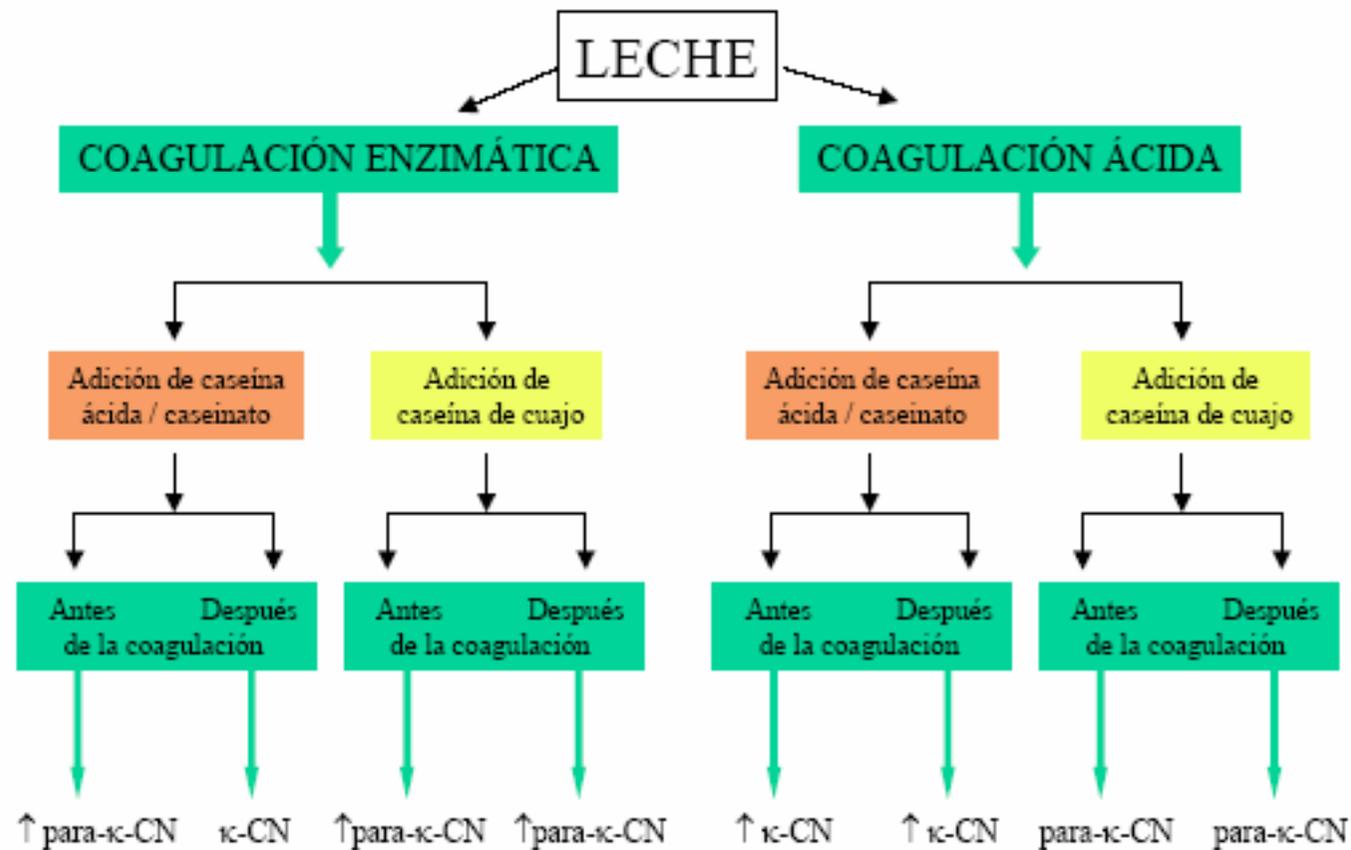


Figura 2.8 Representación esquemática de las proteínas o productos de degradación que aparecen o cuya proporción aumenta con la adición de caseína/caseinato a los distintos tipos de queso en las distintas etapas de su elaboración

2.1.3.3.3 Determinación de para- κ -CN

La cuantificación de para- κ -CN en quesos elaborados con cuajo podría ser útil tanto en el caso de adición de caseína isoeléctrica antes de la coagulación de la leche como en el caso de adición de caseína de cuajo en cualquier etapa de la elaboración del queso (Figura 2.8). Sin embargo, para la determinación de la para- κ -CN procedente de la adición sería necesario disponer de un queso control, sin adición de caseína, para conocer la cantidad inicial de para- κ -CN, o bien conocer el contenido medio en para- κ -CN de los quesos, a través de un gran número de análisis.

En principio, las técnicas analíticas aplicables a la determinación de para- κ -CN serían las mismas que se describen para la κ -CN, aunque no hay referencias bibliográficas en las que se haya realizado la cuantificación de la para- κ -CN para la determinación de la adición de caseína/ caseinato en quesos. Este producto de degradación ha sido cuantificado mediante isoelectroenfoque para detectar leche de diferentes especies en mezclas (Addeo y col., 1986).

2.1.3.4 Métodos de resonancia magnética nuclear (NMR)

Los métodos de NMR permiten considerar tres posibles metodologías (Belloque y Ramos, 1998):

2.1.3.4.1 “Stable natural isotopic fractionation” (SNIF-NMR)

Esta técnica, basada en las relaciones isotópicas $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y otras, ha sido aplicada en estudios de autenticidad puesto que con ella es posible distinguir compuestos de idéntica fórmula química y estructura pero de diferente origen (Martin y col., 1996). Aunque no hay precedentes de su aplicación a muestras de proteína o a productos de origen animal, la determinación más adecuada por NMR, debido a su

exactitud, sería la de la relación isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$. Sin embargo, el queso es un producto de gran variabilidad ya que es de origen animal y puede ser elaborado con leches de diferentes especies, diferentes lugares y, en el caso de los quesos fundidos, a partir de diferentes quesos. Por ello, esta variabilidad plantearía dificultades para encontrar datos isotópicos que puedan utilizarse como referencia. Además, habría que analizar gran cantidad de muestras.

2.1.3.4.2 Determinación de tiempos de relajación T_2

El tiempo de relajación T_2 es un parámetro dependiente del tamaño molecular. Los efectos de agregación/ desagregación de las proteínas lácteas causados por el calor u otras condiciones pueden diferenciarse mediante medidas de T_2 (Lambelet y col., 1992; Mariette y col., 1993). La aplicación de estas medidas a la detección de caseinatos estaría basada en el diferente estado de agregación de las caseínas en el queso “natural” y en los caseinatos.

2.1.3.4.3 Espectros NMR monodimensionales (1D)

En la fabricación de caseinatos, los cambios que ocurren durante el calentamiento o secado pueden ser de naturaleza química o estructural, y producir variaciones en la intensidad de la señal o cambios en el desplazamiento químico de algunas resonancias. La posibilidad de que alguna de estas señales sea diferente en los caseinatos y en los quesos podría ser explotada para la determinación de caseinato. La utilización de espectros ^1H -NMR permite análisis cortos, pero debido al gran número de protones cuyas resonancias se observan en el espectro, la interpretación en muestras de queso es muy compleja. Otra posibilidad más prometedora sería el uso del ^{31}P -NMR, puesto que sólo un pequeño número de compuestos de los productos lácteos contienen P y, por lo tanto, se obtienen espectros con pocas señales. En los espectros

^{31}P -NMR se han identificado las resonancias de pequeñas moléculas que se encuentran en el suero, así como de las P-Ser de las caseínas (Wahlgren y col., 1986).

Debido a la gran cantidad de tiempo que supondría el análisis isotópico y debido a que estudios preliminares sobre los tiempos de relajación y sobre “marcadores” fosforilados no dieron buenos resultados, se estimó que sería más eficaz la utilización de otras técnicas para la determinación de caseínas/caseinato en quesos.

2.2 OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

Para llevar a cabo el objetivo parcial **“Evaluación y optimización de los métodos analíticos disponibles con el fin de detectar adiciones de caseína/caseinato en distintos tipos de queso”** se ha seguido el siguiente plan de trabajo:

-Optimización de un método de CE para la detección de caseína/caseinato en muestras de quesos fundidos, Quarg y Mozzarella.

-Aplicación de un método de IPG-IEF para la detección de caseína/caseinato en muestras de quesos fundidos, Quarg y Mozzarella de composición conocida y comparación con la CE.

-Aplicación y evaluación de un método cromatográfico de determinación de lisinoalanina con el fin de detectar la adición de caseinato sódico en quesos Mozzarella de composición conocida.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Muestras

2.3.1.1 Muestras de referencia

Para realizar la cuantificación de la κ -CN bovina mediante CE se utilizó la κ -CN cedida por María Manso y obtenida en el laboratorio a partir de caseína de leche desnatada mediante el método de Zittle y Custer (1963).

Se prepararon unas mezclas de caseína isoelectrica cuyo contenido en proteína total era 86% y caseína de cuajo con un contenido en proteína total 81% en el laboratorio, en proporciones conocidas (15%, 25%, 35%, 45% y 55% de caseína isoelectrica en caseína total). Estas mezclas se disolvieron en agua al 10%, se ajustó el pH a 9.0 con NaOH 2M, se agitaron vigorosamente durante 30 min y se liofilizaron.

Para la determinación de LAL se utilizó una disolución 0.05 mM de LAL (Bachem, Bubendorf, Suiza).

2.3.1.2 Muestras de queso y otros productos lácteos

Las muestras de queso de composición conocida, así como algunas muestras de caseína isoelectrica, caseína de cuajo y caseinato sódico utilizadas, fueron proporcionadas a través del proyecto SMT 4-CT97-2208 de la Unión Europea.

2.3.1.2.1 Productos lácteos

Se obtuvieron seis caseínas isoelectricas a partir de distintas muestras de leche cruda. Para ello, las leches se acidificaron a pH 4.6 con HCl 2N y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación, se centrifugaron a 4000 g

durante 20 min a 5° C. El sobrenadante se desechó. El precipitado se lavó tres veces con tampón acetato sódico 1M de pH 4.6. Con el objeto de retirar totalmente la grasa, se lavó 2 veces más con una mezcla de diclorometano / tampón acetato sódico (1:1, v/v). El precipitado de caseínas se liofilizó (Krause y col., 1982).

Se obtuvieron seis caseínas de cuajo a partir de distintas muestras de leche cruda. 100 ml de leche se incubaron con 8 ml de una disolución al 0.3% de cuajo comercial (85% de quimosina y 15% de pepsina bovina; Chr. Hansen Lacta, Copenhague, Dinamarca) durante 30 min a 37° C. A las caseínas obtenidas se les aplicó el procedimiento de centrifugación, lavado y liofilización descrito anteriormente.

Se utilizaron tres muestras de caseinato sódico, dos muestras de caseinato cálcico y cuatro muestras de leche desnatada en polvo comercial.

2.3.1.2.2 Quesos de composición conocida

Los quesos Quarg (4) y los quesos Mozzarella (13) fueron elaborados en el Istituto Sperimentale Lattiero-Caseario de Lodi, Italia. Los quesos fundidos (17) fueron elaborados por un fabricante asociado al Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel Weihenstephan de Freising, Alemania.

Algunos de estos quesos contenían caseína ácida, caseína de cuajo y caseinato sódico en diferentes proporciones, que podían haber sido añadidos antes o después de la coagulación de la leche. Algunas de estas muestras también contenían leche desnatada en polvo y suero en polvo. Varios de los productos añadidos fueron suministrados con las muestras de queso.

En la Tabla 2.1 se recogen los porcentajes máximos y mínimos de los productos que podían encontrarse en los quesos fundidos.

Tabla 2.1 Composición de los quesos fundidos

Compuesto	Contenido (%)
Mantequilla	3-28
Queso Chester maduro	20-34
Queso Chester joven	15-35
Caseína ácida	0-10
Caseína de cuajo	0-10
Caseinato sódico	0-5
Leche desnatada en polvo	0-1.2
Suero en polvo	0-1.5
Polifosfato	2-2.5
Citrato trisódico	0.2-0.5
Cloruro sódico	0.15
Agua	26-47

2.3.1.2.3 Quesos comerciales

Se analizaron cuatro muestras de quesos Quarg, seis muestras de quesos Mozzarella, doce muestras de queso fundido en lonchas y ocho muestras de queso fundido en porciones pertenecientes a veintitrés marcas comerciales del mercado español. De las muestras de queso fundido en lonchas, dos contenían ingredientes no lácteos: uno de ellos contenía jamón y otro cebollino.

2.3.2 Métodos de análisis

2.3.2.1 Determinación de proteína mediante el método Kjeldahl

La determinación de proteína de los quesos y sus hidrolizados, de las caseínas, de los caseinatos, de las leches en polvo y de la κ -CN fue realizada mediante el método Kjeldahl como se describe en el apartado 1.1.4.1.

2.3.2.2 Determinación de κ -CN intacta y para- κ -CN mediante CE

El procedimiento empleado es el descrito en el Capítulo 1 (apartado 1.3.2.6).

2.3.2.2.1 Preparación de la muestra

En los quesos se obtuvieron las caseínas mezclando 5g de queso con 8ml de agua, homogeneizando en un equipo Ultra-Turrax (Ika-Werk, Staufen, Alemania), ajustando con HCl 2M a pH 4.6 y dejando en reposo 2 horas. Se centrifugó, lavó y liofilizó el precipitado siguiendo el procedimiento que se describe en el apartado 2.3.1.2.1 para la obtención de las caseínas. Se disolvieron 18 mg de caseína liofilizada en 1 ml de tampón de la muestra diluido en agua (1.5:1, v/v). El tampón de la muestra fue el descrito en el apartado 1.3.2.6.1. Los caseinatos y las mezclas liofilizadas de caseína de cuajo y caseína isoeléctrica se trataron con el tampón de la muestra de la misma manera que las caseínas.

Las leches en polvo fueron reconstituidas al 10% y 300 μ l fueron mezclados con 700 μ l de tampón de muestra. Además, se prepararon disoluciones de κ -CN de 0.230, 0.460, 0.922, 1.843 y 3.688 mg/ml en tampón de muestra.

2.3.2.2.2 Instrumentación y método

El análisis fue realizado en un equipo Beckman P/ACE MDQ como se describe en el apartado 1.3.2.6.3.

2.3.2.2.3 Cuantificación

Se realizó el análisis de las mezclas de caseína isoelectrica y caseína de cuajo en proporciones 15, 25, 35, 45 y 55% de caseína isoelectrica en caseína total. La medida del porcentaje de área corregida del pico de κ -CN se hizo corresponder con una adición de caseína isoelectrica/caseinato al queso en porcentaje de proteína.

Con la curva de calibrado obtenida se calculó la cantidad de caseína isoelectrica/caseinato añadida. La adición expresada como gramos de proteína/100 gramos de queso (% en peso de queso) se calcula mediante la fórmula:

$$\frac{p \times P}{100}$$

donde:

p = porcentaje de adición de caseína/caseinato obtenido a partir de la curva de calibrado

P = contenido en proteína del queso calculado mediante el método Kjeldahl

Las mezclas de caseína isoelectrica y caseína de cuajo fueron utilizadas para determinar la adición de caseína de cuajo mediante la cuantificación del pico de para- κ -CN, expresando los porcentajes como 45, 55, 65, 75 y 85% de caseína de cuajo en caseína total. La medida del porcentaje de área corregida de para- κ -CN se hizo corresponder con una adición de caseína de cuajo al queso en porcentaje de proteína.

Con la curva de calibrado obtenida se calculó la caseína de cuajo añadida. La adición expresada como gramos de proteína/100 gramos de queso (%) se calculó mediante la fórmula:

$$\frac{p \times P}{100}$$

donde:

p = porcentaje de adición de caseína de cuajo obtenido a partir de la curva de calibrado

P = contenido en proteína del queso calculado mediante el método Kjeldahl

2.3.2.2.4 Límite de detección

Para caracterizar un procedimiento analítico es importante establecer su límite de detección. De la definición de la IUPAC de límite de detección se deduce que es necesario establecer previamente una señal de detección y mediante la curva de calibrado convertir esta señal en una concentración (o cantidad) (Figura 2.9).

Las curvas de calibrado se establecieron mediante el programa Excel 7.0 y las señales y límites de detección mediante el programa Detarchi (Ortiz y Sarabia, 1994). El programa calcula el límite de detección (x_d) y la señal de detección (y_d) con unos valores de probabilidad de falso positivo y falso negativo elegidos previamente. En nuestro caso se consideraron valores de 0.05 para ambas probabilidades.

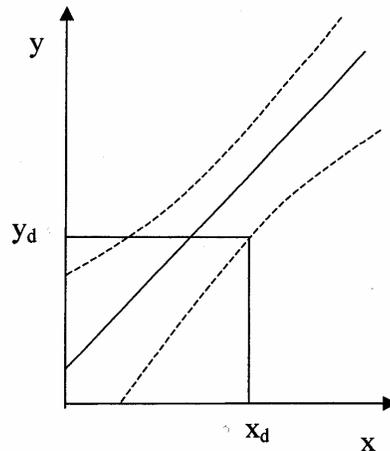


Figura 2.9 Límite de detección x_d asociado a la señal de detección y_d considerando la incertidumbre asociada a la recta de calibrado.

2.3.2.3 Determinación de κ -CN intacta mediante isoelectroenfoque en gradiente de pH inmovilizado (IPG-IEF)

Se utilizó el procedimiento descrito por Krause (1998).

2.3.2.3.1 Preparación de la muestra

Una cantidad de queso equivalente a 40 mg de proteína fue pesada en un tubo de ensayo de 10 ml. Se colocaron 3 ó 4 bolas de vidrio y 5 ml de tampón de la muestra. Este tampón estaba formado por 600 mg de DTT y 2.5 ml de anfolina de pH 4-6.5 en 100 ml de una solución stock de urea/ glicerol, consistente en 48.05% de urea (Merck) y 17.24% de glicerol (87% v/v) (Panreac) en agua. Los tubos bien cerrados se colocaron en un baño de ultrasonidos durante 30 min, hasta lograr una dispersión homogénea. Se tomó 1 ml de la dispersión y se centrifugó durante 15 min a 14000 rpm. La capa de grasa que quedó en la parte superior se retiró con una espátula.

Se disolvieron 40 mg de caseína patrón en 5 ml de tampón de la muestra y se les aplicó el mismo procedimiento que a las muestras de queso. La disolución se diluyó con tampón de muestra a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 mg/ml.

Se disolvieron 40 mg de mezcla de caseína isoelectrónica y caseína de cuajo en 5 ml de tampón de la muestra y se les aplicó el mismo procedimiento que a las muestras de queso.

2.3.2.3.2 Instrumentación y método

El análisis se realizó en un equipo 2117 Multiphor II (LKB, Bromma, Suecia) con un baño termostático 2219 Multitemp II (LKB) y una fuente de alimentación de alto voltaje 2297 Macrodrive 5 (LKB).

Se emplearon los geles para isoelectroenfoque Immobiline DryPlate pH 4-7 (Pharmacia, Uppsala, Suecia), que son geles de poliacrilamida T = 4% y C = 3% de dimensiones 250 × 110 × 0.5 mm.

El gel se rehidrató en una bandeja de acero inoxidable colocada en una superficie horizontal con 17 ml de una solución de rehidratación durante 2 horas. La solución para la rehidratación del gel se preparó mezclando 19.5 ml de la solución stock de urea/ glicerol, 20 mg de DTT (Sigma) y 500 µl de anfolina de pH 4-6.5 (Pharmacia). La disolución se desaireó durante 3 min en un baño de ultrasonidos.

Se colocó el gel hidratado sobre la placa refrigerada a 12° C. Sobre él se depositaron los papeles humedecidos con 15 µl de las muestras.

El isoelectroenfoque consistió en una etapa de preenfoco de 30 min, trabajando a un voltaje constante de 200 V y una etapa de enfoque de 360 min, con una corriente de 2.5 mA.

La tinción de las proteínas se realizó manteniendo el gel durante 25 min en solución fijadora (15% de TCA en agua), en agitación. Después se realizaron dos lavados con solución decolorante (10% de ácido acético, 25% de metanol y 65% de

agua). Se empleó una solución colorante de Azul Coomassie G 250 al 0.3% en metanol 90% (v/ v) mezclada con una disolución 0.5% de sulfato de cobre pentahidratado en ácido acético 20%, en proporción 1: 1, que se dejó actuar durante 30 min. A continuación, se mantuvo en solución decolorante durante 12 horas hasta la desaparición del color del fondo. Finalmente, el gel se lavó con agua a la que se había añadido una gota de glicerol (87%, v/ v). El gel fue secado en posición vertical en un ambiente limpio, a temperatura ambiente.

2.3.2.3.3 Cuantificación

La cuantificación de las bandas fue realizada en un ordenador personal provisto de un scanner utilizando como analizador de imagen el software 1D Manager versión 2.0 de Tecnología para Diagnóstico e Investigación (TDI, Alcobendas, España), el cual permite la estimación de la intensidad integrada de las bandas electroforéticas.

Se realizó el análisis de las mezclas de caseína isoelectrica y caseína de cuajo en proporciones 15, 25, 35, 45 y 55% de caseína isoelectrica en caseína total. La medida del porcentaje de área corregida del pico de κ -CN se hizo corresponder con una adición de caseína isoelectrica/ caseinato al queso en porcentaje de proteína. Con la curva de calibrado obtenida se calculó la cantidad de caseína isoelectrica/caseinato añadida. La adición expresada como gramos de proteína/ 100 gramos de queso (% en peso de queso) se calcula mediante la fórmula:

$$\frac{p \times P}{100}$$

donde:

p = porcentaje de adición de caseína/caseinato obtenido a partir de la curva de calibrado

P = contenido en proteína del queso calculado mediante el método Kjeldahl

2.3.2.4 Determinación de LAL mediante HPLC

El método empleado para la determinación de LAL fue el descrito Resmini y Pellegrino (1998).

2.3.2.4.1 Preparación de la muestra

Se pesó una cantidad de queso correspondiente a 10 mg de proteína y se añadieron 30 ml de HCl 6N. Se selló el vial a vacío y se mantuvo a 110° C durante 23 horas. Se filtró el hidrolizado a través de papel de filtro Whatman 43. Se determinó el contenido en nitrógeno en 20 ml del hidrolizado filtrado mediante el método de Kjeldahl. Se llevaron a sequedad 5 ml del hidrolizado filtrado en un Rotavapor (Büchi, Flawil, Suiza), a 60° C. Posteriormente se añadieron 5 ml de agua y se repitió el proceso. El material seco resultante se disolvió en 250 µl de ácido bórico 0.4 M, comprobándose en cada análisis con papel indicador que el pH era mayor de 7, para confirmar que el paso de secado había eliminado totalmente el HCl. Se mezclaron 100 µl de esta disolución con 200 µl de agua y 100 µl de ácido bórico 0.4 M. Después, se añadieron 400 µl de una solución de FMOC al 0.5 % en acetonitrilo (ACN) y la mezcla se mantuvo en oscuridad durante 1 hora.

La muestra derivatizada se sometió a un proceso de extracción en fase sólida inmediatamente o, en caso necesario, se mantuvo a -20° C durante 24 horas. Previamente, el cartucho de extracción Amino cartridge (500 mg/3 ml) (Baker, Phillipsburg, USA) se acondicionó haciendo pasar 10 ml de ACN y 10 ml de una solución ACN: ácido bórico 0.1 M de pH 7.2 (1: 4, v/ v) con un flujo de 10 ml/min y evitando que el cartucho quedara seco. Después, se siguieron las siguientes etapas:

a) Se colocaron 100 µl de muestra en el cartucho, se eluyeron con un flujo de 0.1 ml/min y se secó el cartucho con 40 ml de aire.

b) Se colocaron 6 ml de una solución ACN: agua (1: 4, v/ v), se eluyeron con un flujo de 1 ml/min y se secó el cartucho con 40 ml de aire.

c) Se colocaron 5 ml de una solución ACN: agua (1: 1, v/ v), se eluyeron con un flujo de 1 ml/min y se secó el cartucho con 40 ml de aire.

d) Se colocaron 1.5 ml de una solución ACN: ácido bórico 0.2 M de pH 9.0 (1:1, v/v), se eluyeron a 1 ml/min hasta secado del cartucho y se recogió el líquido. Se inyectaron 25 μ l de este líquido en el cromatógrafo. En caso necesario la muestra se mantuvo a -20° C.

Para preparar la muestra patrón, a 5 ml del hidrolizado de un queso que no contenía LAL se le añadieron 30 μ l de la disolución 0.05 mM de LAL en agua. La muestra se sometió al mismo proceso descrito para el hidrolizado de queso.

2.3.2.4.2 Instrumentación y método

El análisis se realizó en un cromatógrafo de líquidos formado por dos bombas M-6000A (Waters, Milford, USA), un inyector automático WISP 710B (Waters) y un módulo de interfase SIM (Waters) conectado a un ordenador personal. El control del equipo, así como la adquisición y procesado de los datos, se realizó utilizando el programa Maxima 820 (Waters).

Para llevar a cabo las separaciones se utilizó un sistema de columnas formado por una guardacolumna ODS-Hypersil de 5 μ m (20×2.1 mm) y una columna Amino Quant C18 de 200×2.1 mm (Hewlet Packard). El análisis se realizó a una temperatura controlada de 27° C.

Para la elución se utilizó un gradiente de dos eluyentes. El eluyente A estaba formado por una mezcla de una solución I (0.5% de tetrahidrofurano y 0.1% de acetato de etilo en acetato potásico 30 mM, v/ v) y de una solución II (80% de ACN y 20% de acetato sódico 100 mM, v/ v) en proporción 70: 30. El eluyente B estaba formado por una mezcla de las soluciones I y II en proporción 25: 75. El flujo empleado fue de 0.5

ml/min. El gradiente de la fase B fue del 30 al 40% lineal en 15 minutos, isocrático durante 15 minutos, y del 40 al 100% lineal en 1 minuto. Finalmente la columna se acondicionó con solución II durante 15 minutos.

La detección se llevó a cabo con un detector de fluorescencia 1046-A (Hewlett Packard), utilizando unas longitudes de onda de excitación de 260 nm y de emisión de 310 nm.

2.3.2.4.3 Cuantificación

Para la determinación de LAL, se cuantificó el área de los picos correspondientes a este compuesto tanto en la muestra patrón como en las muestras problema. La cantidad de LAL en las muestras se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{LAL (en pmoles)} = A_c \times \frac{C_s}{A_s} \times \frac{PM_{LAL}}{p} \times \frac{1}{1000}$$

donde:

A_c = área de los picos correspondientes a LAL en la muestra

C_s = cantidad de LAL añadida a 5 ml de hidrolizado, en pmoles

A_s = área de los picos correspondientes a LAL en la muestra patrón

PM_{LAL} = peso molecular de la LAL (233)

p = contenido proteico de 5 ml de hidrolizado en mg

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Aplicación de la CE a la detección de caseína/caseinatos en diferentes tipos de queso

Aunque la CE ha sido empleada en los últimos años para el estudio de las proteínas de la leche, de los quesos y de otros productos lácteos (Recio y col., 1997a), no existían referencias de su aplicación a la detección de caseína o caseinatos en quesos. A pesar de la complejidad de este tema, motivada tanto por el gran número de productos lácteos diferentes que pueden encontrarse en los quesos como por sus diferentes modos de elaboración, se estudiaron las posibilidades de aplicarla con este propósito, debido a la buena resolución conseguida en el análisis de la fracción proteica de los productos lácteos mediante CE.

2.4.1.1 Estudio de caseínas, caseinatos y leches en polvo mediante CE

Puesto que existen diversos productos lácteos: caseína ácida, caseína de cuajo, caseinatos sódicos, caseinatos cálcicos y leche en polvo que pueden ser utilizados como ingredientes en la fabricación del queso, en una primera fase se caracterizaron algunos de estos productos mediante su análisis por CE. La Figura 2.10 muestra los electroforegramas de una muestra de leche pasteurizada, una de leche en polvo, una de caseína isoeléctrica y una de caseína de cuajo. Como ya se ha comentado en el Capítulo 1, las proteínas lácteas fueron identificadas según de Jong y col. (1993) y Recio y col. (1997c). El perfil electroforético de la leche en polvo (Fig 2.10b) mostraba picos anchos y deformados debido a la desnaturalización inducida en su proceso de fabricación, característica que ya había sido observada por algunos autores en el análisis por CE (Chen y Zang, 1992; de Jong y col., 1993).

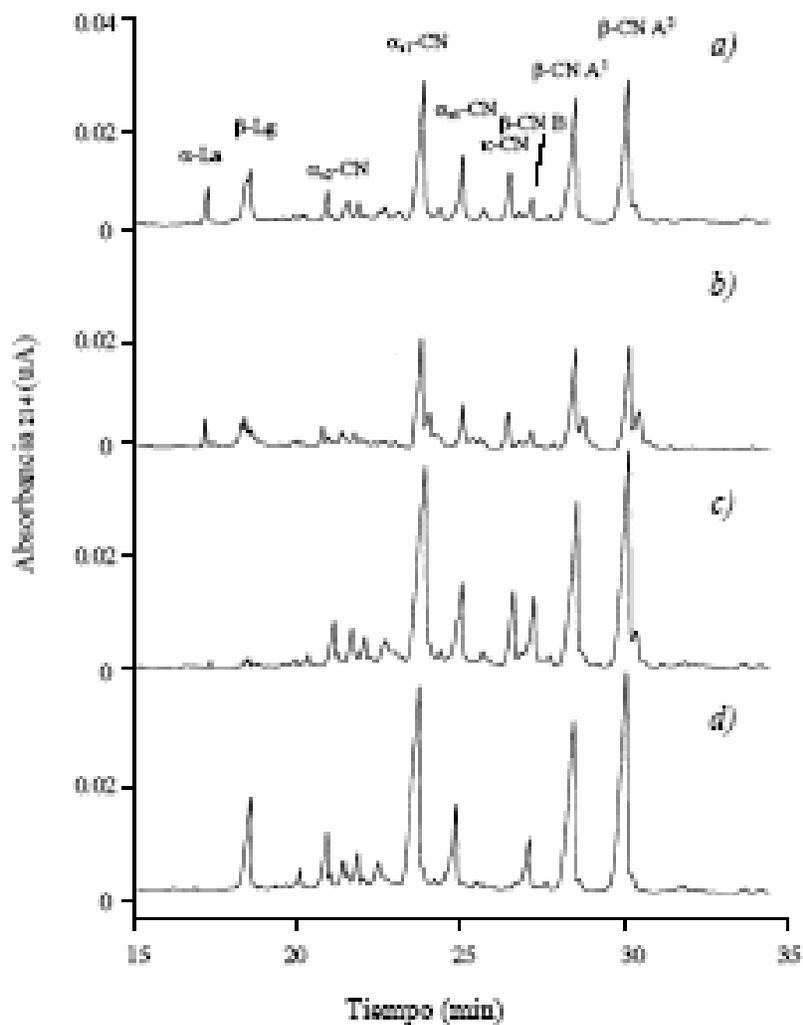


Figura 2.10 Electroforegramas de *a)* leche pasteurizada; *b)* leche en polvo; *c)* caseína ácida; *d)* caseína de cuajo. α_{s2} , α_{s2} -caseína (CN); γ_2A , γ_2 -CN A; γ_1B , γ_1 -CN B; γ_1A^1 , γ_1 -CN A¹; α_{s1} , α_{s1} -CN; α_{s0} , α_{s0} -CN; γ_3A , γ_3 -CN A; κ , κ -CN; βB , β -CN B; βA^1 , β -CN A¹; βA^2 , β -CN A².

El pico de κ -CN pudo observarse tanto en la leche pasteurizada como en la leche en polvo y en la caseína isoeléctrica. En cambio, en la muestra de caseína de cuajo había ausencia de κ -CN (aunque podrían detectarse trazas) y presencia de para- κ -CN. Por ello se pudo asumir que el pico de κ -CN era característico de la presencia de la

leche en polvo y de la caseína ácida, y el pico de para- κ -CN lo era de la presencia de la caseína de cuajo.

Dada la gran diversidad de caseinatos disponibles comercialmente, se estudiaron diferentes caseinatos cálcicos y sódicos. La Figura 2.11 muestra los electroforegramas de 5 caseinatos comerciales. Dependiendo del caseinato analizado, se obtuvieron diferentes perfiles, aunque en todos ellos pudo identificarse el pico de κ -CN. La presencia de picos deformados puede deberse al proceso industrial de producción de los caseinatos, que siempre conlleva un calentamiento, desuerado y lavado de material proteico a pH básico o neutro que puede dañar las caseínas (Dalgleish y Law, 1988). Este fenómeno también ha sido observado por PAGE y por cromatografía rápida de proteínas (FPLC) de intercambio iónico (Lynch y col., 1997). Debido a esto, la adición de un determinado caseinato podría condicionar tanto la forma de los picos del queso como el contenido de κ -CN encontrado.

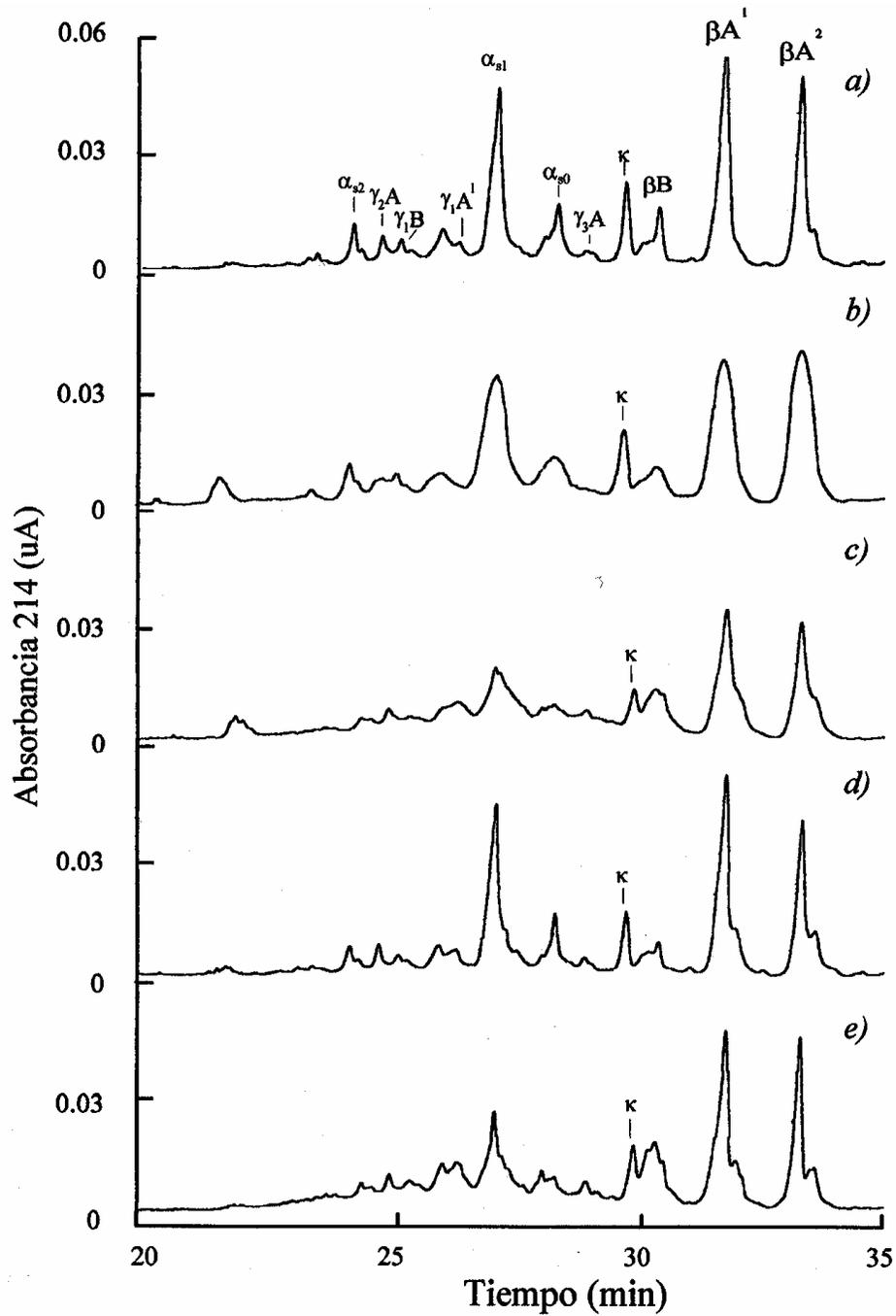


Figura 2.11 Electroforegramas de caseinatos comerciales: *a*) caseinato cálcico 1; *b*) caseinato cálcico 2; *c*) caseinato sódico 1; *d*) caseinato sódico 2; *e*) caseinato sódico 3. α_{s2} , α_{s2} -caseína (CN); γ_2A , γ_2 -CN A; γ_1B , γ_1 -CN B; γ_1A^1 , γ_1 -CN A¹; α_{s1} , α_{s1} -CN; α_{s0} , α_{s0} -CN; γ_3A , γ_3 -CN A; κ , κ -CN; βB , β -CN B; βA^1 , β -CN A¹; βA^2 , β -CN A².

2.4.1.2 Determinación cuantitativa de κ -CN mediante CE

Con el objeto de poder determinar cuantitativamente la κ -CN intacta presente en los diferentes productos lácteos comerciales, se estudió la cuantificación de la κ -CN a partir de muestras de esta proteína, en concentraciones entre 0.230 y 3.688 mg/ml, que había sido obtenida previamente por aislamiento a partir de leche bovina y de la que se conocía su pureza mediante el análisis con técnicas electroforéticas convencionales. Mediante el empleo de la CE, el pico de κ -CN fue resuelto como un pico principal y otros minoritarios con tiempos de migración similares a las β -CN A¹ y β -CN A². Estos picos corresponden probablemente a diferentes formas glicosiladas o fosforiladas de la κ -CN (Recio y col. 1997b). Se integraron las áreas corregidas (A_c) de todos ellos y se comprobó que el área del pico mayoritario representaba como media el 70% del área total en el rango de concentraciones estudiadas.

Las A_c del pico de κ -CN frente a su concentración mostraron un comportamiento lineal en este rango de concentraciones. El análisis de regresión dio lugar a la recta: A_c de κ -CN = $(3136 \pm 102) \times$ concentración de κ -CN ($r = 0.989$) en la cual la ordenada en el origen no era significativamente diferente de 0 ($p < 0.05$). A partir de estos datos se calcularon el límite de detección y la señal de detección. Para una probabilidad de falso positivo y falso negativo de 0.05 los valores obtenidos fueron de 0.605 mg/ml para el límite de detección y de 976.8 unidades de área (ua) para la señal de detección.

La exactitud fue calculada aplicando la recta obtenida a los valores de A_c de las concentraciones ensayadas, analizadas por duplicado. El promedio de estos valores fue de 98.7 %.

La repetibilidad en la cuantificación de la κ -CN se estudió inyectando 8 veces consecutivas la muestra de concentración 1.843 mg/ml. La RSD de los tiempos de migración (t_m) fue 0.12% y la de las A_c 4.63%.

La Tabla 2.2 resume los parámetros analíticos descritos para la determinación cuantitativa de κ -CN mediante este método de CE.

Tabla 2.12 Parámetros analíticos de la determinación cuantitativa de κ -CN mediante CE.

Parámetro	Determinación	Valor obtenido
Linealidad	Recta de calibrado	$R^2 = 0.978$
Sensibilidad	Límite de detección	0.605 mg/ml
	Señal de detección	976.8 u.a.
Exactitud	Valor encontrado/valor real	98.7%
Precisión	Repetibilidad (n = 8)	$t_m = 0.12\%$
		$A_c = 4.63\%$

A partir de la recta de regresión obtenida se determinó el contenido en κ -CN de algunos productos lácteos comerciales. Los datos se muestran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3 Contenido en proteína y en κ -CN en distintas caseínas, caseinatos y leches en polvo.

Producto lácteo	N° de muestras	Proteína (%)		κ -CN (mg/ml)	
		Media \pm SD	Intervalo	Media \pm SD	Intervalo
Caseína isoelectrica	6	70.3 \pm 8.1	65.4 - 86.1	2.2 \pm 0.1	2.0 - 2.4
Caseína de cuajo	6	76.8 \pm 2.4	74.0 - 81.1	0.04 \pm 0.02	0 - 0.08
Caseinato sódico	3	87.7 \pm 4.2	83.1 - 91.4	1.4 \pm 0.4	1.0 - 1.8
Caseinato cálcico	2	87.6 \pm 0.3	87.4 - 87.8	2.0 \pm 0.1	1.9 - 2.0
Leche en polvo	4	34.1 \pm 11.6	32.9 - 35.4	0.8 \pm 0.2	0.5 - 1.4

El contenido medio en κ -CN de estos productos creció en el orden caseína de cuajo < leche en polvo < caseinato sódico < caseinato cálcico < caseína isoeléctrica. En la caseína de cuajo se hallaron únicamente trazas de κ -CN, por debajo del límite de detección. La mayor variabilidad en el contenido de κ -CN se encontró en los caseinatos sódicos, pero siempre contenían menor cantidad que las caseínas isoeléctricas. Dalglish y Law (1988) también han encontrado contenidos variables de κ -CN (9.2 – 12.3% expresado como porcentaje del área total) analizando por FPLC diferentes caseinatos sódicos.

2.4.1.3 Estudio de diferentes tipos de queso por CE

La Figura 2.12 muestra los perfiles electroforéticos de cuatro caseínas de quesos diferentes: un queso Quarg obtenido por coagulación ácida, un queso Quarg elaborado con cuajo, un queso Mozzarella y un queso fundido. La asignación de los picos correspondientes a cada proteína o péptido fue realizada por comparación con los electroforegramas obtenidos por Recio y col. (1997b). Los diferentes quesos dieron lugar a diferentes patrones electroforéticos.

El queso Quarg obtenido por coagulación ácida (Fig 2.12a) mostró picos correspondientes a α_s -CN, β -CN, κ -CN y γ -CN. La presencia de estos últimos productos de degradación indica la actividad de la plasmina en la leche de partida, mientras que la presencia de κ -CN y ausencia de para- κ -CN es característica de la coagulación ácida del queso.

En la otra muestra de queso Quarg y en el queso Mozzarella (Fig 2.12b,c), no se observó el pico de κ -CN, lo que confirmó que en su proceso de elaboración se había empleado cuajo. El cuajo, además de hidrolizar la κ -CN en el enlace Phe-Met 105-106 produciendo la para- κ -CN (κ -CN f 1-105) y el CMP (κ -CN f 105-169), también produce la hidrólisis de la α_{s1} -CN en el enlace Phe-Phe 23-34 produciendo α_{s1} -CN f(1-23) y α_{s1} -I-CN (α_{s1} -CN f 24-199) (Swaisgood, 1993).

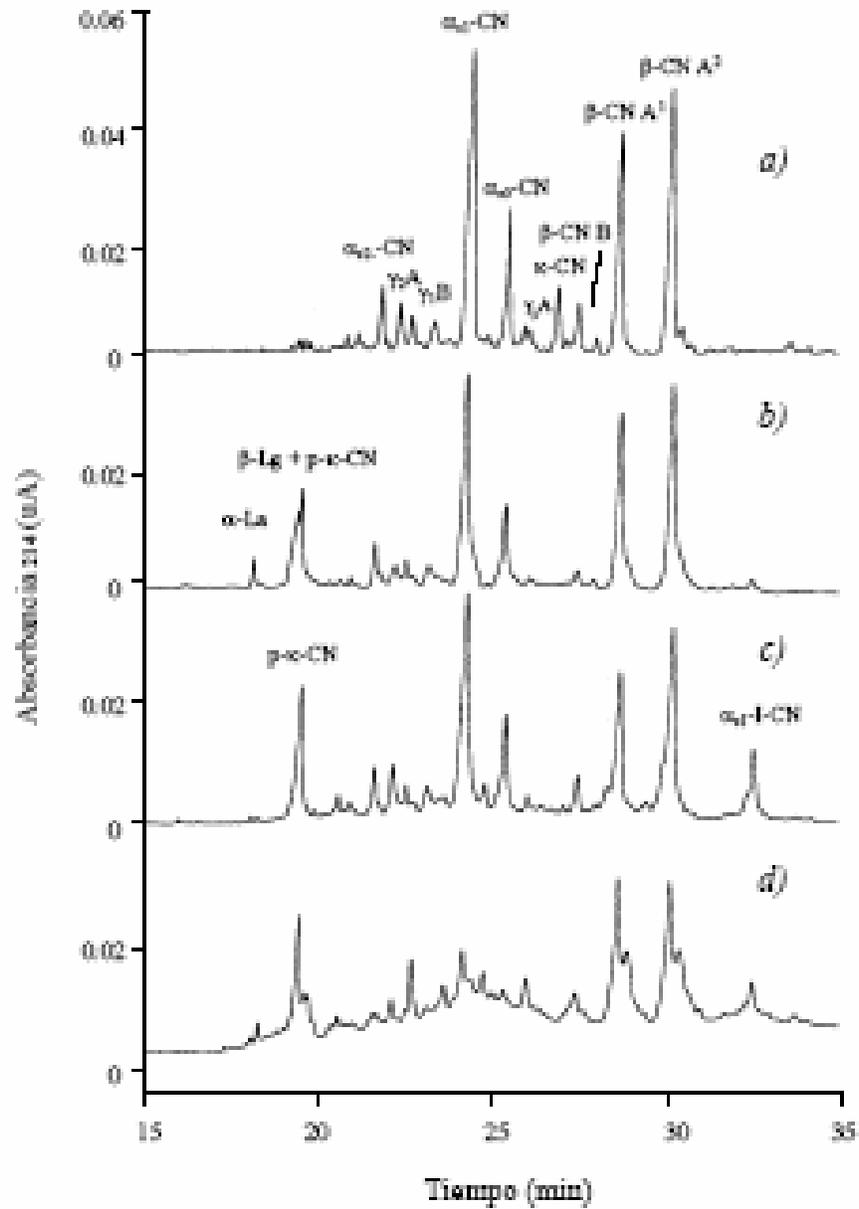


Figura 2.12 Electroforegramas de caseínas de muestras de queso a) Queso Quarg elaborado con coagulación ácida; b) Queso Quarg elaborado con cuajo; c) Queso Mozzarella; d) Queso fundido; p- κ -CN, para- κ -CN; γ_2 A, γ_2 -CN A; γ_1 B, γ_1 -CN B; γ_3 A, γ_3 -CN A

En el queso Quarg elaborado con cuajo, además, podía observarse la presencia de las proteínas de suero α -La y β -Lg, aunque esta última bajo las condiciones de análisis utilizadas tiene un tiempo de migración similar al de la para- κ -CN e interfiere con ella. La presencia de proteínas de suero en el electroforegrama de las caseínas del queso indica que en el proceso de elaboración ha existido un calentamiento que ha provocado su desnaturalización y precipitación junto con las caseínas (Haque y Kinsella, 1988). El pico de α_{s1} -I-CN es mayor en el queso Mozzarella, debido probablemente a una actuación del cuajo más intensa.

En el electroforegrama del queso fundido los picos principales, especialmente α_{s1} -CN y β -CN aparecían distorsionados y con hombros (Figura 2.12d). Durante el calentamiento a altas temperaturas que tiene lugar durante su elaboración ocurren cambios en las proteínas tales como la defosforilación, la ruptura de enlaces peptídicos o el entrecruzamiento molecular que dan lugar a su desnaturalización (Singh y Creamer, 1992). Este perfil hizo necesario realizar las integraciones de los picos “valle a valle”, como se ha descrito en el Capítulo 1.

2.4.1.4 Estudio de quesos fundidos con diferentes contenidos de caseína/caseinato

La Figura 2.13 muestra los perfiles electroforéticos de cuatro quesos fundidos de composición conocida. Puede observarse que las muestras, que contenían quesos tanto maduros como frescos, contenían las principales caseínas, α_{s1} -CN y β -CN, junto con productos de degradación como la α_{s1} -I-CN y la para- κ -CN, producidos por la acción de la quimosina del cuajo. La presencia de estos productos indica el empleo de cuajo en la elaboración de los quesos empleados en la mezcla. Además, estos quesos contenían gran cantidad de γ -CN. La presencia de γ -CN, principalmente γ_1 -CN B (β -CN B-1P f29-209), γ_1 -CN A² (β -CN A²-1P f29-209) y γ_3 -CN A (β -CN A f108-209), es indicativa de la actividad de la plasmina sobre la β -CN (Gufferty y Fox, 1988).

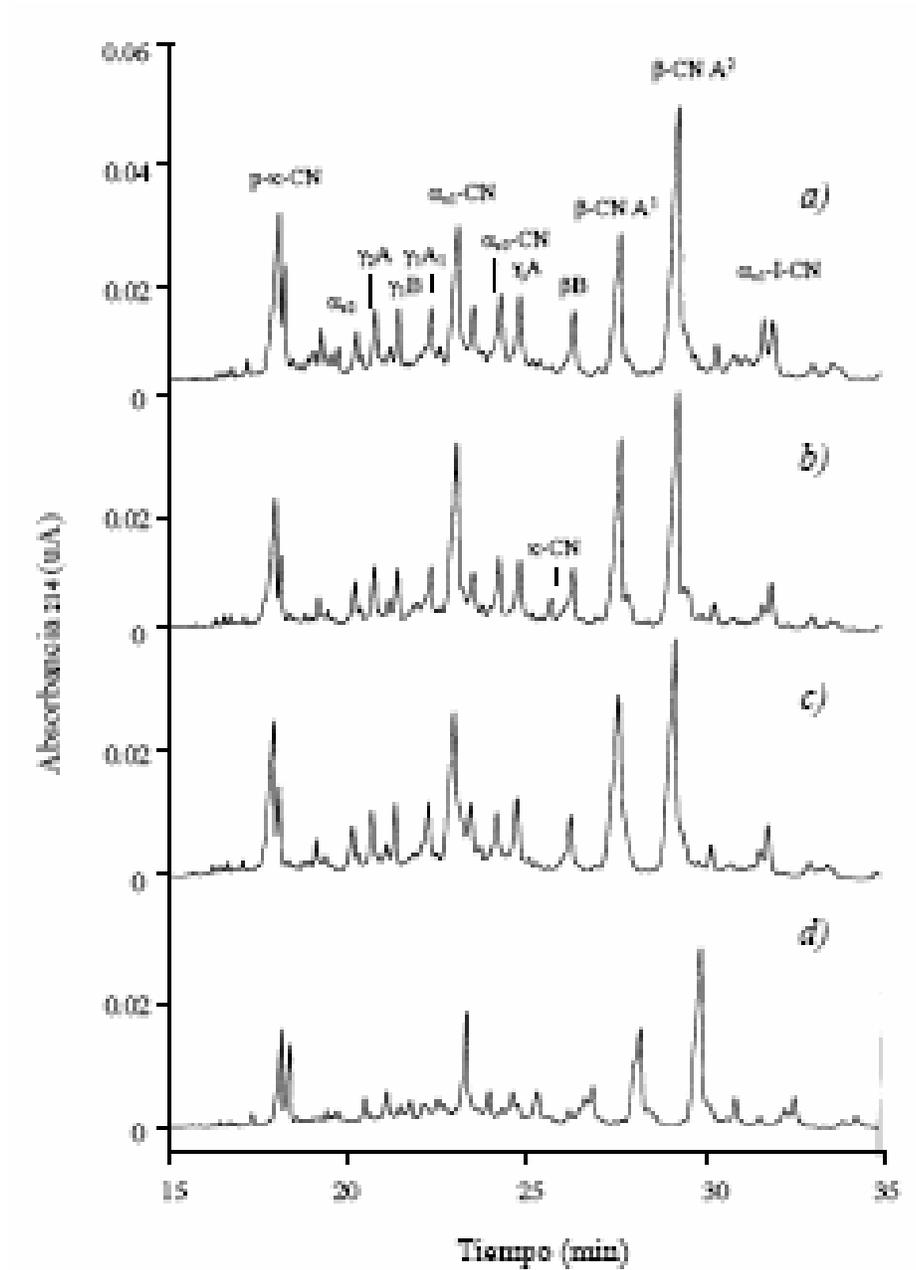


Figura 2.13 Electroforegramas de quesos fundidos de composición conocida: *a*) Queso fundido sin adición; *b*) Queso fundido con adición de 5% de caseína isoelectrica 3; *c*) Queso fundido con adición de 5% de caseína de cuajo; *d*) Queso fundido con adición de 5% de caseinato sódico. p-κ-CN, para-κ-CN; α₂, α₂-caseína (CN); γ₂A, γ₂-CN A; γ₁B, γ₁-CN B; γ₁A¹, γ₁-CN A¹; γ₃A, γ₃-CN A; βB, β-CN B

Es conocido que en quesos maduros se encuentran gran cantidad de γ -CN (Folkertsma y col., 1996). Así, la relación γ -CN: β -CN ha sido utilizada en el control de calidad del queso Parmesano rallado con el objeto de detectar la adulteración con queso fresco (Mayer, 1997). En quesos fundidos la inclusión de queso maduro es frecuente porque contribuye al desarrollo del sabor.

En los electroforegramas, el pico correspondiente a κ -CN se encontró presente en los quesos que contenían caseína ácida y caseinato (Fig 2.13*b,c*) mientras que no se detectó en el queso que tenía caseína de cuajo (Fig 2.13*d*).

2.4.1.4.1 Efecto de la adición de diferentes productos lácteos a los quesos fundidos

Con el objeto de estudiar el efecto de la adición de diferentes productos en la determinación de caseína/caseinato de los quesos se analizaron quesos fundidos de composición conocida a los que se había añadido caseína isoeléctrica, caseinato sódico o caseína de cuajo. Se determinó la adición de caseína/caseinato en todos los quesos fundidos mediante la cuantificación del pico de κ -CN intacta de dos maneras (Tabla 2.4):

A) aplicando la recta de calibrado obtenida con las mezclas de caseína isoeléctrica y caseína de cuajo en proporciones 15, 25, 35, 45 y 55% de caseína isoeléctrica en caseína total (apartado 1.4.1.2). La recta de calibrado obtenida fue: [% área corregida de κ -CN = $(0.049 \pm 0.004) \times$ % adición de caseína/ caseinato – (0.136 ± 0.159) r = 0.972].

B) refiriendo el área de κ -CN a la de un queso con un 5% de adición de caseína isoeléctrica tomado como patrón.

Tabla 2.4 Porcentaje de adición de caseína/ caseinato encontrado en muestras de quesos fundidos de composición conocida con adición de diferentes productos lácteos mediante CE.

Muestra de queso fundido	Producto lácteo añadido (% en peso de queso)			Proteína (%)	Caseína/caseinato encontrado por determinación de κ -CN (% en peso de queso)	
	Caseína isoelectrica	Caseinato sódico	Caseína de cuajo		Recta de calibrado	Referido a queso patrón
1	0	0	0	13.7	0	0
2	0	0	0	19.3	0	0
3	5	0	0	14.7	3.94 ± 0.08	5.57 ± 0.13
4	5	0	0	18.9	4.82 ± 0.03	5.25 ± 0.03
5	0	5	0	17.9	2.36 ± 0.12	2.41 ± 0.16
6	5	0	5	14.1	4.30 ± 0.10	5.74 ± 0.16
7	0	0	5	18.1	0	0

n = 2

Los resultados cuantitativos para las cantidades de caseína/caseinato en caseína total determinada fueron satisfactorios. Ninguna muestra sin adición dio lugar a una determinación positiva

Para el caso de adición de caseína isoelectrica las recuperaciones obtenidas oscilaron entre 70 y 96% cuando se aplicó la recta de calibrado, y entre 95 y 115% cuando se refirió el valor al de una muestra patrón con 5% de caseína isoelectrica. Cuando se realizó el cálculo respecto a un queso patrón que pertenecía a un lote de fabricación diferente, la diferencia entre el valor esperado y el obtenido fue mayor.

En el caso de adición de caseinato sódico, los valores de recuperación fueron alrededor del 50%, lo que concuerda con el menor contenido en κ -CN intacta que este producto contiene (ver Tabla 2.3).

En el caso de adición de caseína de cuajo, no se determinó adición de caseína/caseinato debido a la ausencia de κ -CN intacta, mientras que en el caso de la adición de caseína de cuajo junto con caseína isoelectrica, no se encontró interferencia de la caseína de cuajo con el valor de caseína isoelectrica determinado.

2.4.1.4.2 Efecto de la adición de leche en polvo al queso fundido

Entre los ingredientes que se pueden utilizar para elaborar quesos fundidos está la leche en polvo, producto que puede interferir con la determinación de κ -CN intacta, aunque su contenido en κ -CN es inferior al de la caseína isoelectrica y los caseinatos. Puesto que los quesos de composición conocida tenían contenidos variables en leche en polvo, se determinó el contenido en caseína/caseinato para una misma adición de caseína isoelectrica (Tabla 2.5).

Los valores encontrados indican que la adición de leche en polvo al queso fundido no interfiere en la determinación de κ -CN intacta, pues no se detectó κ -CN en las muestras con un 0.9% de leche en polvo sin adición de caseína isoelectrica y los

valores obtenidos para la adición de 5% de caseína isoelectrica no se vieron afectados por el contenido creciente de leche en polvo de las muestras.

Tabla 2.5 Porcentaje de adición de caseína/caseinato encontrado en muestras de quesos fundidos de composición conocida con diferente contenido en leche en polvo mediante CE.

Muestra de queso fundido	Producto lácteo añadido (% en peso de queso)			Caseína/ caseinato encontrado por determinación de κ -CN (% en peso de queso)	
	Caseína isoelectrica	Leche en polvo	Proteína (%)	Recta de calibrado	Referido a patrón
1	0	0.9	19.0	0	0
2	5	0	18.9	4.82 ± 0.03	5.25 ± 0.03
3	5	0.9	20.2	4.92 ± 0.03	5.00 ± 0.03
4	5	1.2	14.6	4.89 ± 0.05	6.40 ± 0.07

n = 2

Cuando los resultados se refieren al área de la κ -CN de un queso patrón, el mayor contenido en κ -CN en el queso con 1.2% de leche en polvo puede ser debido a que dicho queso procedía de otro lote de elaboración.

2.4.1.4.3 Determinación cuantitativa de la caseína isoelectrica añadida

Con el fin de evaluar la determinación cuantitativa de la caseína isoelectrica añadida, se determinó la adición de caseína en quesos fundidos que contenían diferente porcentaje de este producto (Tabla 2.6).

Los resultados obtenidos proporcionaron recuperaciones entre 81.2 y 90% cuando se empleó la recta de calibrado y entre 82.2 y 92.3% cuando se utilizó el área del queso patrón, por lo que el método se consideró adecuado para determinar adición de caseína isoelectrica a quesos fundidos.

Tabla 2.6 Porcentaje de adición de caseína/caseinato encontrado en muestras de quesos fundidos de composición conocida con diferente contenido en caseína isoeléctrica mediante CE.

Muestra de queso fundido	Producto lácteo añadido (% en peso de queso)		Caseína/ caseinato encontrado por determinación de κ -CN (% en peso de queso)		
	Caseína isoeléctrica	Proteína (%)	Recta de calibrado	Referido a patrón	
1	0	19.0	0	0	
2	2.5	18.4	2.25 ± 0.06	2.19 ± 0.07	
3	5	19.8	4.06 ± 0.13	4.11 ± 0.15	
4	10	20.6	8.78 ± 0.09	9.23 ± 0.10	

n = 2

2.4.1.4.4 Determinación cuantitativa de la caseína de cuajo añadida

Con el objeto de evaluar la determinación de la adición de caseína de cuajo se determinó la κ -CN intacta encontrada en quesos fundidos con diferente contenido de caseína de cuajo. Como era de esperar, no pudo cuantificarse el pico de κ -CN en estos quesos, menos en el caso de una adición de un 10%, en el que se obtuvieron valores cercanos al 1%, lo que puede explicarse por el contenido residual de κ -CN en las caseínas de cuajo (Tabla 2.6).

Puesto que la caseína de cuajo no contiene κ -CN intacta, la detección de su adición debería hacerse mediante algún producto característico en ella, como es la para- κ -CN. Este producto de degradación también se encuentra en los quesos cuando

en su elaboración se emplea cuajo, pero se evaluaron las posibilidades de su cuantificación.

En los mismos quesos fundidos de composición conocida se determinó el pico de para- κ -CN y se determinó la adición de caseína de cuajo de dos maneras, como se había hecho anteriormente con la caseína isoeléctrica (Tabla 2.7):

A) aplicando la recta de calibrado de para- κ -CN frente a la adición de caseína de cuajo que se obtuvo con las mezclas de caseína isoeléctrica y caseína de cuajo, siendo en este caso las proporciones de 45, 55, 65, 75, y 85% de caseína de cuajo en caseína total. La recta de calibrado fue [% área corregida de para- κ -CN = $(0.138 \pm 0.013) \times$ % adición de caseína de cuajo – (0.505 ± 0.863) r = 0.966].

B) refiriendo el área de para- κ -CN a la de un queso con un 5% de adición de caseína de cuajo tomado como patrón.

Como puede observarse, la determinación de para- κ -CN mediante la recta de calibrado no es válida para la detección de la adición de caseína de cuajo, pues los valores disminuyen con el incremento del porcentaje añadido y por lo tanto no se puede restar a los valores obtenidos el porcentaje que se obtiene en el caso sin adición. La presencia de este producto de degradación en el queso inicialmente es probablemente la causa de la determinación errónea.

Cuando se utiliza un patrón con un 5% de caseína de cuajo se puede observar que los valores encontrados no permiten diferenciar la ausencia de caseína de cuajo de la adición de un 5 o un 10%, por lo que tampoco es un método válido.

Algunos autores han utilizado relaciones entre áreas de diferentes proteínas para evaluar ciertos parámetros en productos lácteos, como Chen y Zang (1992), que utilizan la relación β -CN/ α -La para detectar la adulteración de leche fresca con leche en polvo, o Mayer (1997) que detecta la adulteración de queso Parmesano con queso joven a través de la relación γ -CN/ β -CN. Siguiendo una estrategia similar, se calculó la relación entre la suma de los porcentajes de área de las β -CN A (β -CN A¹ y A²) y el

porcentaje de área de la para- κ -CN en quesos fundidos que tenían diferentes contenidos de caseína de cuajo.

Tabla 2.7 Porcentaje de adición de caseína/caseinato encontrado en muestras de quesos fundidos de composición conocida mediante CE.

Muestra de queso fundido	Producto lácteo añadido (% en peso de queso)		Caseína/ caseinato encontrado por determinación de κ -CN (% en peso de queso)		Caseína/ caseinato encontrado por determinación de para- κ -CN (% en peso de queso)	
	Caseína de cuajo	Proteína (%)	Recta de calibrado	Referido a patrón	Recta de calibrado	Referido a patrón
1	0	19.0	0	0	23.48 ± 0.49	5.41 ± 0.12
2	5	18.0	0	0	20.55 ± 0.28	4.98 ± 0.07
3	5	18.1	0	0	20.80 ± 0.09	5.02 ± 0.02
4	10	18.2	1.27 ± 0.12	0.97 ± 0.15	19.53 ± 0.19	4.67 ± 0.05

n = 2

Estos quesos habían sido fabricados en un mismo lote. La representación del cociente de áreas corregidas (relación β -CN A/para- κ -CN) frente a la adición de caseína de cuajo dio lugar a la siguiente recta de regresión: [relación β -CN A/para- κ -CN = $(0.0805 \pm 0.003) \times \% \text{ adición de caseína de cuajo} + (1.925 \pm 0.018)$], $R^2 = 0.986$. Esta recta se utilizó para calcular el porcentaje de adición de caseína de cuajo a quesos de composición conocida del mismo lote de fabricación. En los quesos en los que se detectó κ -CN intacta no se determinó la adición de caseína de cuajo, pues se trataría de una adición de caseína isoeléctrica. Los resultados se recogen en la Tabla 2.8.

Tabla 2.8 Porcentaje de adición de caseína de cuajo encontrado en muestras de quesos fundidos de composición conocida mediante la relación β -CN/para- κ -CN por CE.

Muestra de queso fundido	Caseína de cuajo añadida (% en peso de queso)	Relación β -CN A/ para- κ -CN	Caseína de cuajo encontrada (% en peso de queso)
1	0	1.92 ± 0.06	-0.15 ± 0.77
2	0	1.95 ± 0.03	0.29 ± 0.39
3	5	2.32 ± 0.06	4.89 ± 0.69
4	5	2.31 ± 0.01	4.69 ± 0.04
5	10	2.75 ± 0.04	10.19 ± 0.52

n = 2

Los resultados demuestran la validez de esta medida para determinar la adición de caseína de cuajo a los quesos fundidos. Sin embargo, cuando la recta de calibrado se aplicó a los datos obtenidos en quesos fundidos pertenecientes a otros lotes, los resultados fueron 5.23 y -6.94% en dos quesos sin adición, y 32.0 y 35.8% en dos quesos fundidos con un 5% de caseína de cuajo. Esto demuestra la gran variabilidad en la cuantificación de la para- κ -CN y las β -CN A que hace esta relación aplicable únicamente a quesos que hayan sido elaborados en las mismas condiciones.

2.4.1.4.5 Determinación de caseína/caseinato en quesos fundidos comerciales

Puesto que el método de cuantificación de κ -CN intacta por CE resultó adecuado para la determinación de la adición de caseína/caseinato en quesos fundidos, se analizaron diecinueve quesos comerciales adquiridos en mercados locales.

La Figura 2.14 muestra los perfiles electroforéticos de tres quesos fundidos comerciales que corresponden a dos quesos en lonchas (Figura 2.14*a,b*) y a un queso en porciones (Figura 2.14*c*). Los perfiles electroforéticos obtenidos en estos quesos fueron similares a los de composición conocida, es decir, los picos de las α_{s1} -CN y β -CN aparecían distorsionados y con hombros, y había abundancia de γ -CN. Sin embargo, se encontraron diferencias en la distorsión de los picos, pues había casos en los que los picos llegaban a ensancharse y disminuir de altura considerablemente, resultando muy difícil la caracterización, especialmente en el caso de los quesos en porciones. La diferente tecnología empleada en los dos tipos de queso puede explicar estas diferencias. Así, en los quesos para untar, también llamados de pasta corta, se emplean temperaturas más altas y sales fundentes distintas de las empleadas en los quesos destinados a elaborar bloques para lonchas (Spreer, 1991).

Los valores de adición de caseína o caseinato expresados en porcentaje de peso de queso se recogen en la Tabla 2.9. Los resultados mostraron cantidades variables de κ -CN intacta en los dos tipos de queso analizados. Hubo cinco quesos en los que no se detectó adición (un queso en lonchas y cuatro quesos en porciones), y catorce en los que se detectaron diferentes porcentajes, que oscilaron entre un 1% y un 11% en peso de producto, existiendo al menos tres casos que excederían el límite del 5% impuesto por el Reglamento de la Unión Europea 2742/90 (DOCE, 1990).

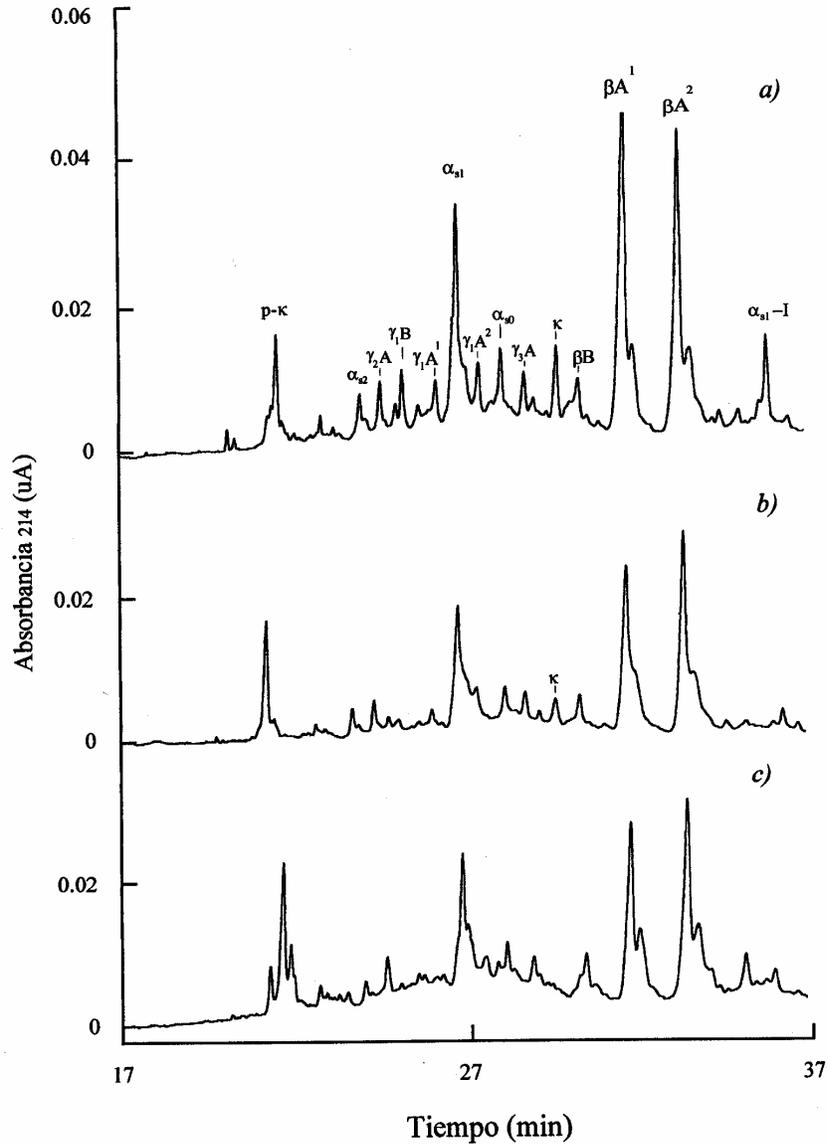


Figura 2.14 Electroforegramas de quesos fundidos comerciales: *a)* Queso fundido en lonchas; *b)* Queso fundido en lonchas con jamón; *c)* Queso fundido en porciones. p-κ, para-κ-CN, α_{s2}, α_{s2}-caseína (CN); γ₂A, γ₂-CN A; γ₁B, γ₁-CN B; γ₁A¹, γ₁-CN A¹, α_{s1}, α_{s1}-CN; α_{s0}, α_{s0}-CN; γ₃A, γ₃-CN A; κ, κ-CN; βB, β-CN B; βA¹, β-CN A¹; βA², β-CN A², α_{s1}, α_{s1}-CN

La determinación de la adición de caseína/caseinato por medio de un queso patrón daba lugar en algunos casos a resultados muy diferentes de los obtenidos mediante la recta de calibrado. En los casos anteriores se había comprobado que si se empleaba como queso patrón uno perteneciente a un lote de fabricación diferente, el resultado podía estar muy alejado del valor teórico, lo que indica la falta de homogeneidad de los quesos y la validez del empleo de los puntos de calibrado elaborados en el laboratorio.

Tabla 2.9 Porcentaje de adición de caseína/caseinato encontrado en quesos fundidos comerciales mediante CE.

Muestra de queso fundido (tipo)	Proteína (%)	Caseína/caseinato encontrado por determinación de κ -CN (% en peso de queso)	
		Recta de calibrado	Referido a patrón
Lonchas	20.8	11.21	11.82
	15.7	2.34	2.80
	16.0	6.76	8.68
	16.0	2.92	3.60
	18.7	7.41	8.53
	15.2	5.86	8.30
	14.9	5.60	8.06
	13.8	1.08	1.18
	16.2	1.27	1.16
	13.1	3.89	6.27
Porciones	12.6	2.0	3.03
	17.1	1.91	1.94
	11.7	4.02	7.34
	17.0	3.98	4.78

n = 2

En los quesos en los que no se encontró el pico de κ -CN ni la cuantificación del pico de para- κ -CN ni la relación β -CN/ para- κ -CN fueron empleados para calcular la adición de caseína de cuajo por no tener quesos modelo en los que basar estas medidas.

La determinación cuantitativa de la κ -CN intacta mediante una curva de calibrado con mezclas de caseína isoelectrica y caseína de cuajo demostró ser adecuada para la determinación de la adición de caseína isoelectrica a los quesos fundidos pero subestima la adición de caseinato.

2.4.1.5 Estudio de quesos Quarg con diferentes contenidos de caseína/caseinato

La Figura 2.15 muestra los electroforegramas de cuatro quesos Quarg de composición conocida, un queso control, sin adición, y tres a los que se había añadido un 2.2% de caseína isoelectrica, un 2.2% de caseinato sódico o un 2.6% de caseína de cuajo. En todos los electroforegramas puede observarse la presencia del pico de κ -CN, lo que indica que el queso Quarg fue elaborado con coagulación ácida. El pico de para- κ -CN aparece en el electroforegrama correspondiente al queso al que se había añadido caseína de cuajo.

Se determinó el porcentaje de caseína isoelectrica/caseinato añadido mediante la determinación de la κ -CN intacta, utilizando la curva de calibrado que se describe en el apartado 2.4.1.2 (Tabla 2.10).

Los valores encontrados fueron en todos los casos elevados, independientemente de la existencia de adición de caseína o caseinato. Esto es debido a que por su proceso de fabricación con coagulación ácida los quesos tenían gran cantidad de κ -CN intacta.

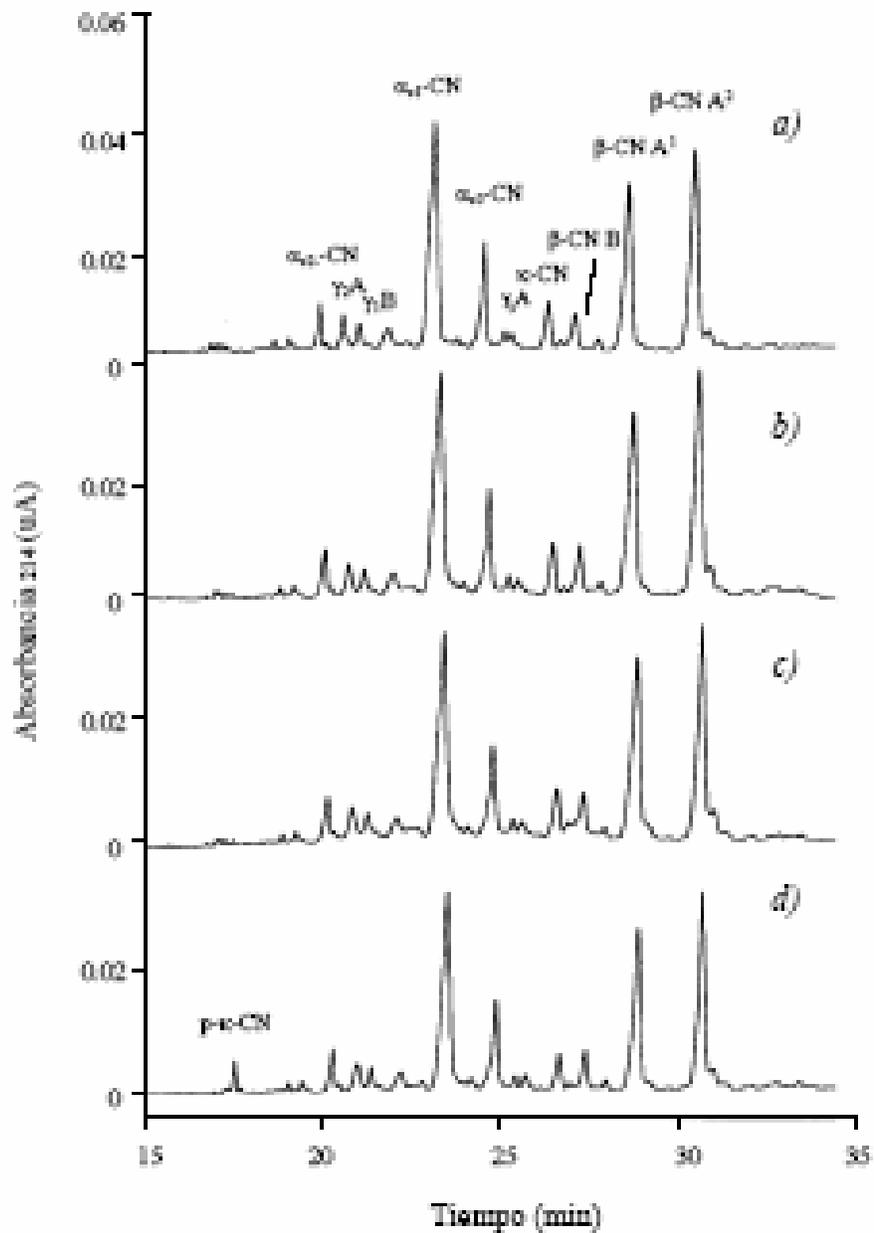


Figura 2.15 Electroforegramas de quesos Quarg de composición conocida: a) Control; b) Control con adición de 2.2% de caseína isoeléctrica; c) Control con adición de 2.2% de caseinato sódico; d) Control con adición de 2.6% de caseína de cuajo. p-κ-CN, para-κ-CN; γ₂A, γ₂-CN A; γ₁B, γ₁-CN B; γ₃A, γ₃-CN A

Teniendo en cuenta que todos los quesos tenían κ -CN inicialmente, se determinó el porcentaje de caseína isoeléctrica/caseinato añadido mediante sustracción del valor encontrado en la muestra 1, que no tenía adición, a las muestras 2 y 3, para las que se esperaba un aumento en el área del pico de κ -CN. Los datos obtenidos fueron 0.44 y -0.17% para las muestras 2 y 3 respectivamente, lo que no corresponde con los valores de adición de caseína isoeléctrica o caseinato sódico. Esta respuesta no cuantitativa en el pico de κ -CN se atribuyó a la presencia de κ -CN en la muestra inicialmente.

En el caso de la adición de caseína de cuajo, se empleó el procedimiento descrito en el apartado 2.4.1.5. de determinación de para- κ -CN. En los quesos que no tenían adición de caseína de cuajo no se detectó pico de para- κ -CN y en el queso con una adición de 2.6% el resultado obtenido resultó satisfactorio, lo que indica que la cuantificación de un pico (el de la para- κ -CN) que no se encuentra previamente en el electroforegrama es un procedimiento adecuado (Tabla 2.10).

Se puede concluir que la cuantificación del pico de la κ -CN intacta no es adecuada para determinar la adición de caseína/caseinato en quesos Quarg fabricados con coagulación ácida. En cambio, la cuantificación del pico de para- κ -CN hace posible determinar la adición de caseína de cuajo en estos quesos.

En la Figura 2.2 se mostraba un electroforegrama de un queso Quarg fabricado con cuajo que tenía picos correspondientes a proteínas de suero desnaturalizadas. En este caso no se podría cuantificar la para- κ -CN porque los tiempos de migración de la β -Lg y la para- κ -CN son similares. Para intentar resolver este problema, en el Capítulo 3 de esta memoria se desarrolla un método de CE con el que se pueden separar y cuantificar simultáneamente la β -Lg y la para- κ -CN en muestras de leche y productos lácteos.

Tabla 2.10 Porcentaje de adición de caseína/caseinato encontrado en muestras de quesos Quarg de composición conocida mediante CE.

Muestra de queso Quarg	Producto lácteo añadido (% en peso de queso)			Proteína (%)	Caseína/caseinato encontrado por determinación de κ -CN (% en peso de queso)	Caseína de cuajo encontrada por determinación de para- κ -CN (% en peso de queso)
	Caseína isoelectrica	Caseinato sódico	Caseína de cuajo			
1	0	0	0	9.7	7.22 ± 0.36	0
2	2.2	0	0	10.0	7.66 ± 0.09	0
3	0	2.2	0	10.2	7.05 ± 0.21	0
4	0	0	2.6	10.2	5.87 ± 0.11	2.61 ± 0.10

2.4.1.6 Estudio de quesos Mozzarella con diferentes contenidos de caseína/caseinato

La separación electroforética de los quesos Mozzarella de composición conocida con adiciones de caseína isoelectrica, caseína de cuajo y caseinato sódico mostró en todos ellos picos correspondientes a α_s -CN, β -CN y γ -CN, pero en ninguno de ellos se pudo observar κ -CN, aun después de la adición de caseína isoelectrica o caseinato sódico, pues las adiciones se habían realizado antes de la coagulación de la leche. Debido a la ausencia de κ -CN intacta, no se pudo utilizar este pico para determinar la adición de caseína o caseinato en estos quesos. Sin embargo, se pudo comprobar que no existían picos interferentes en el t_m de la κ -CN, por lo que en el caso de que las adiciones hubieran tenido lugar después de la coagulación, sí se habría detectado la presencia de κ -CN intacta, y habría podido cuantificarse.

La determinación de para- κ -CN con el fin de determinar la adición de caseína de cuajo no proporcionó resultados satisfactorios ya que la para- κ -CN se encontraba en todos los quesos, existiera o no adición.

Se puede concluir que la medida del pico de la κ -CN intacta no es un buen método para determinar la adición de caseína/caseinato en el caso de quesos Mozzarella en los que la adición se haya producido antes de la coagulación, aunque podría proporcionar buenos resultados si ésta se hubiera realizado después.

2.4.2 Comparación de la CE y el IPG-IEF para la detección de caseína/caseinato en diferentes tipos de queso

En el marco del proyecto SMT 4-CT97-2208 se propuso un método de isoelectroenfoque en gradiente de pH inmovilizado (IPG-IEF) para la determinación de caseína/caseinatos en quesos. Este método ha sido desarrollado por Krause (1998) y había sido utilizado previamente para la determinación del contenido en κ -CN no glicosilada en diferentes muestras de leche (Lodes y col., 1996).

2.4.2.1 Análisis de quesos fundidos

La Figura 2.16 muestra los patrones electroforéticos obtenidos mediante IPG-IEF de cuatro muestras de queso fundido de composición conocida. Con esta técnica fue posible la separación de numerosas bandas, ya que los puntos isoeléctricos (pI) de las principales proteínas de la leche bovina se sitúan entre 4.5 y 5.5 (Braun y col., 1990) y el rango de pH del gel utilizado fue de 4 a 7. Los duplicados de las muestras fueron muy parecidos, lo que demuestra que el uso de geles comerciales en IPG-IEF proporciona resultados muy repetibles. La identificación de las bandas se hizo en base a los trabajos de Krause (1998) y Krause y col., (2001). Las bandas identificadas correspondían a α_{s1} -CN, β -CN A¹ y β -CN A², κ -CN A, κ -CN B, γ_1 -CN B, γ_2 -CN A y γ_3 -CN A. Se observó que la banda correspondiente a la κ -CN B coincidía con la de la γ_1 -CN B, por lo que no era posible usarla para determinar κ -CN. Por ello se utilizó únicamente la banda de la κ -CN A, que no tenía ninguna banda interferente en estas condiciones. Esta banda pudo observarse en todos los quesos menos en el que no había tenido adición de caseína o caseinato. Mediante estas muestras se pudo comprobar que la banda correspondiente a κ -CN A se encontraba muy próxima a otra banda no identificada (*), por lo que para integrar con seguridad la banda de κ -CN A en las muestras de queso fue necesario en todos los casos analizar en el mismo gel una muestra de composición conocida que contuviera κ -CN.

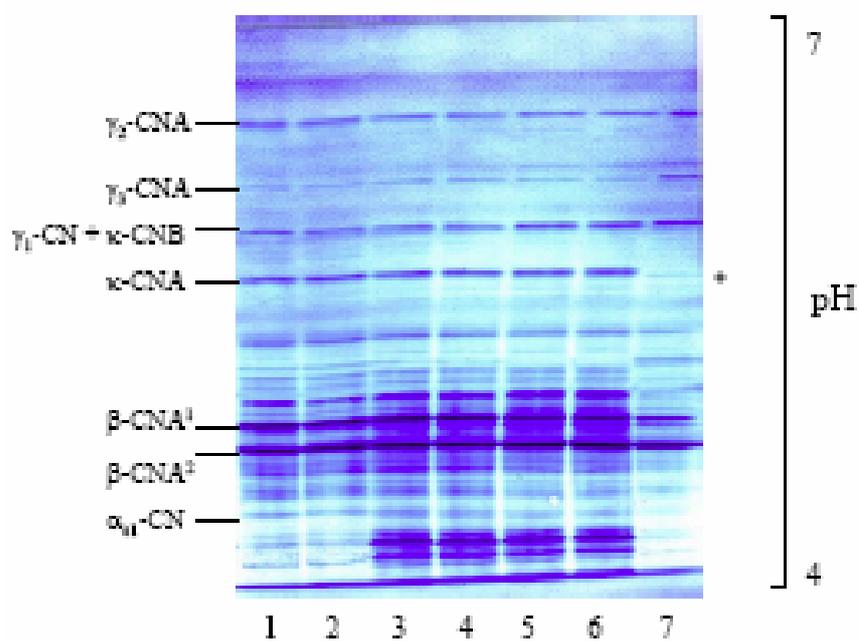


Figura 2.16 Isoelectroenfoque en gradiente de pH inmovilizado (IPG-IEF) de muestras de queso fundido de composición conocida. Calles 1 y 2: Queso con adición de 5% de caseína isoelectrica, 5% de caseína de cuajo, 1.2% de leche en polvo y 1.5% de suero en polvo; Calles 3 y 4: Queso con adición de 5% de caseína isoelectrica, 5% de caseína de cuajo y 1.2% de suero en polvo; Calles 5 y 6: Queso con adición de 5% de caseína isoelectrica; Calle 7: Queso sin adición de caseína/caseinato

Los porcentajes de adición de caseína/caseinato se calcularon considerando una curva de calibrado de porcentaje de caseína isoelectrica en caseína total en proporciones 15%, 25%, 35%, 45% y 55% frente al área integrada de κ -CN A. La recta obtenida [área de κ -CN A = $(0.0018 \pm 0.0002) \times$ porcentaje de caseína isoelectrica en caseína total - (15.04 ± 6.47) ; $r = 0.977$] fue utilizada para determinar, a través del área de κ -CN A integrada, la caseína isoelectrica en caseína total en las diferentes muestras de queso fundido analizadas. Los valores de adición de caseína/caseinato encontrados en los quesos fundidos mediante la determinación de la κ -CN intacta por IPG-IEF comparados con los obtenidos mediante CE se recogen en la Tabla 2.11.

La exactitud de la determinación, tomada como la diferencia entre el valor encontrado y el esperado, resulta similar en los dos métodos, aunque algo superior en CE. Sólo en el caso de la adición de caseinato sódico hay una diferencia grande entre los valores, pues en CE se subestima el porcentaje añadido, y en IPG-IEF se obtiene un valor parecido al de la adición de caseinato sódico.

La precisión del método de IPG-IEF fue inferior a la del método de CE dando lugar a valores de RSD de hasta un 32%. El mayor inconveniente de este método, que es común a las técnicas densitométricas y de procesado de imagen, es en ocasiones la inexacta cuantificación de las bandas (Grappin y Ribadeau-Dumas, 1992).

Puesto que con el gradiente utilizado en los geles no puede separarse la para- κ -CN, no pudo utilizarse su cuantificación para la determinación de la caseína de cuajo añadida por IPG-IEF.

Tabla 2.11. Porcentaje de adición de caseína/caseinato encontrado en muestras de quesos fundidos de composición conocida mediante IPG-IEF y CE.

Muestra de queso fundido	Producto lácteo añadido (% en peso de queso)					Caseína/caseinato encontrado por determinación de κ -CN (% en peso de queso)	
	Caseína isoelectrica	Caseinato sódico	Caseína de cuajo	Leche en polvo	Proteína (%)	CE	IEF
1	0	0	0	0	13.7	0	0
2	0	0	0	0	19.3	0	0
3	5	0	0	0	14.7	3.94 ± 0.08	3.52 ± 0.68
4	5	0	0	0	18.9	4.82 ± 0.03	4.05 ± 1.31
5	5	0	5	0	17.9	4.30 ± 0.10	4.15 ± 0.86
6	5	0	5	1.2	14.1	4.89 ± 0.05	5.68 ± 0.84
7	0	5	0	0	18.1	2.36 ± 0.12	4.28 ± 0.45

n = 2

2.4.2.2 Análisis de quesos Quarg y Mozzarella

La Figura 2.17 muestra los patrones electroforéticos de dos muestras de queso Quarg y dos muestras de quesos Mozzarella y las mezclas de caseína isoeléctrica y caseína de cuajo utilizadas para la determinación cuantitativa. Se pudo comprobar que la banda correspondiente a la κ -CN se encontraba siempre en los quesos Quarg, y no se encontraba en ningún caso en los quesos Mozzarella, independientemente de la adición de caseína/caseinato que hubieran tenido estos quesos. Por lo tanto, puesto que tanto la CE como el IPG-IEF se basan en la determinación de la κ -CN intacta, ninguno de los métodos es válido para la determinación de caseína/caseinato en quesos Quarg elaborados con coagulación ácida y en quesos Mozzarella en los que la adición de caseína/caseinato se ha producido antes de la coagulación.

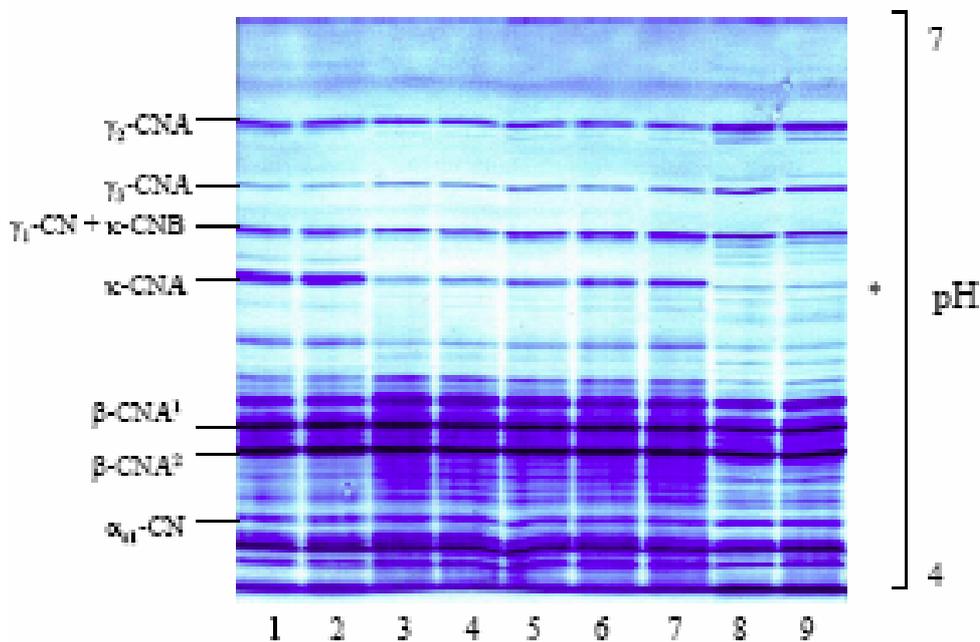


Figura 2.17 Isoelectroenfoque en gradiente de pH inmovilizado (IPG-IEF). Calles 1 y 2: Queso Quarg sin adición de caseína/caseinato; Calles 3, 4, 5, 6 y 7: Mezclas de caseína isoeléctrica y caseína de cuajo con 15, 25, 35, 45, y 55% de caseína ácida en caseína; Calles 8 y 9: Queso Mozzarella con adición de 5% de caseína isoeléctrica

2.4.3 Evaluación de la determinación de lisinoalanina (LAL) mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) como indicador de la presencia de caseinatos en quesos Mozzarella

La determinación de LAL mediante HPLC en quesos se ha propuesto (Proyecto SMT 4-CT97-2208) como método para la determinación de caseína/caseinatos en quesos siempre que en su elaboración no hayan sido sometidos a un calentamiento excesivo (Resmini y Pellegrino, 1998). Este hecho hace que los quesos fundidos queden excluidos del ámbito de su aplicación. En estudios preliminares realizados dentro del proyecto se comprobó el alto contenido en LAL del caseinato sódico (alrededor de 300 ppm), comparado con el de los otros productos lácteos que podían ser añadidos a los quesos, que en ningún caso superaban las 90 ppm, de forma que el contenido en LAL en los quesos Mozzarella podría servir como índice de la adición de caseinato. Este método cromatográfico había sido utilizado previamente para la diferenciación del queso Mozzarella genuino del queso de imitación (Pellegrino y col., 1996).

La Figura 2.18 muestra los cromatogramas correspondientes a tres quesos Mozzarella: un queso Mozzarella de composición conocida sin LAL, el mismo queso al que se habían adicionado 300 ppm de LAL en proteína (muestra patrón) y un queso Mozzarella con un 15% de caseinato sódico añadido. Comparando el cromatograma del queso sin LAL y del queso con adición de 300 ppm de LAL (Fig 2.18*a,b*) se pueden observar en este último cromatograma dos picos de tiempos de retención de 28 y 29 min que corresponden a la molécula de LAL, que forma dos derivados que se separan en dos picos cromatográficos. En todos los cromatogramas aparece un pico grande con un tiempo de retención de 25 min, que corresponde a Lys (Pellegrino y col., 1996). Aunque en los cromatogramas aparece un gran número de picos, en la zona central no hay picos interferentes. Así, en el queso sin LAL no se observó ningún pico en la zona de elución de este compuesto. Por tanto, es posible detectar un queso Mozzarella con adición de caseinato sódico (Figura 2.18*c*), mediante el análisis de los dos picos de la LAL.

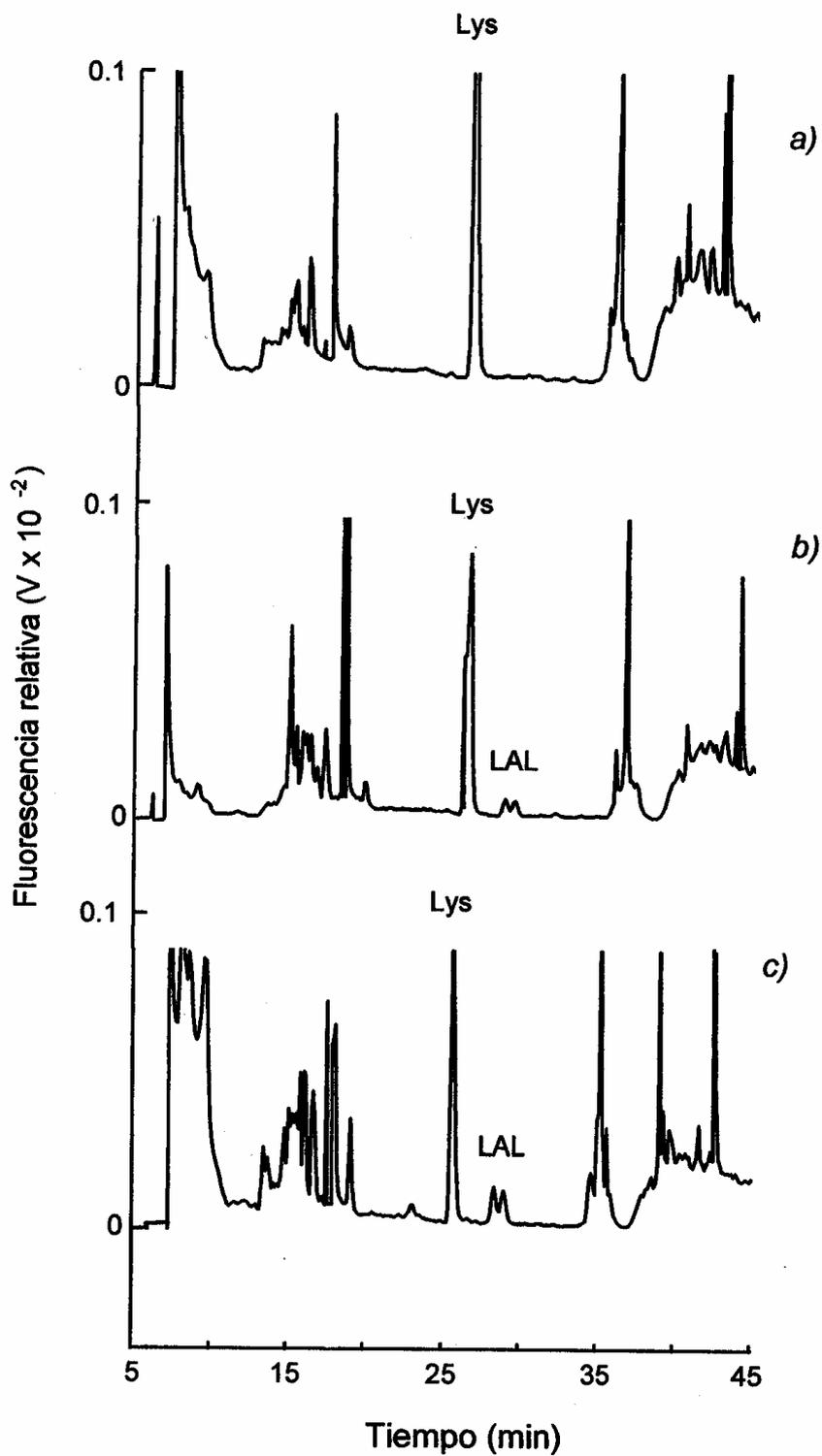


Figura 2.18 Cromatogramas obtenidos mediante RP-HPLC. *a)* Queso Mozzarella de composición conocida sin LAL; *b)* Queso Mozzarella con adición de 300 ppm de LAL; *c)* Queso Mozzarella con 15% de caseinato sódico añadido

Con el objeto de comprobar si el método era útil para determinar cuantitativamente la adición de caseína/caseinato a los quesos, se analizaron ocho quesos Mozzarella que tenían adiciones de 0%, 5%, 15% y 30% de caseinato sódico expresado en peso. Estos quesos Mozzarella procedían de un estudio colaborativo del proyecto SMT 4-CT97-2208 en el que participaban ocho laboratorios de diferentes países.

En el análisis de estas muestras de queso Mozzarella, se observó cierta variabilidad en los tiempos de retención de los picos de LAL y Lys en los cromatogramas. Este hecho produjo algunas dificultades, especialmente para la determinación de picos pequeños, que podían confundirse con ausencia de LAL en estas muestras de queso. El valor de RSD de los tiempos de retención de los dos picos de LAL considerados como un solo pico de una muestra de queso Mozzarella inyectada 4 veces fue de 5.6%. El valor de RSD de la cuantificación de LAL en ppm en una muestra inyectada 4 veces fue de 6.9%.

Los resultados obtenidos (Tabla 2.12) fueron poco satisfactorios y similares a los obtenidos por los otros laboratorios (Gilbert, 2000). Además de encontrarse falsos positivos y falsos negativos, hubo una gran dispersión en los resultados. Sin embargo, la aplicación de un test estadístico a los resultados de todos los laboratorios demostró que existían diferencias significativas entre los valores correspondientes al queso Mozzarella sin adición de caseinato y a los valores de LAL de los quesos que tenían adición. El método propuesto demostró pues su utilidad desde el punto de vista cualitativo para determinar la presencia de caseinato sódico en quesos Mozzarella.

Sin embargo, hay que considerar que el análisis es complejo y el personal encargado debe estar entrenado o poseer experiencia en las técnicas usadas, pues hay varias etapas en las que hay que tener especial cuidado. Entre ellas destacan:

1. Preparación de la muestra: La muestra debe ser homogénea y su valor de proteína debe ser calculado con exactitud, por lo que es importante establecer la relación de proteína en la muestra y la cantidad de HCl usada para hidrolizarla.

2. Derivatización: Es necesario asegurarse de que todo el HCl del hidrolizado es evaporado, para lograr un valor de pH alcalino en el momento de la derivatización con FMOC. También la relación proteína-FMOC es crucial.

3. Extracción en fase sólida: La muestra debe ser cargada con cuidado, el flujo de elución debe ser lento y constante, y asegurar el secado del cartucho entre las fases.

4. Separación cromatográfica: debe evitarse la contaminación, asegurarse de que la relación señal-ruido es mayor de 5, e inyectar blancos frecuentemente debido a la gran sensibilidad del detector de fluorescencia.

Tabla 2.12 Concentración de lisinoalanina (LAL) en ppm encontrada en muestras de queso Mozzarella de composición conocida mediante HPLC.

Muestra de queso Mozzarella (Contenido de caseinato sódico en %)	Proteína en el hidrolizado del queso (%)	Área del pico de LAL en el cromatograma (u a)	LAL en el queso (ppm)
Patrón	0.053	91586	300
1 (5%)	0.046	28678	47.6
2 (15%)	0.040	178948	341.4
3 (30%)	0.046	115580	191.8
4 (15%)	0.040	173369	330.8
5 (0%)	0.038	21212	42.6
6 (0%)	0.040	0	0
7 (30%)	0.051	128425	188.5
8 (5%)	0.038	0	0

n = 2

A continuación y a título de resumen global de los resultados obtenidos se muestran las posibilidades de las diferentes técnicas analíticas descritas anteriormente, considerando tanto el producto lácteo añadido como el producto adulterado, y el fundamento de la determinación (Tabla 2.13).

Tabla 2.13 Resumen de las posibilidades de diferentes técnicas analíticas para la detección de caseína/caseinato en quesos

Producto adulterado	Producto lácteo añadido	Determinación de κ -CN intacta			Determinación de para- κ -CN	Determinación de LAL
		IPG-IEF	CE	HPLC	CE	HPLC
Leche antes de ser tratada con cuajo	Caseína ácida	-	-	-	+	+
	Caseinato sódico	-	-	-	+	+
	Caseína de cuajo	-	-	-	+	+
Cuajada	Caseína ácida	+	+	+	-	+
	Caseinato sódico	+	+	+	-	+
	Caseína de cuajo	+	+	-	+	+
Queso fundido	Caseína ácida	+	+	+	-	-
	Caseinato sódico	+	+	+	-	-
	Caseína de cuajo	-	-	-	+	-

**CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN DE LECHE Y QUESOS MEDIANTE
LA CUANTIFICACIÓN DE LA β -LG Y LA PARA- κ -CN POR
ELECTROFORESIS CAPILAR**

3.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la CE está siendo aplicada para estudiar la proteólisis de la leche (Recio y col., 1997a) y para el seguimiento de la maduración de los quesos (Benfeldt y col., 1997; Broadbent y col., 1998; Otte y col., 1999; Gouldsworthy y col., 1999). Sin embargo, los métodos actualmente disponibles que proporcionan mejores resultados, que emplean tampones de pH ácido y aditivos, no permiten la determinación simultánea de la para- κ -CN y la β -Lg.

3.1.1 Índices de proteólisis en la leche cruda

Las bacterias psicrotrofas aisladas de leche cruda refrigerada son, en su mayoría, Gram negativas. El género *Pseudomonas* llega a ser el dominante en la leche cruda refrigerada tanto de vaca (Stadhouders, 1975) como de oveja (Núñez y col., 1984), y dentro de él la especie más común es *Ps. fluorescens*. Aunque es conocido que las proteinasas producidas por estas bacterias son las responsables de la proteólisis de la leche cruda, el recuento bacteriano no puede ser utilizado como indicador porque el número de psicrotrofos no se correlaciona con el número de bacterias que produce enzimas, el cual, además, es diferente según las cepas (Muir y col., 1979, Rowe y Gilmour, 1985).

Para la determinación de la proteólisis de la leche se ha propuesto la detección de las γ -CN mediante HPLC (Recio y col., 1996), aunque también puede realizarse mediante CE (Recio y col., 1997b). Estos productos de degradación se producen por la acción de la plasmina sobre las β -CN (Gufferty y Fox, 1988), pero algunas proteasas bacterianas también son capaces de actuar sobre ellas, aunque en menor medida (Grieve y Kitchen, 1985).

La determinación de CMP en la leche ha sido utilizada tanto para detectar la adición de suero dulce como para estimar la proteólisis de la leche cruda. Se han utilizado HPLC (Kawakami y col., 1992), FPLC (Léonil y Mollé, 1991) y técnicas inmunológicas (Picard y col., 1994, Prin y col., 1996), aunque en estas últimas para

la separación del CMP de la κ -CN era necesaria la UF de la leche. La caracterización de diferentes CMP (Recio y col., 2000) ha permitido aumentar el conocimiento de este grupo de productos de degradación que no sólo se producen por la acción del cuajo sino también por la actividad de otras enzimas proteolíticas de bacterias psicrotrofas sobre la κ -CN (Bengtsson y col., 1973; Renner y col., 1988).

De la misma manera y como producto de degradación de la κ -CN, la cuantificación de la para- κ -CN en la leche podría servir para determinar su grado de proteolisis.

Son escasos los métodos analíticos descritos que permiten una buena cuantificación de la para- κ -CN. Addeo y col., (1986) han determinado este producto de degradación para estimar la presencia y cuantificar la leche de vaca en quesos de leche de oveja mediante IEF. Sin embargo, si la muestra de queso tiene un alto grado de proteolisis debido a la formación de componentes peptídicos con pI similares al de la para- κ -CN, el contenido de leche de vaca es sobreestimado. Para solucionar este inconveniente se ha propuesto la utilización de geles con gradientes de pH entre de 6.8 a 7.8 y de 6.3 a 7.3, o la utilización de equipos automáticos como el PhastSystem, que permite realizar análisis rápidos y sensibles (Addeo y col., 1990). El IEF, la cromatografía de intercambio iónico y más recientemente la CE (Molina y col., 2000) se han utilizado para la diferenciación de la leche de vaca, oveja y cabra en quesos mediante la determinación de las diferentes para- κ -CN.

En los métodos de CE propuestos hasta el momento, la para- κ -CN comigra con la β -Lg, lo que impide su cuantificación. Sería interesante desarrollar un método de CE que permitiera evaluar el grado de proteolisis de una leche mediante la determinación de la este producto de degradación.

3.1.2 Tecnologías empleadas en la elaboración de los quesos frescos

Los procedimientos tecnológicos de elaboración de quesos frescos desarrollados en los últimos años van encaminados a incrementar el rendimiento

quesero mediante una mayor incorporación de las proteínas de suero. Así, en el caso del queso Quarg existen varios procedimientos para conseguirlo (Guinee y col., 1993):

- Procedimiento Westfalia Thermoprocess, o Thermoquarg: La leche se calienta a 95-98° C durante 2-3 min, la leche coagulada (de pH 4.6) se calienta a 60 °C durante 3 min y se enfría a la temperatura en la que se realiza la separación (25 °C). Este procedimiento permite recuperar un 50-60% de las proteínas del suero en el queso.

- Procedimiento Centriwhey: El suero se calienta a 95 °C para precipitar las proteínas séricas. Estas se recuperan por centrifugación en forma de concentrado (12-14% de sólidos) que se añaden a la leche destinada a fabricar el queso.

- Procedimiento Lactal: El suero se calienta a 95° C para precipitar las proteínas de suero, que se dejan depositar. Una decantación parcial del suero permite obtener un concentrado con 7-8% de sólidos. Este se concentra a un Quarg de suero (17-18% de sólidos) que se mezcla con el Quarg en una proporción de un 10%.

Los métodos utilizados hasta el momento para distinguir los quesos elaborados con un sistema tradicional de los sometidos a algún procedimiento que empleara calor estaban basados en la presencia de las proteínas nativas en la fracción soluble a pH 4.6. La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), la electroinmunodifusión y los métodos de ELISA han dado buenos resultados (Heinert y col., 1986). Sin embargo, el análisis de la fracción caseínica podría proporcionar una medida directa de la cantidad de proteínas de suero desnaturalizadas presentes en el queso, mediante un método que permitiera el análisis de la α -La y, especialmente, de la β -Lg sin interferencia con la para- κ -CN.

Otro procedimiento cada vez más frecuente en la elaboración de los quesos frescos es la UF de la leche, pues permite obtener un mayor rendimiento quesero (Figura 3.1).

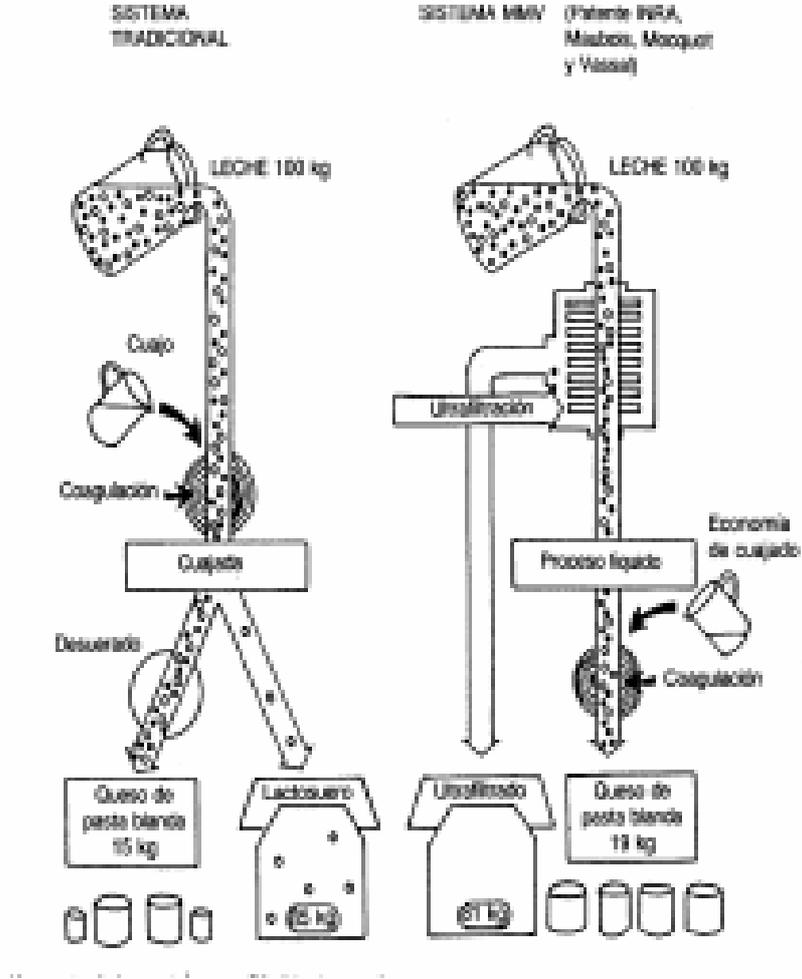


Figura 3.1 Elaboración de quesos frescos a partir de leche ultrafiltrada.

La UF de la leche ya coagulada es cada vez más utilizada en la elaboración de los quesos frescos, lo que permite una completa recuperación de las proteínas de suero en el queso (Salvadori del Prato, 1993). El aumento de la concentración de las proteínas solubles que se obtiene con la UF aumenta su poder tamponador, por lo que para alcanzar el pH de coagulación se necesita una mayor cantidad de ácido láctico. Para obviar este inconveniente se recurre a la preconcentración mediante UF de la leche preacidificada (a pH 5.7), seguida del procedimiento normal (Salvadori del Prato, 1993).

En el queso Quarg, si este proceso se aplicara directamente, el producto resultante tendría una consistencia demasiado débil, debido a la baja capacidad de las proteínas de suero nativas de formar geles. Por ello, los fabricantes de los equipos de UF recomiendan someter a la leche a un elevado tratamiento térmico (95 °C durante 3-5 min), con el fin de favorecer la unión de las proteínas de suero desnaturalizadas a las caseínas, lo que proporciona al conjunto unas adecuadas propiedades gelificantes que dan lugar a un producto similar al obtenido mediante los métodos tradicionales.

En los quesos de Burgos el proceso de elaboración tradicional incluye un tratamiento térmico de 75-78 °C durante 16-22 seg (Marcos y Esteban, 1993) que no es suficiente para producir una desnaturalización de las proteínas de suero pero, con el desarrollo de las tecnologías de membrana, es cada vez más frecuente el empleo de la UF de la leche para su elaboración.

3.2 OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

Para llevar a cabo el objetivo parcial **“Caracterización de leche y quesos en relación con el proceso tecnológico seguido en su elaboración mediante la cuantificación simultánea de la β -Lg y la para- κ -CN por CE”** se ha seguido el siguiente plan de trabajo:

-Desarrollo de un método de CE que permita cuantificar simultáneamente la β -Lg y la para- κ -CN.

-Aplicación del método de CE desarrollado a leches crudas con diferente calidad microbiológica y caracterización de los productos de degradación resultantes.

-Caracterización mediante CE de quesos elaborados con distintas tecnologías.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Muestras

3.3.1.1 Muestras de referencia

Para el desarrollo del método de CE se utilizó una muestra modelo preparada con 18 mg de caseína de cuajo y 300 µl de leche pasteurizada comercial. La caseína de cuajo [2.3.2.2.2 Instrumentación y método](#) se describe en el apartado 2.3.1.2.1. Para el análisis cuantitativo se utilizaron β-Lg comercial (Sigma) y para-κ-CN obtenida a partir de la κ-CN aislada en el laboratorio como se describe en el apartado 2.3.1.1. El contenido en proteína de la β-Lg y la para-κ-CN se determinó mediante análisis elemental (Servicio de Microanálisis del Centro Nacional de Química Orgánica, CSIC). Para los sistemas modelo se utilizó κ-CN (Sigma).

3.3.1.2 Sistemas modelo

Se preparó una disolución de 3 mg/ml de κ-CN (Sigma) en tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 6.8. Esta disolución se trató tanto con quimosina cristalina (3.2.23.4) (Sigma) con una relación enzima:sustrato de $4.6 \cdot 10^{-3}$ unidades/mg de κ-CN, como con un extracto libre de células de *Pseudomonas fluorescens* B52 cedido por la Dra. Carmen San José del Departamento de Nutrición y Bromatología III, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid con una relación enzima:sustrato de 1:250 (v/v). Los sistemas modelo se incubaron a 37 °C durante 30 min y se tomaron muestras a 0, 10, 15 y 30 min.

3.3.1.3 Muestras de leche

Se analizaron cuatro muestras de leche cruda que habían sido almacenadas a 6 °C durante 4 días (apartado 1.2.1.2.5.) y varias muestras de leche cruda

procedente de la Ganadería Priégola de Villanueva del Pardillo (Madrid) almacenadas en refrigeración hasta 13 días, tomando muestra cada día.

3.3.1.4 Muestras de queso

Se analizaron quince quesos comerciales, cuatro de tipo Quarg, cinco quesos frescos tipo Burgos y seis quesos Mozzarella.

3.3.2 Métodos de análisis

3.3.2.1 Espectroscopía de masas acoplada con HPLC (HPLC-ESI-MS)

3.3.2.1.1 Preparación de la muestra

Las muestras de κ -CN tratada con quimosina o con el extracto de *Pseudomonas* se disolvieron (1mg/ml) en un tampón imidazol 100mM (pH 7). Se trataron con una solución (1mg/ml) de tripsina (3.4.21.4) (Sigma) con una relación enzima:sustrato de 1:100 (v/v) durante 12 horas. Después, se disolvieron en una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 1%.

3.3.2.1.2 Instrumentación y método

El análisis de las masas moleculares se llevó a cabo en un equipo HP serie 1100 MSD (Hewlett Packard) de HPLC-ESI-MS. Se utilizó una columna Hi-Pore RP-318 de dimensiones 250 × 4.6 mm (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA 94547, USA). Las fases móviles A y B fueron mezclas de agua/ácido acético (1%) y acetonitrilo/ácido acético (1%), respectivamente. Se empleó un gradiente lineal de 0 a 50% de B en 50 min. El volumen de inyección de la muestra fue de 20 μ l. El análisis se realizó mediante espectroscopía de masas directa, en modo positivo. El voltaje capilar se mantuvo a 4000 V, la presión del nebulizador a 40 psi y la

temperatura y flujo del gas de secado fueron de 320 °C y 10 litros/min, respectivamente. La adquisición y el análisis de los datos se realizó mediante el programa HPChem Stations (Hewlett Packard).

3.3.2.2 Electroforesis capilar

3.3.2.2.1 Preparación de la muestra

Tanto las muestras de leche (incluida la muestra modelo) como las muestras de queso se prepararon como se describe en los capítulos anteriores. El tampón de la muestra está descrito en el apartado 1.3.2.6.1.

3.3.2.2.2 Instrumentación y método

El análisis y desarrollo del método fue realizado en un equipo Beckman P/ACE MDQ como se describe en el apartado 1.3.2.6.2, cambiando algunas condiciones que se describen a continuación. Se prepararon diferentes tampones de separación, compuestos por una disolución de ácido cítrico y citrato trisódico (Sigma) en solución de urea (Sigma) (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Tampones de separación utilizados en los ensayos del desarrollo del método de CE.

Ensayo	Concentración final de urea	Concentración de ácido cítrico/citrato	pH
1	6 M	0.19 M/20 mM	3.0 ± 0.05
2	6 M	0.32 M/10 mM	2.6 ± 0.05
3	6 M	0.48 M/13.6 mM	2.4 ± 0.05
4	4.8 M	0.48 M/13.6 mM	2.3 ± 0.05
5	3.4 M	0.48 M/13.6 mM	2.2 ± 0.05
6	4.8 M	0.38 M/9.5 mM	2.3 ± 0.05
7	4.8 M	0.32 M/13.6 mM	2.4 ± 0.05

También se utilizaron 25 y 30 kV como voltajes de separación.

Para evaluar la eficacia de la separación entre la β -Lg y la para- κ -CN, se calculó su coeficiente de resolución (R) según la siguiente fórmula:

$$R = \frac{t_2 - t_1}{\frac{W_1 + W_2}{2}}$$

donde

t_1 = tiempo de migración de la β -Lg

t_2 = tiempo de migración de la para- κ -CN

W_1 = anchura en la base del pico de la β -Lg

W_2 = anchura en la base del pico de la para- κ -CN

3.3.2.2.3 Cuantificación

Para establecer las curvas de calibrado se prepararon disoluciones de β -Lg y para- κ -CN en tampón de la muestra (10 mg/mg) teniendo en cuenta el contenido de proteína, que fue de 91.0 y 84.4%, respectivamente. Se añadió β -Lg y para- κ -CN a una disolución de caseína isoelectrica en seis proporciones diferentes (concentración final de β -Lg de 0.09 a 2.28 mg/ml y de para- κ -CN de 0.84 a 2.11 mg/ml). Las regresiones lineales entre las áreas corregidas (A_c) y las concentraciones se establecieron utilizando el programa Microsoft Excel 7.0.

La exactitud media del método se calculó como se describe en el apartado 1.2.2.7. mientras que la repetibilidad y la reproducibilidad se calcularon mediante la inyección de la muestra modelo 4 veces consecutivas y en 4 días diferentes, respectivamente. La determinación del límite de detección y la señal de detección del método se realizó como se describe en apartado 2.2.2.2.3.

La recuperación se calculó mediante el cociente entre la cantidad de proteína (β -Lg o para- κ -CN) encontrada y la concentración añadida a una disolución de caseínas, multiplicado por 100. Se añadieron 0.5 y 1 mg/ml de β -Lg y para- κ -CN.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Selección de las condiciones del análisis

Puesto que el método de CE utilizado hasta este momento no permitía la cuantificación de la β -Lg y la para- κ -CN si ambas se encontraban en las muestras de leche o de los quesos, se modificaron algunas condiciones para poder separarlas.

Para la selección de las condiciones de análisis se utilizó una muestra modelo preparada con caseína de cuajo y leche pasteurizada. Como punto de partida se analizó la muestra en las condiciones del método de Recio y Olieman (1996), modificando a continuación algunos parámetros: la composición del tampón de separación, el voltaje utilizado y el tipo de capilar.

3.4.1.1 Influencia del pH del tampón de separación

La Figura 3.2 muestra los electroforegramas correspondientes al análisis de la muestra modelo utilizando diferentes tampones de separación (Tabla 3.1). En las condiciones del ensayo 1 (pH 3), la para- κ -CN comigra con la β -Lg (Fig 3.2a). Cuando se hizo descender el pH del tampón, incrementando la concentración de ácido cítrico (ensayo 2, pH 2.6), se separaron la β -Lg y la para- κ -CN. La resolución entre ellas, calculada como el cociente de la diferencia de tiempos de migración dividido entre la media de la anchura en la base del pico fue de 1.17 (Figura 3.2b). Este pH menor favorece la diferencia de cargas entre la β -Lg y la para- κ -CN. En cambio, las cargas de la κ -CN y la β -CN B se aproximan. En estas condiciones el tiempo de análisis aumentó ligeramente, debido a la compresión de la doble capa iónica, por la mayor fuerza iónica del medio. En las condiciones del ensayo 3 (pH 2.4) la β -Lg y la para- κ -CN se separaron completamente, siendo la resolución de 1.34 (Figura 3.2c).

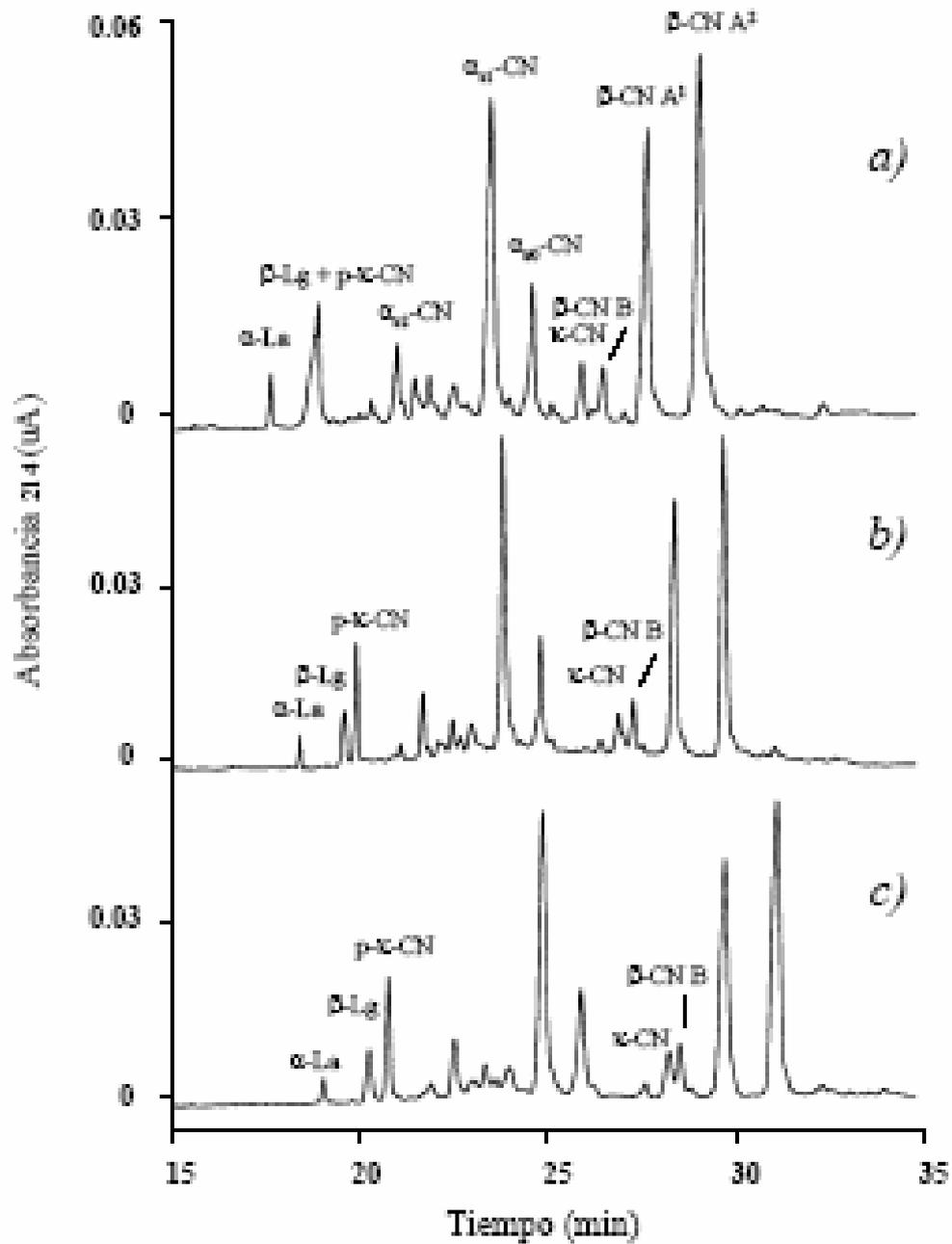


Figura 3.2 Electroforegramas de la muestra modelo analizada por CE mediante el empleo de un tampón de separación con urea 6M y diferentes concentraciones de ácido cítrico/citrato: *a)* ácido cítrico 0.19M/citrato trisódico 20 mM, pH 3.0 ± 0.05 ; *b)* ácido cítrico 0.32M/citrato trisódico 10 mM, pH 2.6 ± 0.05 y *c)* ácido cítrico 0.50M/citrato trisódico 13.6 mM, pH 2.4 ± 0.05 . Voltaje de separación 25 kV.

3.4.1.2 Influencia de la concentración de urea del tampón de separación

Es conocido que la viscosidad se relaciona con el tiempo de migración de los solutos porque afecta a la velocidad del fluido dentro del capilar. De acuerdo con la ecuación de Hagen-Poiseuille's, la viscosidad es inversamente proporcional a la velocidad. Con el fin de reducir el tiempo de análisis del método en el tampón de separación se mantuvo el pH de 2.4 pero se disminuyó la concentración de urea para reducir su viscosidad. El empleo de un tampón de idéntica composición al del ensayo 3 con una concentración de urea de 4.8 M (ensayo 4) proporcionó tiempos de análisis más cortos (Fig 3.3*a,b*). Además, la resolución entre la β -Lg y la para- κ -CN aumentó considerablemente (1.72), aunque los picos de κ -CN y β -CN B migraron juntos. Este nuevo tampón tenía un pH de 2.3, lo que indica que una menor concentración de urea permite alcanzar valores de pH más bajos.

Un tampón con una concentración de urea todavía menor (3.4 M) mejoró la separación entre la β -Lg y la para- κ -CN, alcanzándose una resolución de 2.4 (ensayo 5). Sin embargo la forma de los picos de α_{s1} -CN y α_{s0} -CN se vio afectada, pues eran de menor tamaño a los obtenidos en los análisis anteriores y con falta de simetría (Fig 3.3*c*). Este hecho podría ser debido a la precipitación de la α_{s1} -CN y la α_{s0} -CN originada por la baja concentración de urea (Swaisgood, 1992). Con el propósito de evitar la precipitación de proteínas en los capilares, en el tampón de separación se mantuvo una concentración de urea de 4.8M.

Puesto que con esta concentración de urea se podría alcanzar el pH 2.3 utilizando una menor concentración de ácido cítrico, que proporcionaría tiempos de análisis más cortos, se probaron tampones de separación que tenían concentraciones de 0.38 y 0.32 M de ácido cítrico (ensayos 6 y 7, respectivamente). Sin embargo, su efecto sobre la separación de la β -Lg y la para- κ -CN fue negativo, obteniéndose coeficientes de resolución de 1.29 y 1.14, respectivamente. Este hecho hizo que se considerara que la concentración óptima en el tampón de separación era 0.48 M de cítrico y 13.6 mM de citrato (ensayo 4).

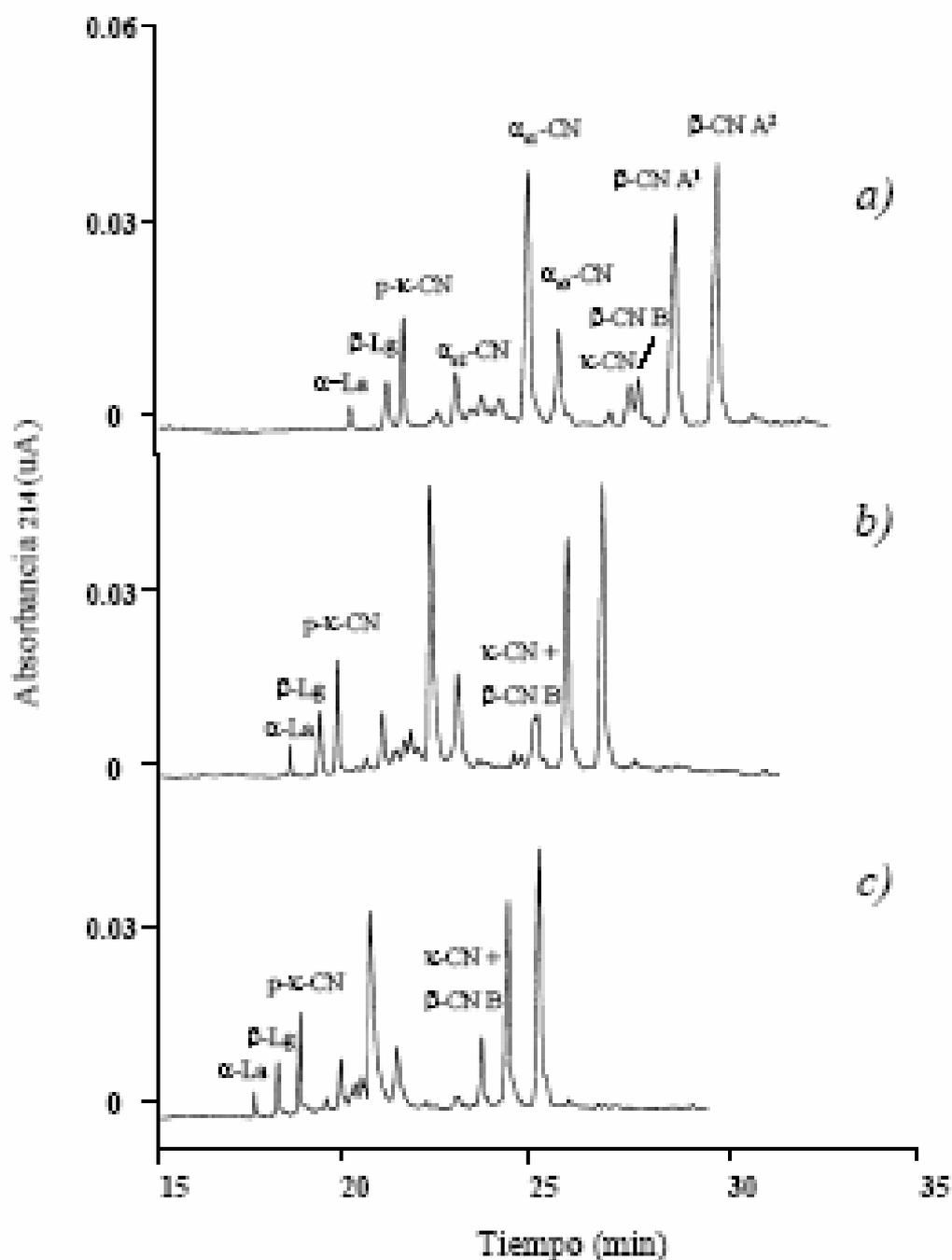


Figura 3.3 Electroforegramas de la muestra modelo analizada mediante CE utilizando un tampón de separación con ácido cítrico/citrato 0.48M / 13.6 mM y diferentes concentraciones de urea. a) Urea 6M, pH 2.4 ± 0.05 ; b) Urea 4.8M, pH 2.3 ± 0.05 y c) Urea 3.4 M, pH 2.2 ± 0.05 . Voltaje de separación 25 kV.

3.4.1.3 Influencia del voltaje de la separación

Otra alternativa para reducir el tiempo de análisis es incrementar la intensidad del campo eléctrico. Cuando se aumentó el voltaje a 30 kV el análisis de la muestra modelo fue cinco min más corto, manteniéndose la buena separación conseguida entre las proteínas y aunque la resolución entre la β -Lg y la para- κ -CN disminuyó, su valor seguía siendo aceptable (1.29). Por tanto, dependiendo de las características de la muestra, es necesario llegar a un compromiso entre la resolución y el tiempo de análisis. Se decidió utilizar un voltaje de 25 kV porque proporciona la máxima resolución, lo que es muy importante en el análisis de muestras de leche que contengan gran cantidad de β -Lg desnaturalizada, como en el caso de leche UHT.

Por tanto, se eligieron como condiciones del nuevo método de CE el empleo de un tampón de separación compuesto de ácido cítrico 0.48 M, citrato trisódico 13.6 M, urea 4.8 M (pH 2.3 ± 0.05) y un voltaje de separación de 25 kV.

3.4.1.4 Influencia del recubrimiento interno del capilar

Dado el bajo pH utilizado, podría considerarse que la carga de las paredes del capilar es nula, por lo que podría utilizarse un capilar sin recubrir, que es menos costoso. Otte y col., (1997) y Gouldsworthy y col., (1999) han utilizado capilares sin recubrir al utilizar tampones de separación con valores de pH alrededor de 2.5. En la separación electroforética de la muestra modelo utilizando un capilar recubierto hidrofílicamente y un capilar sin recubrir no se encontraron diferencias entre los perfiles proteicos obtenidos con los dos capilares, por lo que se asumió que el análisis podría realizarse también con un capilar vacío. Sin embargo, debido a la falta de reproducibilidad de los capilares vacíos comerciales y a los buenos resultados encontrados con los capilares recubiertos hidrofílicamente, se continuó utilizando éstos últimos.

3.4.2 Cuantificación de la β -Lg y la para- κ -CN

Se analizaron β -Lg y para- κ -CN disueltas en una solución de caseína isoeléctrica en concentraciones de 0.09 a 2.28 mg/ml y de 0.84 a 2.11 mg/ml, respectivamente. Los resultados del análisis de regresión entre las áreas corregidas (A_c) de β -Lg y para- κ -CN y sus concentraciones obtenidos en este método de CE se recogen en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Resultados del análisis de regresión lineal entre las áreas corregidas de β -Lg y para- κ -CN y sus concentraciones modelo $Y_n = a + b$ (% PS/PT).

Proteína	a	b	R ²
β -Lg (n = 10)	256 \pm 77.54	4299 \pm 70.77	0.999
para- κ -CN (n = 10)	64 \pm 54.42	3752 \pm 56.50	0.999

Los valores correspondientes a los límites de detección y señal de detección asociados al análisis de regresión, así como la exactitud media calculada como el cociente entre el valor obtenido en los puntos de calibrado dividido entre el valor real, se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Límite de detección, señal de detección y exactitud media asociados a las curvas de calibrado en la cuantificación de β -Lg y para- κ -CN mediante el método de CE desarrollado.

Determinación	β -Lg	para- κ -CN
Límite de detección	0.16 mg/ml	0.14 mg/ml
Señal de detección	612.1 u.a.	328.3 u.a.
Exactitud media (n=10)	99.54%	105.18%

Con el fin de evaluar si la determinación de la β -Lg y la para- κ -CN en muestras de leche podría verse afectada por la adsorción de estas proteínas a la pared del capilar, se realizó el análisis de una caseína isoeléctrica antes y después de la adición de dos cantidades diferentes (0.5 y 1.0 mg/ml) de β -Lg y para- κ -CN, de donde se obtuvieron dos valores de recuperación. Los valores de repetibilidad y reproducibilidad del método (expresados como RSD) se obtuvieron mediante la inyección de la muestra modelo 4 veces consecutivas y en 4 días diferentes, respectivamente (Tabla 3.4).

Tabla 3.4 Recuperación, repetibilidad y reproducibilidad en la cuantificación de β -Lg y para- κ -CN mediante el método de CE desarrollado.

	Determinación	β -Lg	para- κ -CN
Recuperación	Cantidad añadida		
	0.5 mg/ml	84 %	86 %
	1.0 mg/ml	103%	110%
Repetibilidad	Tiempos de migración (n=5)	0.3	0.3
	Áreas corregidas (n=5)	2.5	1.3
Reproducibilidad	Tiempos de migración (n=5)	1.7	1.6
	Áreas corregidas (n=5)	2.8	1.3

Estos datos demostraron la posibilidad de cuantificar la β -Lg y la para- κ -CN mediante el método de CE desarrollado.

3.4.3 Aplicación del método de CE a leches crudas. Caracterización de distintas formas de para- κ -CN

La Figura 3.4 muestra los perfiles electroforéticos de una de las muestras de leche cruda almacenada en refrigeración durante 0, 2 y 4 días.

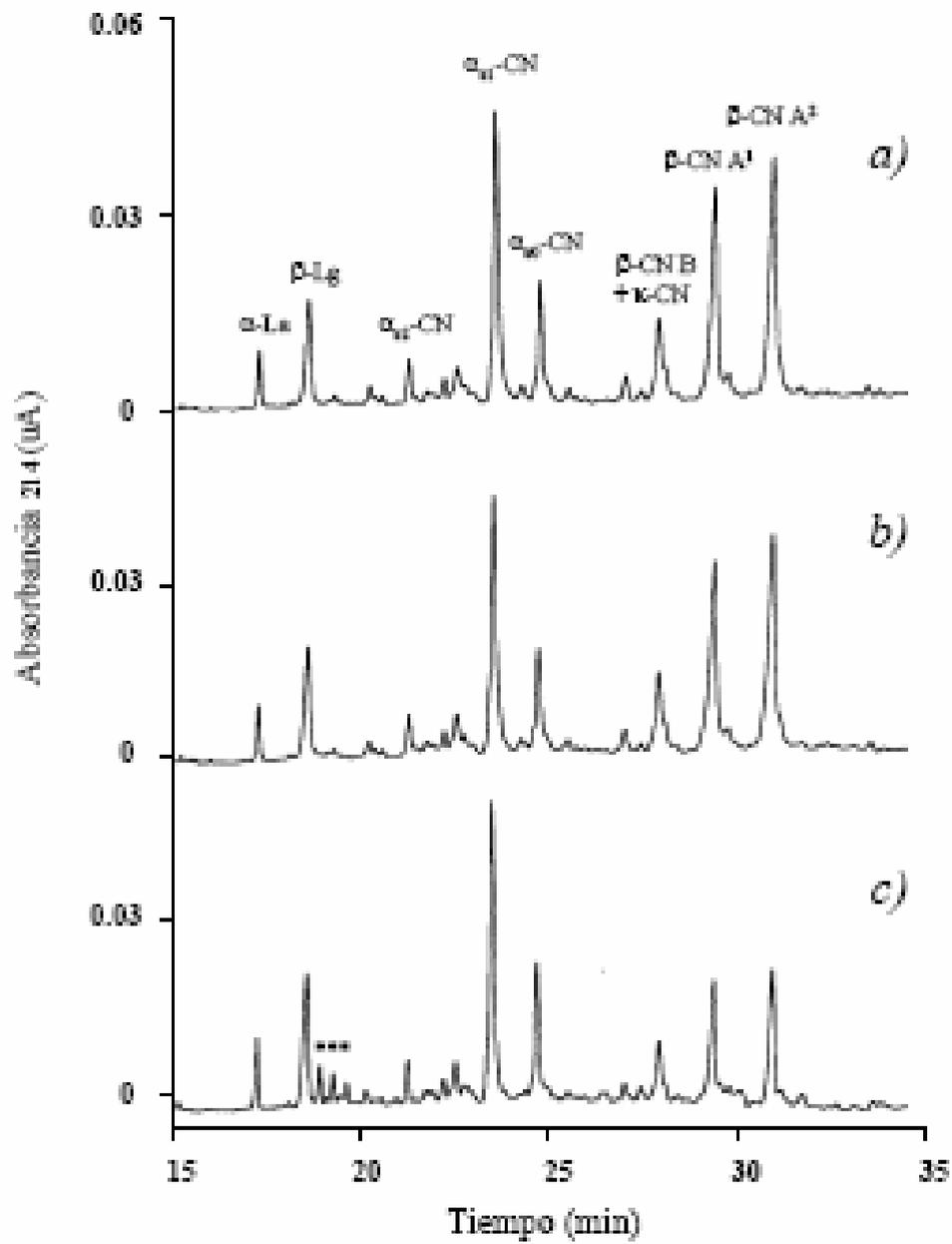


Figura 3.4 Separación electroforética de una muestra de leche cruda almacenada a 6° C. a) 0 días, b) 2 días, c) 4 días. Condiciones de separación descritas en el apartado 3.4.1.3.

En la muestra almacenada durante 4 días puede observarse la aparición de algunos picos que migran después del pico de la β -Lg y cuyos tiempos de migración están cercanos al que tiene la para- κ -CN en estas condiciones (*). Otros experimentos de almacenamiento refrigerado de leche cruda dieron lugar a la aparición de picos similares, aunque en el caso de leches de mejor calidad microbiológica que las mostradas estos picos no podían observarse hasta los 8 días de almacenamiento.

En recientes estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio, se han caracterizado varios fragmentos relacionados con el CMP producidos por la hidrólisis de la cadena de la κ -CN por una proteasa de *Ps. fluorescens*: f(104-169), f(105-169), f(106-169), f(107-169) y f(108-169). Esto ha confirmado que las proteasas producidas por las bacterias psicrotrofas de la leche son capaces de hidrolizar el enlace más sensible a la acción de la quimosina (105-106) y otros enlaces próximos a él (103-104, 104-105, 106-107 y 107-108) (Recio y col., 2000). Estos resultados nos llevaron a pensar que los picos que migraban después de la β -Lg en las muestras de leche cruda almacenadas podrían ser los fragmentos complementarios en la secuencia de la κ -CN (para- κ -CN). Para evaluar esta posibilidad se plantearon dos sistemas modelo, en los que se trató κ -CN con quimosina o con un extracto extracelular de *Ps. fluorescens* B-52 durante 0, 10, 15 y 30 min. Estas muestras se analizaron mediante CE. Mientras que en la muestra tratada con quimosina a los 10 min había desaparecido el pico de κ -CN y aparecía un único pico de para- κ -CN (Figura 3.5A), en la muestra tratada con el extracto bacteriano puede observarse la progresiva disminución del pico de κ -CN y la aparición, además de para- κ -CN, de varios picos de tiempos de migración cercanos (Fig 3.5B). Estos picos eran similares a los encontrados en las muestras de leche almacenada.

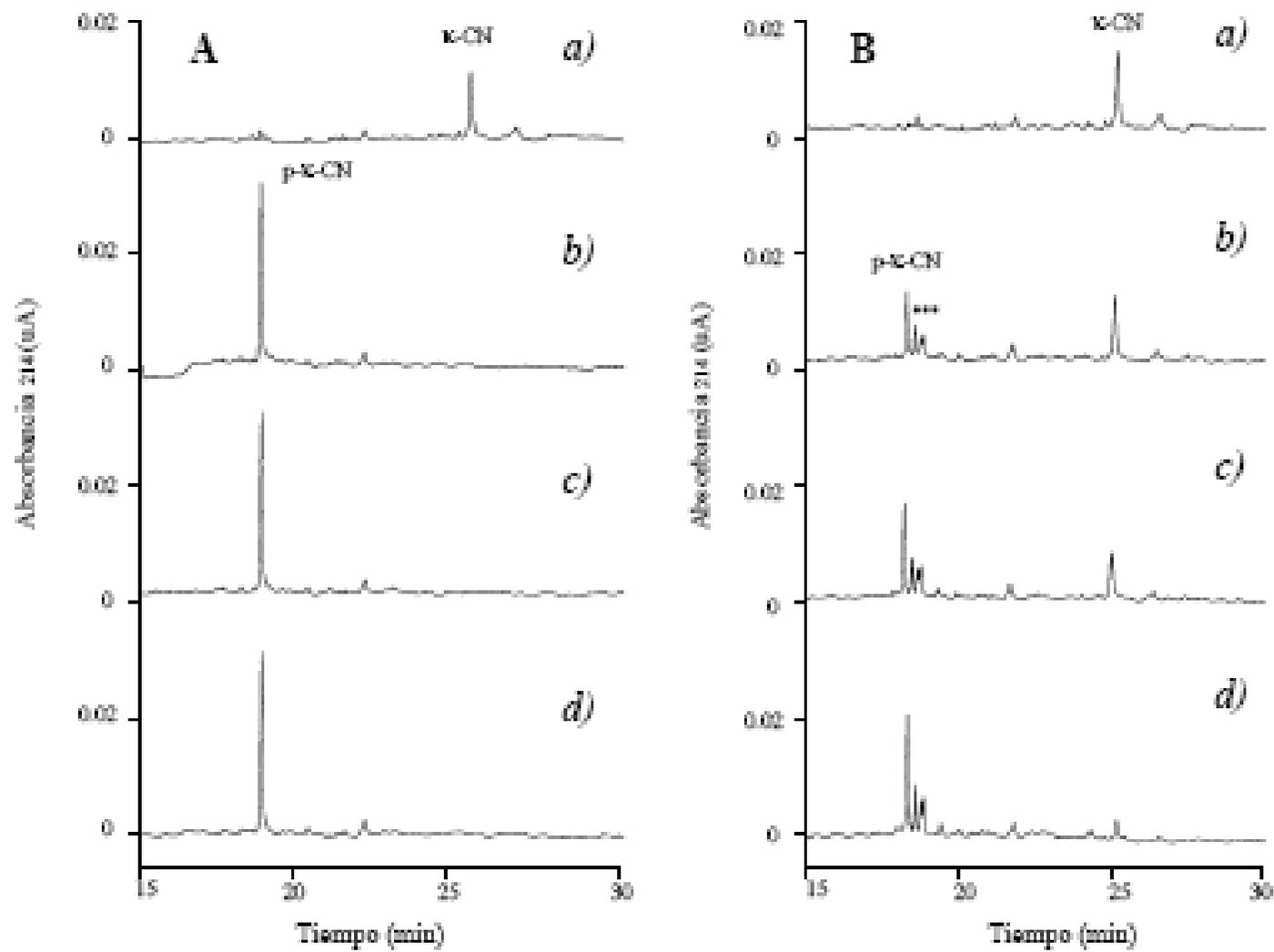


Figura 3.5 Separación electroforética de κ -CN en incubación a 37° C con A) Quimosina B) Un extracto extracelular de *Pseudomonas fluorescens* B52 durante a) 0 min; b) 10 min; c) 15 min; d) 30 min. Condiciones de separación descritas en el apartado 3.4.1.3.

3.4.3.1 Análisis mediante HPLC-ESI-MS

Para poder identificar los picos observados mediante CE, se decidió analizar los precipitados de la κ -CN tratada con quimosina y con el extracto extracelular de *Ps fluorescens* mediante HPLC-ESI-MS, con el fin de comprobar si las masas obtenidas correspondían con la secuencia conocida de la κ -CN (Mercier y col., 1973). Para mejorar la exactitud de la determinación, puesto que los distintos productos de degradación, con alrededor de 105 residuos, se diferenciarían únicamente en un aminoácido, se decidió trabajar con los hidrolizados trípticos de los dos tipos de muestra.

Por la especificidad de la tripsina por los ésteres de lisina y arginina, uno de los péptidos que puede formarse con su actuación sobre la molécula de κ -CN es el fragmento 98-111 (Figura 3.6). Si sobre la κ -CN hubiera actuado previamente la quimosina, el enlace 105-106 se habría hidrolizado, por lo que únicamente se encontraría el fragmento 98-105. En el caso de la κ -CN tratada con la proteasa de *Ps. fluorescens*, debido a su capacidad de hidrolizar varios enlaces, podrían encontrarse péptidos con el mismo residuo inicial pero diferente aminoácido final (98-x).

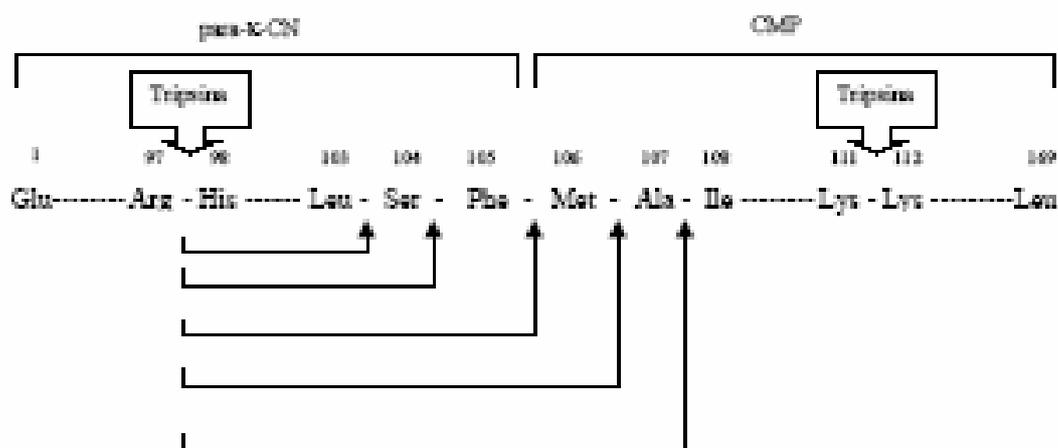


Figura 3.6 Esquema de los péptidos que pueden formarse con la combinación de la acción de la proteasa de *Pseudomonas fluorescens* y la tripsina sobre la molécula de κ -CN.

La Figura 3.7 muestra los cromatogramas obtenidos mediante HPLC-ESI-MS de los hidrolizados trípticos de las muestras de κ -CN tratada con proteasa de *Ps. fluorescens* (Figura 3.7a) y con quimosina (Figura 3.7b). Como era de esperar, la mayoría de los picos fueron comunes a las dos muestras. Sin embargo, en el análisis de la muestra tratada con la proteasa bacteriana podía observarse la aparición de tres nuevos picos cromatográficos (picos 1, 2 y 4, Fig 3.7a).

Los espectros de masas obtenidos para estos picos correspondían con las masas de los fragmentos 98-104 y 98-103 (correspondientes a su vez con la para- κ -CN con uno y dos aminoácidos menos, respectivamente) y a los fragmentos 98-106 y 98-107 (correspondientes a para- κ -CN con uno y dos aminoácidos más, respectivamente) (Tabla 3.5). En el pico 3 de ambas muestras se obtuvo una masa correspondiente al fragmento 98-105 (para- κ -CN), lo que concuerda con la capacidad de la quimosina y de la proteasa bacteriana de hidrolizar el enlace 105-106. La mayor abundancia relativa del pico correspondiente a este péptido en la muestra de κ -CN tratada con quimosina puede deberse a que en este caso es el único producto formado (Figura 3.7).

Tabla 3.5 Masas observadas y asignaciones a los diferentes fragmentos de la κ -CN de los hidrolizados trípticos de κ -CN tratada con cuajo y proteasa extracelular de *Pseudomonas fluorescens* B52 mediante HPLC-ESI-MS.

Pico HPLC-ESI-MS (<i>Ps. fluorescens</i>)	Pico HPLC-ESI-MS (Quimosina)	Masa observada	Fragmento de κ -CN asignado	Masa teórica
1	-	824.4	κ -CN f (98-104)	823.9
2	-	735.0	κ -CN f (98-103)	736.8
3	3	971.0	κ -CN f (98-105)	971.1
4	-	1102.0	κ -CN f (98-106)	1102.3
4	-	1173.0	κ -CN f (98-107)	1173.4

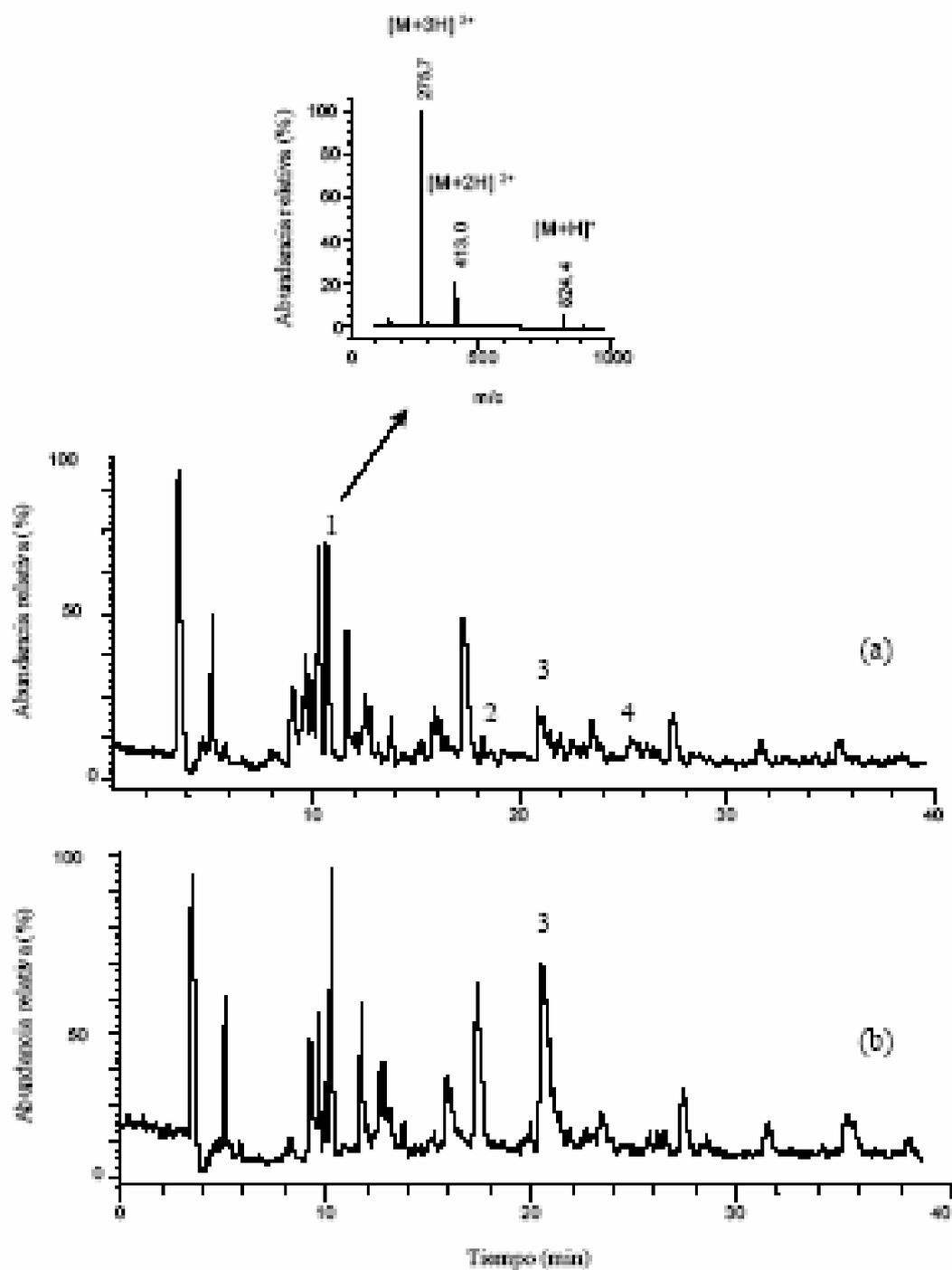


Figura 3.7 Cromatogramas obtenidos mediante HPLC-ESI-MS de κ -CN tratada con *a)* un extracto de *Ps. fluorescens* B-52 y *b)* quimosina. Espectro de masas obtenido para el pico 1. m/c = relación masa/carga.

Los resultados obtenidos en este sistema modelo indican la presencia de los fragmentos 98-103, 98-104, 98-105, 98-106 y 98-107 de la κ -CN en una muestra de esta proteína tratada con un extracto de *Ps. fluorescens*, lo que podría corresponder con los 4 picos encontrados mediante el método de CE desarrollado, pues en un pico podría migrar más de una especie. Estas masas podrían ser indicativas de la presencia de cinco fragmentos correspondientes a para- κ -CN que son complementarios a los fragmentos de CMP encontrados por otros autores (Recio y col., 2000b). Este estudio confirma que las proteasas de bacterias psicrotrofas, además de ser capaces de hidrolizar los enlaces 103-104, 104-105, 106-107 y 107-108 de la κ -CN, también actúan sobre el enlace más lábil a la acción de la quimosina (105-106). Por lo tanto, la presencia de los picos con tiempos de migración cercanos al de la para- κ -CN en el electroforegrama de una muestra de leche podrían atribuirse a la actividad proteolítica de bacterias psicrotrofas.

3.4.4 Caracterización de quesos

Las muestras de queso presentan a menudo el problema de contener, además de para- κ -CN, proteínas de suero desnaturalizadas, lo que dificulta su caracterización. Con el fin de evaluar las posibilidades del nuevo método de CE desarrollado, se analizaron algunas muestras de queso elaboradas con diferentes tecnologías.

3.4.4.1 Quesos frescos

La Figura 3.8 muestra la separación electroforética de la fracción caseínica de tres quesos frescos comerciales, un queso tipo Burgos (Fig 3.8a) y dos quesos Quarg (Fig 3.8b,c). Aunque los quesos tipo Quarg y los frescos tipo Burgos son organolépticamente diferentes, los perfiles proteicos obtenidos mediante CE son parecidos (Fig 3.8a,b). Sin embargo, algunos picos característicos permiten tener un conocimiento del proceso tecnológico seguido en su elaboración.

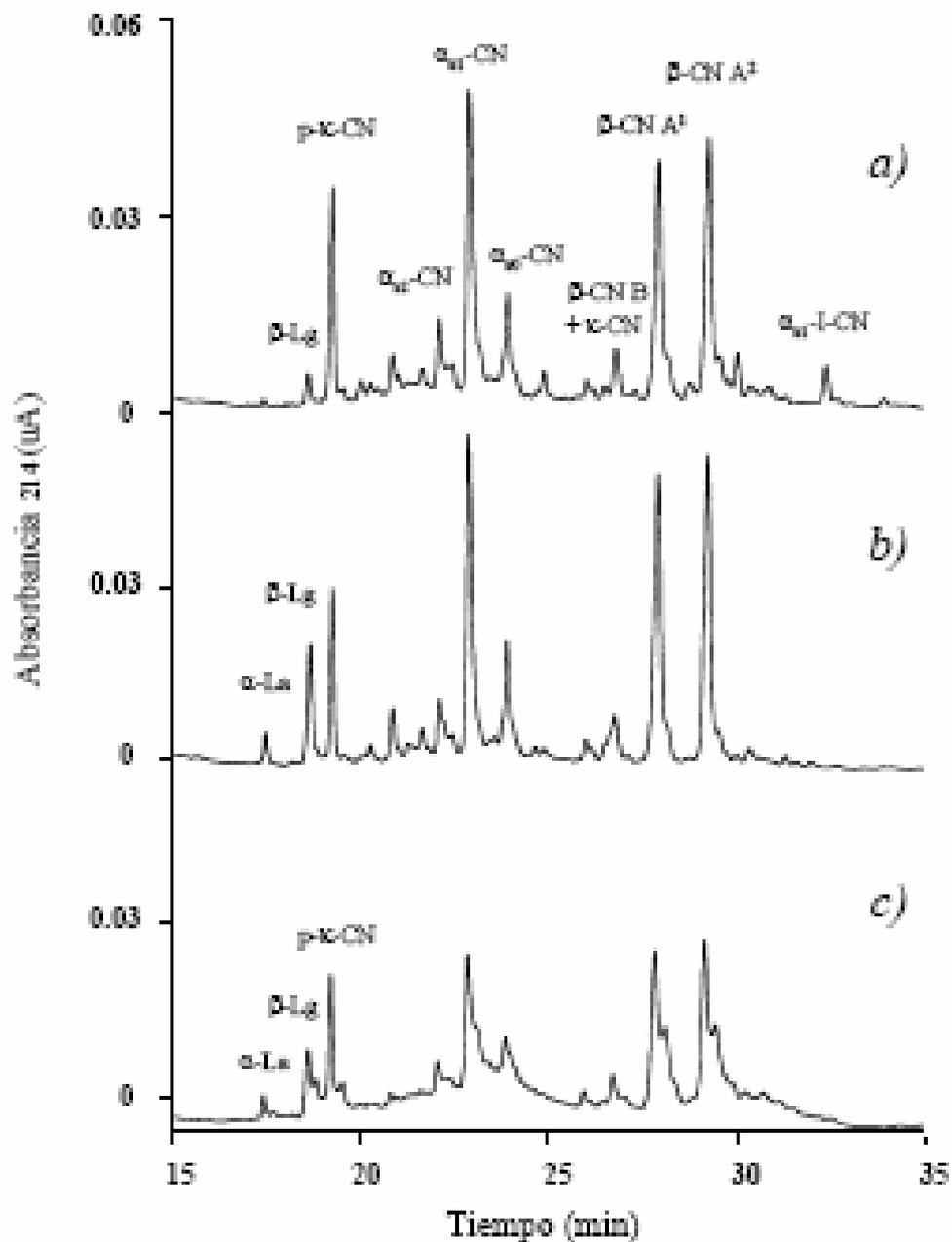


Figura 3.8 Electroforegramas de quesos frescos comerciales a) Queso tipo Burgos; b) y c) Queso tipo Quarg. Condiciones de separación descritas en el apartado 3.4.1.3.

3.4.4.1.1 Tipo de coagulación

En los electroforegramas de todas las muestras se pudo observar el pico de para- κ -CN, lo que indica que la coagulación de todos los quesos fue de tipo enzimático. En la elaboración de los quesos tipo Quarg el cuajo no es indispensable, ya que son quesos de coagulación ácida, pero su adición permite obtener una cuajada más firme a un pH más alto, lo que minimiza las pérdidas de caseína en la separación del suero, y reduce la posibilidad de producir quesos con un grado de acidez excesiva (Jelen y Renz-Schauen, 1989).

Se calculó el contenido en para- κ -CN y β -Lg de todas las muestras de queso analizadas mediante las curvas de calibrado obtenidas en el apartado 3.3.2. (Tabla 3.6).

Tabla 3.6 Contenido en β -Lg y en para- κ -CN de los quesos frescos y Mozzarella elaborados con leche de vaca analizados

Tipo de queso	Determinación	β -Lg (mg/ml)	para- κ -CN (mg/ml)
Burgos	Media	1.10	3.13
	Mínimo	0.38	2.35
	Máximo	1.81	3.71
	n	5	5
Quarg	Media	1.23	2.51
	Mínimo	0.86	1.78
	Máximo	1.67	3.40
	n	4	4
Mozzarella	Media	0.08	2.38
	Mínimo	0	2.10
	Máximo	0.18	2.66
	n	5	5

En todas las muestras de queso tipo Burgos se encontraron valores similares de para- κ -CN, puesto que estos quesos se elaboran de forma tradicional con cuajo (Marcos y Esteban, 1993). Sin embargo, entre los quesos Quarg hubo diferencias en el contenido de este producto de degradación. La adición de cuajo en la fabricación de los quesos Quarg es facultativa y esto puede explicar las distintas cantidades empleadas en los diferentes quesos comerciales analizados (Tabla 3.6).

3.4.4.1.2 Tratamiento térmico

Una de las principales diferencias entre los electroforegramas de las muestras de quesos comerciales analizadas fue el diferente tamaño de los picos correspondientes a las proteínas de suero desnaturalizadas. El contenido en α -La y β -Lg de la fracción caseínica del queso puede considerarse un indicador del tratamiento térmico a que fue sometida la leche durante el proceso de elaboración, pues a mayor tratamiento térmico y más tiempo, mayor es su desnaturalización y unión a las caseínas (Pearce, 1989; Ardö y col., 1999).

Tradicionalmente el queso Quarg se elabora con leche pasteurizada sin otro tratamiento térmico que pueda producir la desnaturalización de las proteínas de suero y su unión a las caseínas. Sin embargo, existen varios métodos que se pueden emplean para reducir las pérdidas de proteínas de suero y aumentar el rendimiento quesero que incluyen un tratamiento de la leche o del suero a 95 °C durante algunos min para precipitar las proteínas de suero (Guinee y col., 1993). La muestra de la Figura 3.8c corresponde a un queso tipo Thermoquarg. Puede observarse cómo tanto los picos correspondientes a las proteínas de suero α -La y β -Lg como los correspondientes a caseínas son asimétricos y presentan hombros. Estas características de los electroforegramas se producen cuando las proteínas se someten a un tratamiento térmico muy elevado (Chen y Zang, 1992).

3.4.4.1.3 Ultrafiltración

El elevado contenido en α -La y β -Lg de algunas muestras de queso analizadas (Fig 3.8b) podría ser debido a un proceso de elaboración con UF de la leche, pues hay casi una total recuperación de las proteínas de suero en comparación con el queso tipo Burgos elaborado con el procedimiento tradicional (Fig 3.8a).

Los contenidos en β -Lg de las muestras permitieron clasificarlas según su proceso de elaboración en aquellas elaboradas por UF y las elaboradas por el procedimiento tradicional.

Entre los quesos Quarg se encontraron quesos que, por su alto contenido en β -Lg (1.67 mg/ml), podían haberse elaborado por UF. El queso elaborado por el procedimiento Thermoquarg tenía un contenido en β -Lg de 0.86 mg/ml.

3.4.4.2 Quesos Mozzarella

La Figura 3.9 muestra la separación electroforética de la fracción caseínica de dos quesos Mozzarella. Pueden apreciarse diferencias entre el perfil obtenido entre ellos. En el primer caso se trata de un queso elaborado con leche de búfala (Fig 3.9a). Se observa un único pico correspondiente a la β -CN con un tiempo de migración próximo al de la β -CN A² bovina y no se observan picos en la zona de las α_{s1} -CN de leche de vaca. Este resultado se explica porque la estructura primaria de la única β -CN presente en la leche de búfala es muy similar a la de la β -CN A² bovina, pues se diferencia sólo en dos aminoácidos que, al pH de 2.3 empleado en el tampón de separación del método, van a estar más cargados, lo que hace que su tiempo de migración sea ligeramente mayor que el de la β -CN A² bovina. Sin embargo, la semejanza de las secuencias aminoacídicas de la para- κ -CN de la leche de vaca y de búfala explica que en las condiciones empleadas en el análisis por CE presenten el mismo tiempo de migración.

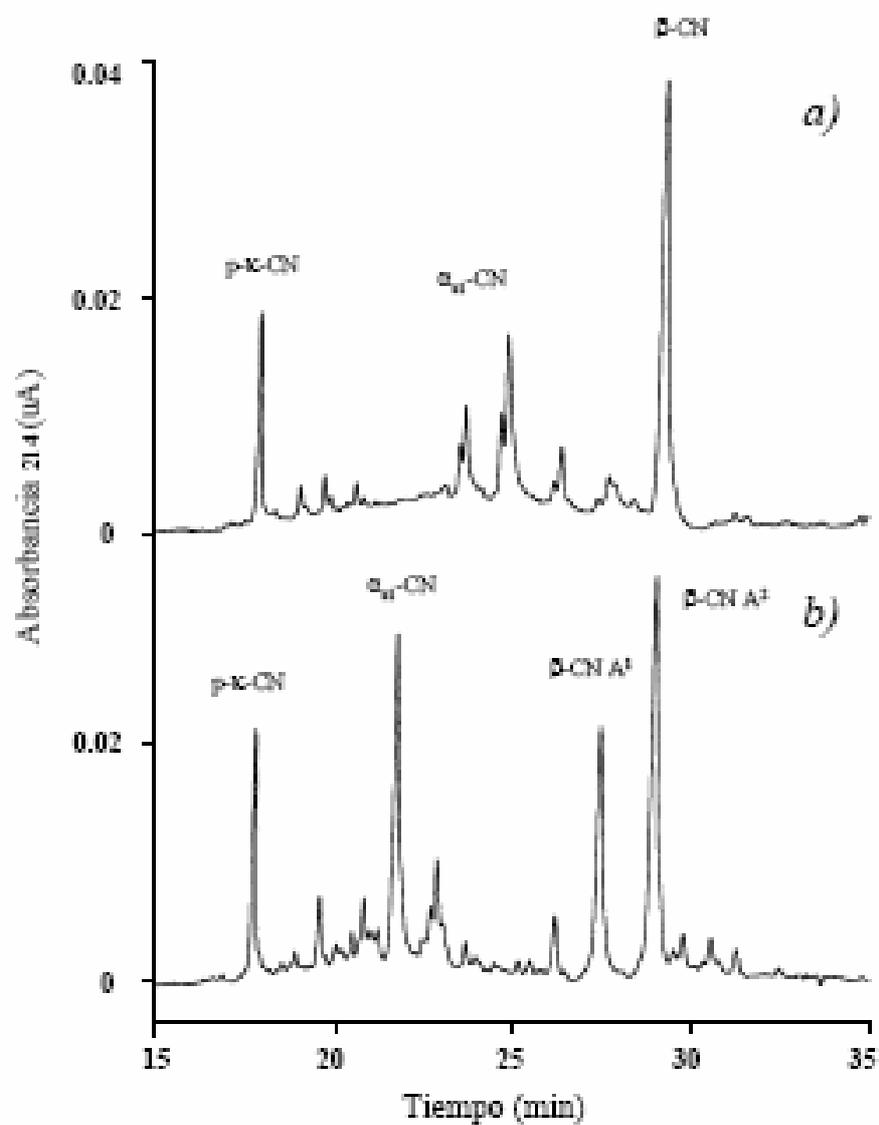


Figura 3.9 Separación electroforética de quesos Mozzarella *a)* Queso elaborado con leche de búfala; *b)* Queso elaborado con leche de vaca. Condiciones de separación descritas en el apartado 3.4.1.3.

Addeo y col., (1981) han observado, tanto por electroforesis como por IEF, diferencias en las α_{s1} -CN, β -CN y κ -CN de la leche de búfala respecto a las correspondientes caseínas de leche de vaca. En concreto, la α_{s1} -CN de búfala tenía menor movilidad electroforética que la α_{s1} -CN de vaca.

Aunque tradicionalmente el queso Mozzarella se elabora con leche de búfala, de las seis muestras de quesos del mercado analizadas, únicamente una contenía leche de esta especie, mientras que las demás mostraron un perfil coincidente con el de la leche de vaca (Fig 3.9b). De hecho la mayor parte de los estudios realizados en leche de búfala están dedicados a la detección de leche de vaca añadida fraudulentamente a la leche de búfala o al queso Mozzarella (Pellegrino y col., 1991; Addeo y col., 1995). Sin embargo, no existen estudios sobre la aplicación de la CE con este fin.

En el queso elaborado con leche de búfala no se observaron los picos correspondientes a las proteínas de suero desnaturalizadas mientras que en las demás muestras, que estaban elaboradas con leche de vaca, se observaron picos muy pequeños, ya que el contenido de β -Lg fue siempre menor de 0.2 mg/ml. Este hecho está de acuerdo con el proceso de elaboración del queso Mozzarella en el cual la temperatura a la que se somete la cuajada para el moldeado no debe superar los 70 °C (Fox y Guinee, 1987).

En todos los quesos analizados el contenido de para- κ -CN fue constante, lo que es característico de un queso en el que en su elaboración siempre se utiliza cuajo. Se ha descrito una mayor sensibilidad de la κ -CN de búfala al cuajo (Addeo y col., 1982).

En conclusión, el método de CE desarrollado es útil, además, para caracterizar los quesos en relación con la especie de la leche utilizada en su elaboración.

CONCLUSIONES

La memoria que se presenta constituye una aportación original en los siguientes aspectos:

1. Se ha optimizado un método de espectroscopía ultravioleta de la 4ª derivada que permite la determinación de la relación proteína de suero/proteína total en leche sometida a diferentes tratamientos térmicos y con diferentes grados de proteolisis. Este método podría ser usado para detectar la adición de suero o caseinato a la leche UHT.
2. La determinación de la adición de suero a la leche UHT por electroforesis capilar podría realizarse siempre que se comprobara previamente que la muestra no tiene proteolisis. La presencia de proteolisis en la leche UHT puede determinarse mediante la relación entre el área corregida de la α_{s1} -caseína y la κ -caseína y en la leche cruda por medio de la relación entre el área corregida de la α_{s1} -caseína y la β -caseína.
3. Los métodos de espectroscopía ultravioleta de la 4ª derivada, electroforesis capilar y electroforesis capilar con SDS proporcionan valores de relación proteína de suero/proteína total estadísticamente similares, entre el 16% y el 19%, en leches sometidas a diferentes tratamientos térmicos y sin proteolisis.
4. La cuantificación de la κ -caseína intacta mediante electroforesis capilar permite la determinación de caseína ácida/caseinato añadido a los quesos fundidos. Dicha determinación no se ve influenciada por el contenido de leche en polvo de los quesos fundidos en una proporción de hasta un 1.2%.
5. La electroforesis capilar y el isoelectroenfoco en gradiente de pH inmovilizado proporcionan resultados similares en la cuantificación de la κ -caseína intacta en quesos fundidos, aunque la reproducibilidad de la primera técnica es mayor.

Conclusiones

6. La adición de caseína de cuajo en quesos Quarg fabricados con coagulación ácida puede determinarse mediante la cuantificación de la para- κ -caseína mediante electroforesis capilar mientras que la adición de caseína ácida/caseinato no puede ser determinada.
7. La determinación de lisinoalanina mediante cromatografía líquida de alta eficacia puede ser utilizada como índice cualitativo de la adición de caseinato sódico en quesos Mozzarella.
8. Se ha desarrollado un método de electroforesis capilar para la cuantificación simultánea de β -Lg y para- κ -CN en muestras de leche y queso. La presencia de picos con tiempos de migración cercanos a los de la para- κ -CN en los electroforegramas de leches crudas conservadas en refrigeración obtenidos con este método podría atribuirse a la actividad proteolítica de bacterias psicrotrofas.
9. Se han caracterizado por cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas cinco fragmentos de la secuencia de la κ -CN producidos por la acción de la proteasa extracelular de *Pseudomonas fluorescens* y la tripsina, lo que confirma la formación de para- κ -CN y otros péptidos relacionados.
10. El método de electroforesis capilar desarrollado en este trabajo permite caracterizar los quesos frescos por su proceso tecnológico de elaboración y los quesos Mozzarella por el tipo de leche utilizada.

BIBLIOGRAFÍA

Addeo, F., Trieu.Cuot, P., Chianese, L. y Ameno, M. (1981). Addition of cows' milk to buffaloes' milk. III Electrophoretic analysis of caseins. *Sci. Tecn. Latt. cas.*, **32**, 95-108.

Addeo, F., Chianese, L. y Anelli, G. (1982). Detection and quantitative determination of cows' milk in cheese called "buffalo Mozzarella". *Riv. Soc. Italiana Sci. Aliment.*, **11**, 37-40.

Addeo, F., Anelli, G. y Chianese, L. (1986). Gel isoelectric focusing of cheese proteins to detect milk from different species in mixture. *Bull. IDF.*, **202**, 191-192.

Addeo, F., Moio, L, Chianese, L., Stingo C. y di Luccia, A. (1990). Improved procedure for detecting bovine and ovine milk mixtures in cheese by isoelectric focusing of para-kappa-casein. *Milchwissenschaft*, **45**, 221-224.

Addeo, F., Nicolai, M.A., Chianese, L., Moio, L., Spagna Musso, S., Bocca, A. y del Giovine, L. (1995). A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting. *Milchwissenschaft*, **50**, 83-85.

Aimutis, W.R. (1995). Dairy protein usage in processed and imitation cheese. *Food Tech. Europe*, **2**, 30-34.

Amigo, L. y Fernández García, E. (1992). Utilización de los procesos de membrana en la elaboración de queso. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.*, **32**, 353-370.

Anónimo. (1997). La importancia de la industria del queso fundido en la Unión Europea. *Rev. Esp. Lechería*, **85**, 12-13.

Anónimo. (1998). La leche del año 2000. *ILE*, **237**, 21-25.

Ardö, Y., Lindblad, O. y Qvist, K. B. (1999). Study of methods to routinely monitor heat load to cheese milk. *Int. Dairy. Journal*, **9**, 547-552.

Basch, J.J., Douglas, F.W., Procino, L., Holsinger, V.H. y Farrel, H.M. (1985). Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with Harland-Ashwoth procedure. *J. Dairy Res.*, **68**, 23-31.

Bean, S. R. y Lookhard, G.L. (1999). Sodium dodecyl sulphate capillary electrophoresis of wheat proteins. 1. Uncoated capillaries. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4246-4255.

Belloque, J. y Ramos, M. (1998). Application of NMR to detect added caseinates to cheese. Documento distribuido en la 2ª Reunión del Proyecto SMT-4-CT97-2208 de la Unión Europea.

Belloque, J., de la Fuente, M.A. y Ramos, M. (2000). Qualitative and quantitative analysis of phosphorylated compounds in milk by means of ³¹P-NMR. *J. Dairy Res.*, **67**, 529-539.

Belton, P.S., Lyster, G.A. y Richards, C.P. (1985). The ³¹P nuclear magnetic resonance spectrum of cow's milk. *J. Dairy Res.*, **52**, 47-54.

Benfeldt, C., Sorensen, J., Ellegard, K. y Petersen, T. E. (1997). Heat treatment of cheese milk: Effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy Journal*, **7**, 723-731.

Bengtsson, K., Gardhage, L. e Isaksson, B. (1973). Gelation in UHT treated milk, whey and casein solution. The effect of heat resistant proteases. *Milchwissenschaft*, **28**, 495-499.

van den Berg, G., Escher, J.T.M., de Koning, P.J. y Bovenhuis, H. (1992). Genetic polymorphism of κ -casein and β -lactoglobulin in relation to milk composition and processing properties. *Neth. Milk Dairy J.*, **46**, 145-168.

van den Berg, M.G. y van den Berg, M.G. (1996). Seasonal variation of the casein/true protein ratio of cow's milk. *Neth. Milk Dairy J.*, **50**, 581-585.

Bernal, V. y Jelen, P. (1985). Thermal stability of whey proteins. A calorimetric study. *J. Dairy Sci.*, **68**, 2847-2852.

de Block, J., Merchiers, M. y van Renterghem, R. (1997). Quantification of the ratio of whey powder to milk powder using spectroscopy in alkali. *Milchwissenschaft*, **52** 213-216.

de Block, J., Merchiers, M. y van Renterghem, R. (1998). Capillary electrophoresis of the whey protein fraction of milk powders. A possible method for monitoring storage conditions. *Int. Dairy J.*, **8**, 787-792.

Braun, F., Krause, I. y Klostermeyer, H. (1990). Efficient determination of skim milk powder, casein, whey protein and total milk protein in compound feedingstuffs by isoelectric focusing and laser densitometry. *Milchwissenschaft*, **45**, 3-9.

Bray, M.R., Carriere, A.D. y Clarke, A.J. (1994). Quantitation of Tryptophan and Tyrosine residues in proteins by fourth-derivative spectroscopy. *Anal. Biochem.* **221**, 278-284.

Broadbent, J. R., Strickland, M., Weimer, B. C., Johnson, M.E. y Steele, L.(1998). peptide accumulation and bitterness in Cheddar cheese made using single-strain *Lactococcus lactis* starters with distinct proteinase specificities. *J. Dairy Sci.*, **81**, 327-337.

Brule, G. y Lenoir, J. (1990). La coagulación de la leche. En *El Queso*, Ed. A. Eck, Omega. Barcelona, pp. 349-362.

Bueser, W. y Ebersdobler, H.F. (1984). Determination of lysinoalanine as the heptafluorobutyryl isobutyl ester derivative by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **303**, 234-237.

Burgess, K.J. (1994). Milk protein definition and milk protein standardisation. *Bull. IDF* (Monográfico) p. 55.

Burgess, K.J. (1997). Protein standardization. *Int. J. Dairy Techn.*, **50**, 14-18.

Burton, H. (1969). Ultra-high-temperature processed milk. *Dairy Sci. Abstr.* **31**, 287-297.

Caric, M. y Kaláb, M. (1993). Processed cheese products. En *Cheese, Chemistry, Physics and Microbiology*, ed. P.F. Fox, Chapman and Hall, Londres, pp. 467-505.

Cartoni, G. P., Coccioli, F., Jasionowska, R. y Masci, M. (1998). Determination of cow milk in ewe milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions. *Ital. J. Food Sci.*, **10**, 317-327.

Cartuyvels, D., Merchiers, M., van Renterghem, R. y de Block, J. (1999). A fast and simple method to determine the whey powder to milk powder ratio using spectroscopy in alkali. *Milchwissenschaft*, **54**, 268-262.

Cattaneo, T.M.P., Nigro, F., Toppino, P.M. y Denti, V. (1996). Characterization of ewe's milk by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **721**, 345-349.

Celestino, E.L., Iyer, M. y Roginski, H. (1997a). The effects of refrigerated storage of raw milk on the quality of whole milk powder stored for different periods. *Int. Dairy J.*, **7**, 119-127.

Celestino, E.L., Iyer, M. y Roginski, H. (1997b). Reconstituted UHT-treated milk: effects of raw milk, powder quality and storage conditions of UHT milk on its physico-chemical attributes and flavour. *Int. Dairy J.*, **7**, 129-140.

Cifuentes, A., de Frutos, M., y Diez-Masa, J.C. (1993). Analysis of whey proteins by capillary electrophoresis using buffer-containing polymeric additives. *J. Dairy Sci.*, **76**, 1870-1875.

Chen, F.A. y Zang, J. (1992). Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. *JAOAC Int.*, **75**, 905-909.

Codex Committee on Milk and Milk Products (CCMMP) (1994). Informe de la primera sesión del Codex, Roma, IDF.

Corredig, M. y Dalgleish, D.G. (1999). The mechanisms of the heat-induced interaction of whey proteins with casein micelles in milk. *Int. Dairy J.*, **9**, 233-236.

Corzo, N., López-Fandiño, R., Delgado, T., Ramos, M y Olano, A. (1994). Changes in furosine and proteins of UHT-treated milks stored at high temperature. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **198**, 302-306.

Coulon, J.B., Hurtaud, C., Remond, B y Verite, R. (1998). Factors contributing to variation in the proportion of casein in cow's milk true protein: A review of recent INRA experiments. *J. Dairy Res.*, **65**, 375-387.

Dabrio, M.V. (2000). Cromatografía de líquidos de alta eficacia. En *Cromatografía y electroforesis en columna*, ed. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona, pp. 145-186.

Dalgleish, D.G. (1993). The enzymatic coagulation of milk. En *Cheese, Chemistry, Physics and Microbiology*, ed. P.F. Fox, Chapman and Hall, Londres, pp. 69-100.

Dalgleish, D.G. y Law, A.J.L. (1988). Sodium caseinates: composition and properties of different preparations. *J. Soc. Dairy Tech.*, **41**, 1-4.

DIN. (1992) Bestimmung des Molkenprotein- und Caseinanteils am Gesamtprotein von Milch un Milchprodukten. Casein-Phosphors Verfahren DIN 10464, Beuth Verlag, Berlin.

DIN. (1994). Bestimmung des Molkenprotein- und Caseinanteils am Gesamtprotein von Milch un Milchprodukten. Polarographisches Verfahren DIN 10466, Beuth Verlag, Berlin.

DIN. (1996). Bestimmung des Molkenprotein- und Caseinanteils am Gesamtprotein von Milch un Milchprodukten. Elektrophoretisches Verfahren DIN 10472, Beuth-Verlag, Berlin.

Dixon, W.J. (1983). BMDP biomedical computer programs. Los Angeles, CA: University of California Press.

DOCE. (1968). Reglamento por lo que se establece la organización común de mercados en el sector de la leche y de los productos lácteos de la Comunidad Europea. L 148, de 28-6-1968, p. 13.

DOCE. (1989) Modificación del reglamento por lo que se establece la organización común de mercados en el sector de la leche y de los productos lácteos. L 378, de 27-12-1989, p. 1.

DOCE. (1990). Reglamento por lo que se establece con respecto a los quesos, las normas generales de la organización común de mercados en el sector de la leche y de los productos lácteos. L 201, de 31-7-1990, p. 7.

Douglas Jr, F.W., Tobias, M.L., Groves, H.M., Farrell, J. y Edmondson, L.F. (1982). Quantitative determination of total protein, casein and whey protein of processed dairy products. *J. Dairy Sci.*, **65**, 339-345.

Dufour, E. y Riaublanc, A. (1997). Potentiality of spectroscopic methods for the characterisation of dairy products. I. Front-face fluorescence study of raw, heated and homogenised milks. *Lait*, **77**, 657-670.

Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Farrell jr, H.M., Harwalkar, V.R., Jenness, R. y Whitney. R. M. (1984). Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. *J. Dairy Sci.*, **67**, 1599-1631.

Ekborg-Ott, K. H. y Armstrong, D. W. (1997). Stereochemical analysis of food components. En *Chiral separations. Applications and technology*. Ed. S. Ahuja. American Chemical Society. Washington D.C.

Elfagm, A.A. y Wheelock, J.V. (1978). Heat interaction between alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin and casein in bovine milk. *J. Dairy Sci.*, **61**, 159-163.

Fairbain, D.J. y Law, B.A. (1986). Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. *J. Dairy Res.*, **53**, 139-177.

Fairise, J.F., Cayot, P y Lorient, D. (1999). Characterisation of the protein composition of casein micelles after heating. *Int. Dairy J.*, **9**, 249-254.

Folkertsma, N., Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. (1996). Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. *Int. Dairy J.*, **6**, 1117-1134.

Fox, P.F. y Guinee, T.P. (1987). Italian cheeses. En *Cheese: chemistry, physics and microbiology* Vol. 2: Major cheese groups. Ed. P.F. Fox, Elsevier Science Publishers, Londres, pp. 221-244.

Friedman, M. (1999). Chemistry, biochemistry, nutrition and microbiology of lysinoalanine, lanthionine and histidinoalanine in food and other proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1295-1319.

Fritsch, R.J. y Klostermeyer, H. (1981a). The occurrence of lysinoalanine in foods containing milk protein. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **171**, 440-445.

Fritsch, R.J. y Klostermeyer, H. (1981b). Sensitive determination of lysinoalanine (LAL) AND 2,3-diaminopropionic (DAP) acid by fluorimetric detection using o-phthalaldehyde. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **173**, 101-106.

García-Risco, M.R., Ramos, M. y López-Fandiño, R. (1999). Proteolysis, protein distribution and stability of UHT milk during storage at room temperature. *J. Sci. Food Agric*, **79**, 1171-1178.

Gilbert, J. (2000). Determination of added casein/ caseinate in cheese and processed cheese. Informe final del proyecto SMT CT97-2208.

Gouldsworthy, A. M., Banks, J. M., Law, A. J. R. y Leaver, J. (1999). Casein degradation in Cheddar cheese monitored by capillary electrophoresis. *Milchwissenschaft*, **54**, 620-623.

Grapin, R., y Ribadeau-Dumas, B. (1992). Analytical methods for milk proteins. En *Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins*, ed. P.F. Fox, Elsevier Science Publishers, Londres, pp. 1-62.

Greenberg, R. y Dower, H.J. (1986). Detection of added whey protein concentrate in nonfat dry milk by amino acid analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 30-32.

Grieve, P.A. y Kitchen, B.J. (1985). Proteolysis in milk: the significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leucocyte, bacterial and natural milk proteinases on casein. *J. Dairy Res.*, **52**, 101-112.

Griffiths, M.W. (1986). Use of milk enzymes as indices of heat treatment. *J. Food Protect.*, **49**, 696-705.

Guamis López, B. y Quevedo Terré, J.M. (1996). Enriquecimiento en calcio de leche desnatada sometida a tratamiento UHT. *Alimentaria*, **271**, 79-82.

Gufferty, M.B. y Fox, P.F. (1988). Review article. Milk alkaline proteinase. *J. Dairy Res.*, **55**, 609-630.

Guichon, G. y Guillemin, C.L. (1988). Quantitative analysis by gas chromatography. Measurement of peak area and derivation of sample composition. En *Quantitative gas chromatography* Elsevier, Amsterdam, pp.629-659.

Guinee, T.P., Pudja, P.D. y Farkye, N.Y. (1993). Fresh acid-curd cheese varieties. En *Cheese: chemistry, physics and microbiology* Vol. 2: Major cheese groups. Ed. P.F. Fox, Elsevier Science Publishers, Londres, pp. 363-420.

Guttman, A. (1996). Capillary sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis of proteins. *Electrophoresis*, **17**, 1333-1341.

Hambling, S.G., McAlpine, A.S. y Sawyer, L. (1992). β -Lactoglobulin. En *Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins*, ed. P.F. Fox, Elsevier Science Publishers, Londres, pp. 141-190.

Haque, Z. y Kinsella, J.E. (1988). Interaction between heated κ -casein and β -lactoglobulin: predominance of hydrophobic interactions in the initial stages of complex formation. *J. Dairy Res.*, **55**, 67-80.

Harding, F. y Royal, L. (1974) Variations in the nitrogen-containing fractions of bulked milk in England and Wales during the period 1947 to 1970. *Dairy Ind.*, **39**, 372-378.

Heinert, H.H., Brehmer, H. y Klinger, A. (1968). Differenzierung von traditionell hergestelltem Quark und Thermoquark unter Anwendung von Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE), Elektroimmunodiffusion (EID) und Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **37**, 57-84.

Henle, T., Walter, A.W. y Klostermeyer, H. (1993). Detection and identification of the cross-linking amino acids N^{τ} - and N^{π} -(2'-amino-2'carboxy-ethyl)-L-histidine (histidinoalanine, HAL) in heated milk products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **197**, 114-117.

Hekken, D.L. y Thompson, M.P. (1992). Application of PhastSystem to the resolution of bovine milk proteins on urea-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.*, **75**, 1204-1210.

Higgins, J.J., Lynn, R.D., Smith, J.F. y Marshall, K.R. (1995). Protein standardization of milk and milk products. Report on responses to three IDF questionnaires. *Bull. IDF*, **304**, 26-49.

Hill, J.P. (1993). The relationship between β -lactoglobulin phenotypes and milk composition in New Zealand dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, **76**, 281-286.

IDF. (1963). Determinación del contenido en materia grasa de la leche descremada por el método de Röse Gottlieb. IDF Standard 22.

IDF. (1993) Determinación del contenido total en nitrógeno de la leche por el método Kjeldahl. IDF Standard 20B.

Jelen, P. y Renz-Schauen, A. (1989). Quarg manufacture innovations and their effects on quality, nutritive value and consumer acceptance. *Food technology*, **43**, 74-81.

de Jong, N., Visser, S y Olieman, C. (1993). Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*. **652**, 207-213.

Kanning, M., Casella, M. y Olieman, C. (1993). Milk and soy protein analysis using capillary zone electrophoresis. *LC-GC Int.*, **6**, 701-706.

Karman, A.H. y van Boekel, M.A.J.S. (1986). Evaluation of the Kjeldahl factor for conversion of the nitrogen content of milk and milk products to protein content. *Neth. Milk Dairy J.*, **40**, 315-336.

Kawakami, H., Kawasaki, Y., Dosako, S. Tanimoto, M y Nakajima, I. (1992). Determination of κ -casein glycomacropeptide by high performance liquid chromatography without trichloroacetic pretreatment. *Milchwissenschaft*, **47**, 688-693.

Kiely, L.J., McConnel S.L. y Kindstedt, P.S. (1991). Observations on the melting behavior of imitation Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*, **74**, 3568-3572.

Kindstedt, P.S. (1993). Mozzarella and pizza cheese. En *Cheese: chemistry, physics and microbiology* Vol. 2: Major cheese groups. Ed. P.F. Fox, Elsevier Science Publishers, Londres, pp. 337-362.

Kinghorn, N. M., Norris, C.S., Paterson, G.R. y Otter, D.E. (1995). Comparison of capillary electrophoresis with traditional methods to analyse bovine whey proteins. *J. Chromatogr. A*, **700**, 111-123.

Komatsu, Y., Nakatsubo, T., Ohtomo, H., Kuwata, T., Davis, M.M. y Davis, M.E. (1999). Process of producing calcium-supplemented milk drinks. Patente (USA).

de Kooning, P.J. y van Rooijen, P.J. (1971). Estimation of whey proteins in casein co-precipitate or in mixtures with milk powder by the use of a modified ninhydrin reaction. *Milchwissenschaft*, **26**, 1-6.

de Kooning, P.J. van Rooijen, P.J. y Draaisma, J. T. (1976). An improved manual method for the determination of the cystine plus cysteine content of proteins. *Milchwissenschaft*, **31**, 261-263.

Krause, I., Belitz, H.D. y Kaiser, K.P. (1982). Detection of cow's milk in sheep's milk and goat's milk and cheese by isoelectric focusing on thin layers of polyacrylamide gels containing urea. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **174**, 195-199.

Krause, I, Buchberger, J., Weiss, G., Pflüger, M. y Klostermeyer, H. (1988). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients with carrier ampholytes added for high-resolution phenotyping of bovine β -lactoglobulins: characterization of a new genetic variant. *Electrophoresis*, **9**, 609-613.

Krause, I. (1998) Determination of added casein/caseinate in cheeses and processed cheese by electrophoretic methods. Documento distribuido en la 2ª Reunión del Proyecto SMT-4-CT97-2208 de la Unión Europea.

Krause, I., Bong, R., Luginger, K., Sperrer, I., Lechner, E. y Klostermeyer, H. (2001) Sensitive determination of added casein/caseinate in processed cheese via determination of the intact non-glycosylated κ -casein A by isoelectric focusing. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* (en prensa).

Kristiansen, K.R., Otte, J., Zakora, M. y Qvist, K. B. (1994). Capillary electrophoresis used to monitor the enzymatic hydrolysis of caseins and the fractionation of hydrolysis products. *Milchwissenschaft*, **49**, 683-688.

Kuaye, A.Y. (1994). An ultraviolet spectrophotometric method to determine milk protein content in alkaline medium. *Food Chem.*, **49**, 207-211.

Lambelet, P., Berrocal, R. y Renevey, F. (1992). Low-field nuclear magnetic resonance relaxation study of thermal effects on milk proteins. *J. Dairy Res.*, **59**, 517-526.

Law, B.A., Andrews, A.T. y Sharpe, M.E. (1977). Gelation of ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. *J. Dairy Res.*, **44**, 145-148.

Lechner, E. (1990). Bestimmung des Molkenproteinanteils im Gesamtprotein von Frishkäse und gereiftem Käse. *Deutsche Lebensm. Milchwirtschaft*, **35**, 1112-1117.

Lechner, E. y Klostermeyer, H. (1981). Detection of the adulteration of skim milk powder by whey powder (polarographic method). *Milchwissenschaft*, **36**, 267-270.

Léonil, J. y Mollé, D. (1991). A method for determination of macropeptide by cation-exchange fast protein liquid chromatography and its use for following the action of chymosin in milk. *J. Dairy Res.*, **58**, 339-347.

Lindeberg, J. (1995). Capillary electrophoresis in food analysis. *Food Chem.*, **55**, 71-94.

Lodes, A., Krause, I., Buchberger, J., Aumann, J. y Klostermeyer, H. (1996). The influence of genetic variants of milk proteins on the compositional and technological properties of milk. 1. Casein micelle size and the content of non-glycosylated κ -casein. *Milchwissenschaft*, **51**, 368-373.

López-Fandiño, R. y Ramos, M. (1993). Revisión: El caseinmacropéptido bovino. II. Detección de la presencia de suero de quesería en productos lácteos. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.*, **33**, 1-12.

López-Fandiño, R., Olano, A., Corzo, N. y Ramos, M. (1993a). Proteolysis during storage of UHT milk: differences between whole and skim milk. *J. Dairy Res.*, **60**, 339-347.

López-Fandiño, R., Olano, A., San José, C. y Ramos, M. (1993b). Application of reversed-phase HPLC to the study of proteolysis in UHT milk. *J. Dairy Res.*, **60**, 111-116.

López-Fandiño, R., Corzo, N., Villamiel, M., Delgado, T., Olano, A. y Ramos, M. (1993c). Assessment of quality of commercial UHT milks by chromatographic and electrophoretic methods. *J. Food Prot.*, **56**, 263-264.

López-Tapia, J., García-Risco, M.R., Manso, M.A. y López-Fandiño, R. (1999). Detection of the presence of soya protein in milk powder by sodium dodecyl sulfate capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **836**, 153-160.

Luf, W. (1989). Zur Hitzeklassifizierung von Magermilchpulver. Bestimmung des Denaturierungsgrades der Molkenproteine mittels Derivativspektroskopie. *Milchwissenschaft*, **44**, 90-94.

Luf, W. y Brandl, E. (1987). Zur Bestimmung des undenaturierten Molkenproteinstickstoffes in Milch und Milchpulver mit Hilfe der UV-Derivativspektroskopie. *Milchwissenschaft*, **42**, 275-277.

Luf, W. y Brandl, E. (1989.) Zur Unterscheidung von Frischkäse nach der Erzeugungsart: Anwendung der Derivativspektroskopie. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **37**, 74-76.

Lundén, A., Nilsson, M. y Janson, L. (1997). Marked effect of β -Lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. *J. Dairy Sci.*, **80**, 2996-3005.

Lüthi-Peng, Q. y Puhan, Z. (1999). The 4th derivative UV spectroscopic method for the rapid determination of protein and casein in milk. *Milchwissenschaft*, **54**, 74-77.

Lynch, A.G., Mulvihill, D.M., Law, A.J.R., Leaver, J. y Horne, D.S. (1997). Chromatographic elution profiles, electrophoretic properties and free amino and sulphhydryl group contents of commercial sodium caseinates. *Int. Dairy J.*, **7**, 213-220.

Manji, B y Kakuda, Y. (1987). Determination of whey protein denaturation in heat-processed milks: comparison of three methods. *J. Dairy Sci.* **70**, 1355-1361.

Mara, O. y Kelly, L. (1998) Contribution of milk enzymes, starter and rennet to proteolysis during storage of Quarg. *Int. Dairy J.*, **8**, 973-979.

Marcos, A. y Esteban, M.A. (1987). Iberian cheeses. En *Cheese: chemistry, physics and microbiology* Vol. 2: Major cheese groups. Ed. P.F. Fox, Elsevier Science Publishers, Londres, pp. 173-220.

Mariani, P. (1985). Observations on the content and distribution of the main constituents of the micellar system in milk from four cattle breeds. *Ann. Fac. Med. Vet. Univ. Parma*, **5**, 173-183.

Mariette, F., Tellier, C., Brule, G. y Marchal, P. (1993). Multinuclear NMR study of the pH dependent water state in skim milk and caseinate solutions. *J. Dairy Res.*, **60**, 175-188.

Martin, G.G., Hanote, V., Lees, M. y Martin, Y.L. (1996). Interpretation of combined ^1H SNIF/NMR y ^{13}C SIRA/MS analyses of fruit juices to detect added sugar. *J.AOAC Int.*, **79**, 62-72.

Maubois, J.L. (1990). Nouvelles applications des technologies à membrane dans l'industrie laitière. Resúmenes del XXIII Congreso Internacional de Lechería, Montreal, Canada, Vol. 2, pp. 1775-1779.

Maubois, J.L. (1998). Fractionation of milk proteins. Resúmenes del XXV Congreso Internacional de Lechería, Aarhus, Dinamarca, Vol. 2, pp. 74-86.

Mayer, H.K. (1997). Quality control of grated Parmesan products using an electrophoretic ripening index. *Milchwissenschaft*, **52**, 443-448.

Mercier, J.C., Brignon, G. y Ribadeau-Dumas, B. (1973). Primary structure of bovine κ -casein B. Complete sequence. *Eur. J. Biochem.*, **35**, 222-235.

Meisel, H. (1995). Application of fourth derivative spectroscopy to quantitation of whey protein and casein in total milk protein. *Milchwissenschaft*, **50**, 247-251.

Meisel, H. y Carstens, L. (1989). Comparative studies on the determination of the whey protein and casein content in milk products by means of the casein phosphorus method, SDS-electrophoresis and polarography. *Milchwissenschaft*, **44**, 271-277.

Miller, G.D. (1998). Calcium and dairy foods in reducing hypertension risk. Resúmenes del XXV Congreso Internacional de Lechería, Aarhus, Dinamarca, Vol. 1, pp 101-106.

Miranda, G. y Gripon, J.C. (1986). Origine, nature et incidences technologiques de la protéolyse dans le lait. *Lait*, **66**, 1-18.

Molina, E., de Frutos, M. y Ramos, M. (2000). Capillary electrophoresis characterization of the casein fraction of cheese made from cows', ewes' and goats' milks. *J. Dairy Res.*, **67**, 209-216.

Mrowetz, G. y Klostermeyer, H. (1976). Polarographic determination of the whey protein percentage in dried milks. *Milchwissenschaft*, **31**, 346-349.

Muir, D.D., Phillips, J.D. y Dalgleish, D.G. (1979). The lipolytic and proteolytic activity of bacteria isolated from blended raw milk. *J. Soc. Dairy Technol.*, **32**, 19-23.

Mulvihill, D. M. (1992). Production, functional properties and utilization of milk protein products. En *Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins*, ed. P.F. Fox, Elsevier Science Publishers, Londres, pp. 369-404.

Ng-Kwai-Hang, K.F., Hayes, J.F., Moxley, J.E. y Monardes, H.G. (1987). Variation in milk protein concentrations associated with genetic polymorphism and environmental factors. *J. Dairy Sci.*, **70**, 563-570.

Núñez, J.A., Chavarri, F.J. y Núñez, M. (1984). Psychrotrophic bacterial flora of raw ewe's milk, with particular reference to Gram negative rods. *J. App. Bacteriol.*, **57**, 23-29.

Olieman, C. y van den Bedem, J.W. (1983). A sensitive HPLC method of detecting and estimating rennet whey total solids in skim milk powder. *Neth. Milk Dairy J.*, **37**, 27-36.

Olieman, C. y van Riel, J.A.M. (1989). Detection of rennet whey solids in skim milk powder and buttermilk powder with reversed-phase HPLC. *Neth. Milk Dairy J.*, **43**, 171-184.

Omar, M.M., Abou-El-Nour, A. y Buchheim, W. (1998). Preparation of heated, calcium-enriched skim milk retentate for producing yogurt and quarg. *Egyp. J. Dairy Sci.*, **26**, 61-76.

Ortiz, M.C. y Sarabia, L.A. (1994). Límite de detección. Curvas características de detección. En *Avances en Quimiometría Práctica*, (Ed. R. Cela). Santiago de Compostela: Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Universidad de Santiago de Compostela, pp. 189-209.

Otte, J., Zakora, M., Kristiansen, K.R. y Qvist, K.B. (1997). Analysis of bovine caseins and primary hydrolysis products in cheese by capillary zone electrophoresis. *Lait*, **77**, 241-257.

Otte, J., Larsen, K.S. y Bouhallab, S. (1998). Analysis of lactosylated β -lactoglobulin by capillary electrophoresis. *Int. Dairy J.*, **8**, 857-862.

Otte, J., Ardö, Y., Weimer, B. y Sorensen, J. (1999). Capillary electrophoresis used to measure proteolysis in cheese. *Bull. IDF.*, **337**, 10-16.

Patart, P. Los quesos fundidos. (1989). En *El Queso*, Ed. A. Eck, Omega. Barcelona, pp. 349-362.

Paterson, G.R., Hill, J.P. y Otter, D.E. (1995) Separation of β -lactoglobulin A, B and C variants of bovine whey using capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A.*, **700**, 105-110.

Pearce, R.J. (1989). Thermal denaturation of whey protein. *Bull. IDF.*, **238**, 17-23.

Pellegrino, L., de Noni, I., Tirelli, A. y Resmini, P. (1991). Determinazione del latte di vacca nei formaggi di specie minori mediante HPLC delle sieroproteine. Nota 1^a. Applicazione alla Mozzarella di bufala. *Sci. Tec. Lattiero-Cas.*, **42**, 87-101.

Pellegrino, L., Resmini, P., de Noni, I. y Masotti, F. (1996) Sensitive determination of lysinoalanine for distinguishing natural from imitation Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*, **79**, 725-734.

Pharmacia AB (1986) Fast Coomassie staining. Nota de aplicación del Phast System N° 200.

Pharmacia AB (1987) SDS-PAGE in homogeneous media. Nota de aplicación del Phast System N° 111.

Picard, C., Plard, I., Rongdaux-Gaida, D y Collin, J.C. (1994). Detection of proteolysis in raw milk stored at low temperature by an inhibition ELISA. *J. Dairy Res.*, **61**, 395-404.

Prin, C., El Bari, N., Montagne, P., Cuilliere, M., Bene, M., Faure, G., Humbert, G. y Linden, G. (1996). Microparticle-enhanced nephelometric immunoassay for caseinomacropetide in milk. *J. Dairy Res.*, **63**, 73-81.

Pollard, N. J., Wrigley, C.W., Bekes, F., Aumatell, A. y MacRitchie, F. (1996). Distinction between genotypes of lupinus species by sodium dodecyl sulphate-gel electrophoresis and by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **17**, 221-223.

Puhan, Z. (1996). Protein standardization as an international issue. *Bull. IDF.*, **311**, 5-6.

Rahali, V. y Menard, J.L. (1991). Influence des variants génétiques de la β -lactoglobuline et de la κ -caséine sur la composition du lait et son aptitude fromagère. *Lait*, **71**, 275-297.

Recio, I., Molina, E., Ramos, M. y de Frutos, M. (1995). Quantitative analysis of major whey proteins by capillary electrophoresis using uncoated capillaries. *Electrophoresis*, **16**, 654-658.

Recio, I. (1996) .Evaluación de distintos aspectos de la calidad de la leche mediante el estudio de la fracción proteica por electroforesis capilar. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Recio, I. y Olieman, C. (1996). Determination of denatured serum proteins in the casein fraction of heat treated milk by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, **17**, 1228-1233.

Recio, I., López-Fandiño, R., Olano, A., Olieman, C. y Ramos, M. (1996). Study of the formation of caseinomacropetides in stored UHT milk by capillary electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3845-3848.

Recio, I., Amigo, L. y López-Fandiño, R. (1997a). Assessment of the quality of dairy products by capillary electrophoresis of milk proteins. *J. Chrom. B*, **697**, 231-242.

Recio, I., Amigo, L., Ramos, M. y López-Fandiño, R. (1997b). Application of capillary electrophoresis to the study of proteolysis of caseins. *J. Dairy Res.*, **64**, 221-230.

Recio, I., Pérez-Rodríguez M.L., Amigo, L. y Ramos, M. (1997c). Capillary electrophoretic analysis of genetic variants of milk proteins from different species. *J. Chromatogr. A*, **768**, 47-56.

Recio, I., García-Risco, M.R., López-Fandiño, R., Olano, A. y Ramos, M. (2000a). Detection of rennet whey solids in UHT milk by capillary electrophoresis. *Int. Dairy J.*, **10**, 333-338.

Recio, I., García-Risco, M.R., Ramos, M y López-Fandiño, R. (2000b). Characterization of peptides produced by the action of psychrotrophic proteinases on κ -casein. *J. Dairy Res.*, **67**, 625-630.

Recio, I., Ramos, M. y López-Fandiño, R. (2001). Capillary electrophoresis for the analysis of food proteins of animal origin. *Electrophoresis* (en prensa)

Renner, E. (1988). Storage stability and some nutritional aspects of milk powders and ultra high temperature products at high ambient temperatures. *J. Dairy Res.*, **55**, 125-142.

Resmini, P., Taccani, F., Saracchi, S. y Pazzaglia, C. (1971). Rapid method of assesing the amount of whey proteins in coprecipitates and dried milks from the amino acid composition. *Latte*, **45**, 23-28.

Resmini, P. y Pellegrino, L. (1998). Determination of casein/caseinate in cheeses and processed cheese by HPLC methods. Theoretical possibilities. Documento distribuido en la 2ª Reunión del Proyecto SMT-4-CT97-2208 de la Unión Europea.

van Riel, J. y Olieman, C. (1995a). Determination of caseinomacropptide with capillary zone electrophoresis and its application to the detection and estimation of rennet whey solids in milk and buttermilk powder. *Electrophoresis*, **16**, 529-533.

van Riel, J. y Olieman, C. (1995b). Selective detection in RP-HPLC of Tyr-Trp-, and sulfur-containing peptides by pulsed amperometry at platinum. *Anal. Chem.*, **67**, 3911-3915.

Rogers, S.A., Slattery S.L., Mitchell, G.E., Hirst, P.A. and Grieve, P.A. (1989) The relationship between somatic cell counts, composition and manufacturing properties of bulk milk. 3. Individual proteins. *Aust. J. Dairy Technol.*, **44**, 49-52.

Rothbauer, V. (1999). Evaluation of capillary electrophoretic methods for the detection of added casein/ caseinate to processed cheese. Proyecto fin de carrera. Universidad de Munich, Alemania.

Rowe, M. y Gilmour, A. (1985). The present and future importance of psychrotrophic bacteria. *Dairy Ind. Int.*, **50**, 15-19.

Rowland, S.J. (1938). The determination of the nitrogen distribution in milk. *J. Dairy Res.*, **9**, 42-46.

Salvadori del Prato, O. (1993). I formaggi freschi e le loro tecnologie. *Latte*, **18**, 166-173.

Singh, H. y Creamer, L.K. (1991). Denaturation, aggregation and heat stability of milk protein during the manufacture of skim milk powder. *J. Dairy Res.*, **58**, 269-283.

Singh, H. y Creamer, L.K. (1992), Heat stability of milk. En *Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins*, ed. P.F. Fox, Elsevier Science Publishers, Londres, pp. 621-656.

Singh, H. y Fox, P.F. (1989). Heat-induced changes in casein. *Bull. IDF.*, **238**, 24-30.

Snoeren, T.H.M., Van der Spek, C.A., Dekker, R. y Both, P. (1979). Proteolysis during the storage of UHT-sterilized whole milk. 1. Experiments with heated by the direct system for 4 seconds at 142°C. *Neth. Milk Dairy J.*, **33**, 31-39.

Sohal, T.S., Roehl, D. y Jelen, P. (1988). Rennet as a cause of bitterness development in Quarg. *J. Dairy Sci.*, **71**, 3188-3196.

Spreer, E. (1991). Elaboración del queso. En *Lactología industrial*. Ed. Acribia, Zaragoza, pp. 299-428.

SPSS (1999). SPSS Inc, 1989-1999 para Windows 9.0.

Stadhouders, J. (1975). Microbes in milk and dairy products. An ecological approach. *Neth. Milk Dairy J.*, **29**, 104-109.

Swaisgood, H.E. (1992). Chemistry of the caseins. En *Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins*, ed. P.F. Fox, Elsevier Science Publishers, Londres, pp. 63-110.

Thomas, M.A., Turner, A.D., Abad, G.H. y Towner, J.A. (1977). Effect of heat treatment, moisture content and storage time of skim milk powder on reconstitution characteristics, starter activity, whey protein nitrogen and distribution of its fractions. *Milchwissenschaft*, **32**, 408-411.

Tunick, M.H., van Hekken, D.L., Smith, P.W., Malin, E.L. y Holsinger, V.H. (2000) Characteristics of Mozzarella cheeses made with fortified milk or nonfat dry milk. *Milchwissenschaft*, **55**, 450-453.

Varnam, A.H. y Sutherland, J.P. (1994). Productos basados en proteínas lácteas. En *Leche y Productos lácteos. Tecnología, Química y Microbiología*. Ed. Acribia S. A. Zaragoza. España. pp-167-190.

Visser, S., Glangen, K.J. y Rollema, H.S. (1991) Phenotyping of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **548**, 361-370.

Wahlgren, M., Drakenberg, T., Vogel, H.J. y Dejmek, P. (1986). ³¹P-nuclear magnetic resonance study on milk fractions. *J. Dairy Res.*, **53**, 539-545.

Walstra, P. y Jenness, R. (1984). Protein composition of milk. En *Dairy Chemistry and Physics*. Ed. John Willey & Sons, Nueva York, USA, pp. 106-108.

West, D.W. (1986). Structure and function of the phosphorylated residues of casein. *J. Dairy Res.*, **53**, 333-352.

Wilson, C., Matthews, F., Greasham, R.L., Will, M. y Copeland, R.A. (1989). Application of fourth derivative absorption spectroscopy to protein quantitation during purification. *Anal. Biochem.*, **182**, 141-145.

Wolfschoon-Pombo, A.F. y Moreira Furtado, M.A. (1989). Detection of adulteration of pasteurised milk with whey by determination of the casein-bound phosphorus and protein nitrogen content. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **188**, 16-21.

Zeece, M.G., Holt, D., Wehling, R.L., Liewen, M.B. y Bush, L.R. (1989). High resolution two-dimensional electrophoresis of bovine caseins. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 378-383.

Zittle, C.A. y Custer, J.H. (1963). Purification and some of the properties of α_s -casein and κ -casein. *J. Dairy Sci.*, **46**, 1183-1188.