

Autor: TERESA DELGADO HERVAS

**CONTENIDO EN FUROSINA, LACTULOSA Y
B-LACTOGLOBULINA COMO INDICADORES DE
CALIDAD EN LECHE LIQUIDA Y EN POLVO**

Directores: NIEVES CORZO SANCHEZ Y AGUSTIN OLANO VILLEN

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Farmacia
Departamento de Nutrición y Bromatología II**

1993

INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES



AGUSTIN OLANO VILLEN, DR. EN CIENCIAS QUIMICAS, PROFESOR DE INVESTIGACION DEL INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES DEL C.S.I.C.

C E R T I F I C A: que el presente trabajo titulado "Contenido en furosina, Lactulosa y β -Lactoglobulina como indicadores de calidad en leches líquidas y en polvo" y que constituye la Memoria que presenta la Licenciada Teresa Delgado Hervás para optar al grado de Doctor, ha sido realizado en el Instituto de Fermentaciones Industriales del C.S.I.C., bajo mi dirección y la de la Dra. Nieves Corzo Sánchez, Colaborador Científico del C.S.I.C.

Y para que conste firmo el presente certificado en Madrid a dieciocho de Noviembre de mil novecientos noventa y dos.

Nieves Corzo

Agustín Olano



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado en el Instituto de Fermentaciones Industriales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección de los doctores Nieves Corzo y Agustín Olano Villén, a quienes agradezco su inestimable ayuda en todas las facetas del trabajo.

También quiero agradecer a la Dra. Amparo Díaz Marquina, del Departamento de Bromatología de la Facultad de Farmacia, el haber aceptado ser ponente de esta Tesis.

Desearía expresar mi gratitud, especialmente a mis compañeros de Unidad Estructural, Mayte, Espe, Mar, David, Pepa, Julián y Marta, que no vacilaron en prestarme su ayuda en los momentos más difíciles, y sin los cuales no habría podido finalizar este trabajo.

Estoy sinceramente agradecida al Dr. Guillermo Santa-María por enseñarme todo lo que actualmente sé sobre informática y el manejo de los diferentes programas.

No puedo olvidarme, por supuesto, de mis antiguos compañeros de Unidad, que siempre confiaron en mí y me animaron a seguir adelante (Maribel E., Maribel I., M^a Tere, M^a Carmen, Javier, Begoña, Luz, Marisa, Begoña J., Belén, Mercedes, Pepe y Juani).

Quisiera hacer una mención especial a la Dra. Nieves Corzo, no solo por su ayuda en la realización de esta memoria, sino por la amistad y el cariño demostrado durante tantos años.

Por último, agradezco a la Dra. Carmen Polo, Directora del Instituto de Fermentaciones Industriales, las facilidades con que he contado para que esta Tesis pudiera llevarse a cabo.

INDICE

INDICE

1. INTRODUCCION

1.1. Composicion de la leche	1
1.2. Tratamientos termicos	1
1.2.1. Termización	3
1.2.2. Pasteurización	3
1.2.3. Esterilización	4
1.2.4. Desecación	9
1.3. Modificaciones de las fracciones de carbohidratos y proteínas durante el tratamiento térmico y la conservación	13
1.3.1. Reacción de Maillard	13
1.3.1.1. Factores que influyen en la reacción de Maillard	18
1.3.1.2. Aspectos nutricionales y tóxicos de la reacción de Maillard.....	21
1.3.2. Desnaturalización de seroproteínas	23
1.3.3. Degradación de caseínas	27
1.3.3.1. Proteólisis de las caseínas	28
1.3.4. Interacción proteína-proteína	29
1.3.5. Isomerización y degradación de lactosa	30
1.3.5.1. Lactulosa	32
1.4. Parámetros utilizados en la evaluación del deterioro de los constituyentes	36
1.4.1. Determinación de la lisina disponible	36
1.4.2. Determinación de HMF	39
1.4.3. Furosina	41
1.4.3.1. Métodos de análisis de furosina	45
1.4.4. Otros compuestos	47
1.4.5. Determinación de lactulosa	49
1.4.5.1. Métodos espectrofotométricos	50
1.4.5.2. Métodos enzimáticos	50
1.4.5.3. Métodos cromatográficos	51
1.4.6. Determinación de seroproteínas no desnaturalizadas	55
OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	57

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Preparación de las muestras	60
2.1.1. Síntesis de sustancias patrón	60
2.1.1.1. Síntesis de fructosil-lisina	60
2.1.1.2. Síntesis de furosina y piridosina	61
2.1.2. Preparación de sistemas modelo que simulan un ultrafiltrado de leche (SMUF)	62

2.1.2.1. SMUF con lactosa	62
2.1.2.2. SMUF con lactosa y α -acetil-lisina	62
2.1.2.3. SMUF con fructosil-lisina	62
2.1.3. Elaboración de sistemas en polvo. Atomización	63
2.1.4. Muestras de leche comerciales	65
2.1.4.1. Leches UHT	65
2.1.4.2. Leches en polvo	65
2.2. Ensayos de conservación	66
2.2.1. Sistemas en polvo	66
2.2.1.1. Preparación de soluciones saturadas	66
2.2.1.2. Condiciones de conservación	67
2.2.2. Sistemas líquidos	67
2.2.2.1. Evolución de α -acetil-fructosil-lisina	67
2.2.2.2. Leches UHT	68
2.3. Técnicas analíticas	68
2.3.1. Cromatografía en capa fina	68
2.3.1.1. α -acetil-fructosil-lisina	69
2.3.1.2. Furosina y piridosina	69
2.3.2. Cromatografía de gases	70
2.3.2.1. Preparación de las muestras	70
2.3.2.2. Condiciones cromatográficas	71
2.3.3. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	72
2.3.3.1. Furosina y piridosina. Puesta a punto del método analítico	72
2.3.3.2. Seroproteínas no desnaturalizadas	76
2.3.4. Otras técnicas analíticas	78
2.3.4.1. Espectroscopía ultravioleta-visible	78
2.3.4.2. Análisis elemental	79
2.3.4.3. Espectroscopía infrarroja	79
2.3.4.4. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	79

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Síntesis de fructosil-lisina	81
3.2. Síntesis de furosina y piridosina	82
3.3. Análisis de furosina y piridosina por HPLC. Optimización del método	90
3.3.1. Análisis cuantitativo de furosina	95
3.3.1.1. Linealidad de respuesta	95
3.3.1.2. Precisión del método	99
3.3.1.3. Recuperación del método	100
3.3.2. Análisis cuantitativo de piridosina	101
3.3.3. Cálculo del contenido en lactulosil-lisina, a partir de la determinación de furosina	103
3.4. HPLC de seroproteínas no desnaturalizadas	103
3.4.1. Análisis cuantitativo de α -lactoalbúmina	

y β -lactoglobulina.....	103
3.5. Modificaciones durante el almacenamiento de leches UHT	107
3.5.1. pH	107
3.5.2. Furosina	107
3.5.3. Lactulosa	115
3.5.4. Seroproteínas no desnaturalizadas	120
3.6. Conservación de los sistemas en polvo	123
3.6.1. SMUF con lactosa y α -acetil-lisina	123
3.6.2. Leche en polvo	128
3.6.3. Concentrado de proteínas de suero (WPC)	138
3.7. Análisis de leches comerciales	145
3.7.1. Leches UHT	145
3.7.2. Leches en polvo	150
3.8. Apéndice de tablas.....	154
4. CONCLUSIONES.....	175
5. BIBLIOGRAFIA.....	176

I. INTRODUCCION

1.1. COMPOSICION DE LA LECHE.

La leche es un líquido complejo cuyo componente principal es el agua en la que se encuentran una gran variedad de constituyentes bien en disolución o en diferentes estados de dispersión. En la presente memoria se utiliza la palabra leche para designar la leche de vaca. Cuando se trata de otro tipo de leche se indica el nombre de la especie correspondiente.

Se estima que la leche contiene aproximadamente unas 100.000 especies moleculares distintas, de las cuales la mayor parte no se han identificado, y ni siquiera se han aislado.

Una idea resumida de la composición y estructura de la leche se muestra en la tabla 1, donde se dan valores medios de contenido ya que factores tales como estado de lactación, raza, alimentación, y edad del animal pueden influir considerablemente.

1.2. TRATAMIENTOS TERMICOS.

La leche es un producto extremadamente lábil que se altera rápidamente, siendo las alteraciones de origen microbiano las más frecuentes y las primeras en aparecer. Por ello se recurre a la utilización de una serie de procesos tecnológicos destinados a su conservación. Estos van dirigidos principalmente a detener el crecimiento de la flora microbiana, así como a protegerla de las alteraciones de origen químico y físico-químico.

De entre todos los métodos de conservación existentes, son los físicos los más utilizados y dentro de estos los tratamientos por el calor. Los tratamientos térmicos aplicados en la industria a la leche son los siguientes:

- 1.2.1. Termización
- 1.2.2. Pasterización
- 1.2.3. Esterilización
- 1.2.4. Desecación

**Tabla I. Composición y estructura de la leche.
Cantidades medias aproximadas por Kg de leche.**

<u>Glóbulo graso</u>	<u>Membrana</u>	<u>Micela de caseína</u>
Glicéridos triglicéridos....38g diglicéridos....0,1g monoglicéridos..10mg Ácidos grasos....25mg Esteroles.....100mg Carotenoides....0,4mg Vitaminas A,D,E,K.....2mg Agua.....60mg Otros.....30mg	Agua.....86mg Proteína.....350mg Lípidos fosfolípidos.....210mg cerebrósidos.....30mg gangliósidos.....5mg glicéridos neutros..+ esteroles.....15mg Enzimas fosfatasa alcalina..+ xantinoxidasa.....+ Cu.....4µg Fe.....100µg	Proteína caseína.....26,0g proteosa-peptona..0,4g Sales Ca.....800mg fosfato.....950mg citrato.....140mg Mg,K,Na,Zn.....150mg Enzimas principales lipoproteinlipasa..+ plasmina.....+ Agua.....+
<u>Leucocito</u>	<u>Partícula lipoproteica</u>	
Enzimas p. ej. catalasa Ácidos nucleicos	Lípidos polares Proteína Enzimas	
<u>Suero</u>		
Agua.....870g Carbohidratos lactosa.....46g otros.....=0,1g Minerales Ca.....370mg Mg.....75mg K.....1340mg Na.....460mg Cl.....1060mg fosfato.....1080mg sulfato.....100mg bicarbonato....100mg Elementos traza Zn.....400µg Fe.....100µg Cu.....20µg	Ácidos orgánicos citrato.....1600mg formiato.....40mg acetato.....30mg lactato.....30mg oxalato.....20mg otros.....20mg Gases oxígeno.....6mg nitrógeno.....15mg Lípidos glicéridos neutros....+ ácidos grasos.....15mg fosfolípidos.....110mg cerebrósidos.....10mg esteroles.....15mg Vitaminas vitaminas B.....200mg ácido ascórbico....20mg	Proteínas caseína.....+ β-lactoglobulina..3,2g Ó-lactoalbúmina...1,2g BSA.....400mg inmunoglobulinas.750mg proteosa-peptona=250mg otras.....400mg Compuestos nitrogenados no proteicos urea.....300mg péptidos.....200mg aminoácidos.....300mg Esteres fosfóricos300mg Enzimas principales lactoperoxidasa....+ fosfatasa ácida....+ Alcohol.....3mg

Walstra y Jenness (1987).

1.2.1. Termización.

El objetivo de la termización es mantener la calidad de la leche cruda durante el periodo de refrigeración previo al procesado en planta. Es un tratamiento térmico de menor intensidad que la pasteurización baja, que consiste en calentar la leche a 60-65°C de 10 a 20 segundos. Con este tratamiento se consigue la destrucción de la mayoría de las bacterias psicótrofas presentes en la leche, productoras de lipasas y proteasas termorresistentes.

Una alternativa a este proceso es el tratamiento de la leche cruda con CO₂. Se ha demostrado que la utilización de este gas inhibe el desarrollo de las bacterias psicótrofas, así como el de otros microorganismos, en la leche, evitando la producción de lipasas y proteasas exógenas.

Eie y col. (1987) trataron leche cruda con CO₂ hasta un pH<6 sometiénola, al cabo de un tiempo de refrigeración, al proceso de atomización. La leche en polvo obtenida no presentó diferencias apreciables con el control, que no fué previamente tratado.

1.2.2. Pasterización.

Es un proceso de conservación e higienización en unas condiciones de calentamiento tales que permiten la destrucción del bacilo tuberculoso (*Mycobacterium tuberculosis*) y por consiguiente la de todos los microorganismos patógenos así como de una gran proporción de gérmenes banales. Se obtiene así una leche que cumple con las normas bacteriológicas fijadas por la legislación.

Existen dos métodos de pasterización:

Pasterización en discontinuo.

La leche es sometida a una temperatura de 63°C durante 30 minutos. Es un proceso lento y poco utilizado actualmente.

Pasterización en flujo continuo.

Se le conoce con el nombre de H.T.S.T. (High temperature short time), procedimiento a alta temperatura y corta duración. Es un método rápido y continuo, y en la actualidad el más utilizado. Según las condiciones del proceso se denomina:

- Pasterización alta. (Tratamiento a 71-75°C durante 15-40 segundos).

- Pasterización ultra-alta. (Tratamiento a 85-90°C durante un tiempo de 2 a 10 segundos).

1.2.3. Esterilización.

El proceso de esterilización tiene por objeto la conservación prolongada de la leche por destrucción de los microorganismos presentes en ella, tanto en su forma vegetativa como esporulada.

La esterilización se puede realizar de dos maneras:

- a) Esterilización en recipientes herméticos.
- b) Esterilización en flujo continuo.

1.2.3.1. Esterilización en recipientes herméticos.

Es conveniente que la esterilización vaya precedida de un tratamiento térmico en flujo continuo mediante el que se consigue la eliminación de la mayoría de los gérmenes en unas condiciones térmicas más suaves. La preesterilización se realiza habitualmente a 130-140°C durante 3 ó 4 segundos.

A continuación se homogeneiza la leche con objeto de estabilizar la emulsión de la grasa. Se consigue mediante este proceso la reducción del tamaño de los glóbulos grasos hasta un diámetro de 1 a 2 μ . La disminución del volumen de los glóbulos rebaja su fuerza ascensional e impide que se acumulen en la superficie de la leche.

La leche así tratada y envasada herméticamente, se esteriliza en autoclaves alimentados discontinua o continuamente.

Actualmente, y debido al volumen de leche a tratar, se tienden a utilizar aparatos de alimentación continua. Se consigue mediante este sistema que, manteniendo la temperatura de esterilización, los recipientes sean introducidos sin interrupción en el autoclave donde rápidamente alcanzan la temperatura deseada y por lo tanto el tratamiento térmico es mas corto. Para aplicar el procesado térmico se pueden seguir dos procedimientos:

- La técnica inglesa (procedimiento Webster) que utiliza una temperatura relativamente baja: 110°C durante 40 minutos, suprimiéndose a veces la preesterilización.

- Las técnicas holandesa (procedimiento Stork) y francesa (procedimiento Carvallo y Breil), que utilizan el proceso de preesterilización seguido de un tratamiento a 115-120°C durante 20 minutos.

1.2.3.2. Esterilización en flujo continuo (UHT).

Este tipo de procesos están basados en el calentamiento a altas temperaturas durante cortos periodos de tiempo "Esterilización UHT" (Ultra High Temperature), seguido de un envasado aséptico.

La temperatura de calentamiento utilizada es de 135 a 150°C durante un tiempo de 2 a 15 segundos. Los procedimientos

utilizados en la esterilización UHT son de dos tipos:

1. Calentamiento indirecto con la utilización de intercambiadores de calor tubulares o de placas.
2. Calentamiento directo en el que la leche entra en contacto con vapor de agua a alta temperatura.

En la figura 1 se muestra el diagrama correspondiente a los dos tipos de esterilización UHT.

UHT Indirecto.

En los sistemas de esterilización UHT, el flujo de la leche debe ser de régimen turbulento para asegurar una transferencia rápida y homogénea del calor. De este modo todo el volumen de leche se encuentra a la misma temperatura durante el mismo período de tiempo.

Los intercambiadores de placas presentan la ventaja frente a los tubulares de alcanzar más rápidamente el régimen turbulento.

UHT Directo.

En los sistemas UHT directo la leche se pone en contacto con vapor de agua sobrecalentado, lo que origina una elevación muy rápida de la temperatura a la vez que se produce una dilución de la leche a un 10% de su peso aproximadamente. Por ello es necesario que el calentamiento vaya seguido de una evaporación del agua de modo que permita reconstituir las proporciones iniciales de los componentes.

Temperatura (°C)

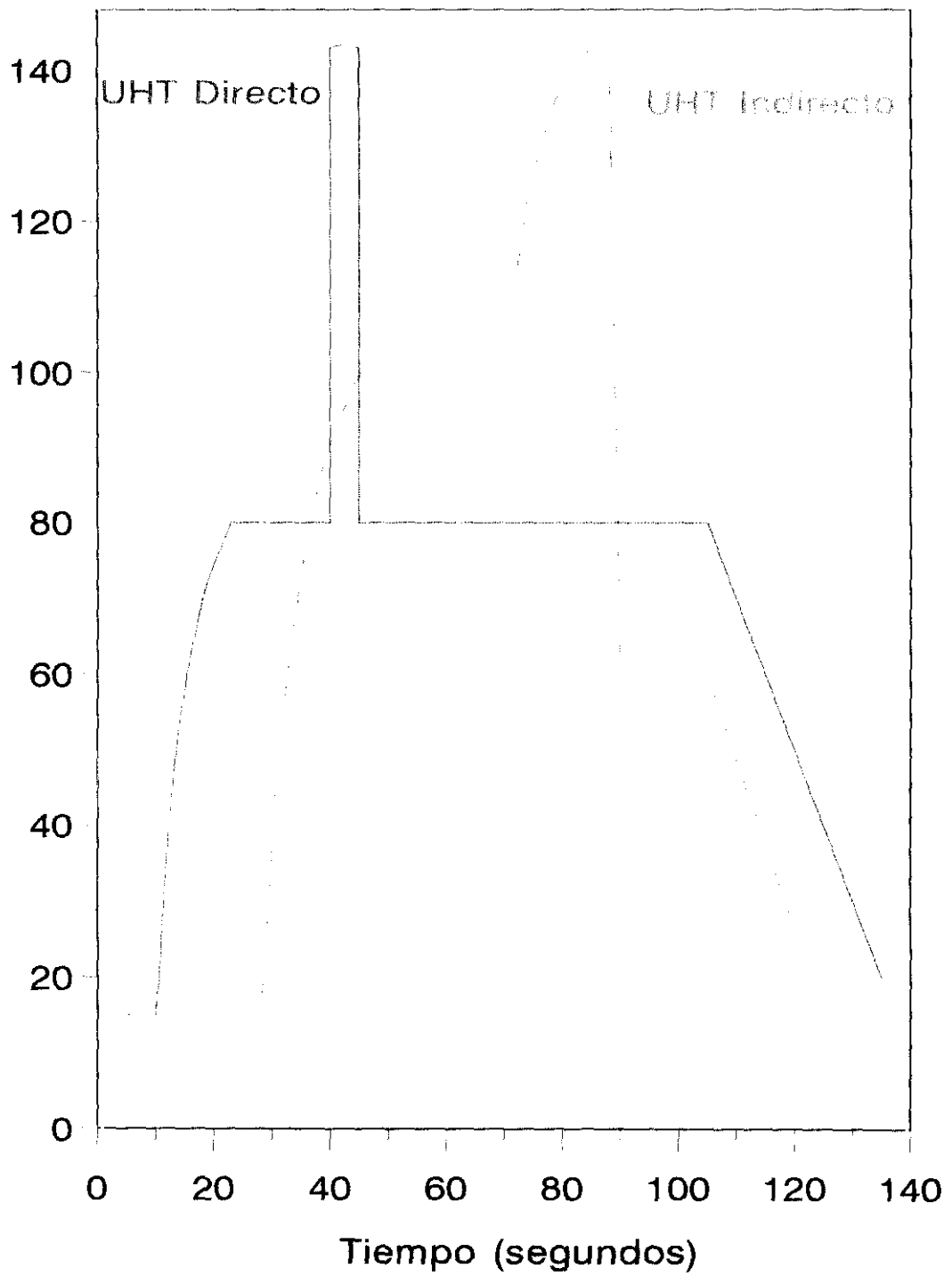


Figura 1. Diagrama de los tratamientos UHT directo e indirecto

Este calentamiento puede realizarse de dos formas:

1. Por inyección de vapor (Uperización). Consiste esencialmente en la inyección de vapor a alta temperatura en una corriente de leche precalentada. Esta inyección se realiza de tal forma que se suma el efecto ultrasónico al de la temperatura.

Para llevar a cabo este procedimiento, la leche a 40-50°C se desgasifica y desodoriza en un recipiente sometido a vacío. A continuación se precalienta a 80°C en un cambiador y se introduce en el sistema de uperización. La inyección de vapor de agua a 13 atmósferas de presión eleva instantáneamente la temperatura del producto a 140-150°C. Seguidamente, en una cámara de expansión se produce la evaporación de un volumen de agua igual al aumento debido a la inyección de vapor, y la leche se homogeneiza por choque violento contra las paredes, evitando así que los glóbulos grasos puedan ascender a la superficie.

2. Dispersión de la leche en el vapor. La leche es dispersada en un recinto con vapor de agua sobrecalentado. Instantáneamente, por condensación del vapor, la leche alcanza una temperatura de 140-150°C. El producto pasa a un segundo recinto donde se ha hecho el vacío, y el vapor condensado se evapora al descender bruscamente la temperatura de la leche hasta 70-75°C.

Ambos tipos de tratamiento UHT presentan ventajas e inconvenientes. El calentamiento UHT directo provoca mínimas transformaciones en los componentes lácteos debido a la rapidez del cambio térmico. La proporción de proteínas del suero desnaturalizadas es menor que en los métodos indirectos, y se produce una desoxigenación total de la leche favorable para su conservación. El inconveniente es el elevado coste de las instalaciones y la necesidad de realizar una homogeneización aséptica del producto.

El principal inconveniente de los métodos indirectos es que

favorecen la formación de depósitos en las superficies del intercambiador, disminuyendo la transmisión de calor entre la leche y el fluido calefactor.

1.2.4. Desecación.

La leche en polvo es un producto de fácil conservación, y presenta la ventaja de contener todo el extracto seco de la leche en un volumen reducido, lo que supone un ahorro importante en los procesos de conservación y transporte.

La leche en polvo puede ser entera o desnatada, y según la legislación el contenido en humedad debe ser del 2-2,5% y 4-4,2% respectivamente.

Actualmente la leche en polvo se obtiene por atomización a partir de una leche líquida sometida previamente a tratamiento térmico.

Según el tratamiento térmico sufrido en el proceso de precalentamiento las leches en polvo se pueden clasificar en cuatro tipos:

- a. de extrabaja temperatura (extra-low heat powder).
- b. de baja temperatura (low heat powder).
- c. de temperatura media (medium heat powder).
- d. de alta temperatura (high heat powder).

Desde la recepción de la leche y hasta la obtención de la leche en polvo entera y desnatada, son varios los tratamientos aplicados. En la figura 2 se presenta el esquema de las distintas etapas por las que transcurre el proceso de obtención de leches en polvo.

En el caso de la leche entera hay un primer proceso de homogeneización, para obtener una disminución en el tamaño de los glóbulos de grasa, seguido de un proceso de estandarización del

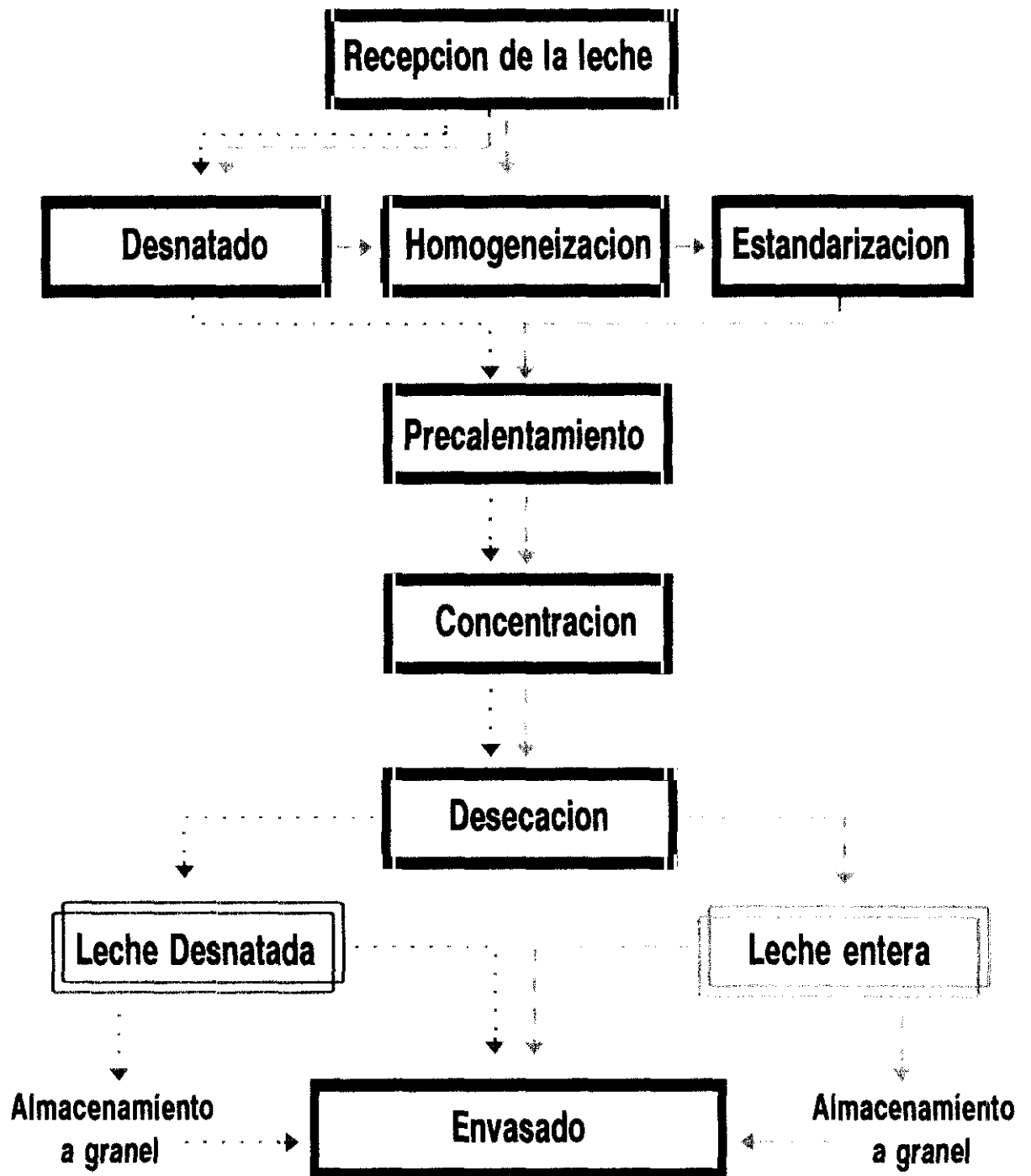


Figura 2. Esquema de las diferentes etapas para la obtención de leches en polvo.

contenido en materia grasa. A veces el primer proceso es el desnatado de la leche entera para a continuación estandarizar el contenido de la materia grasa por adición de la nata, previamente homogeneizada, en las concentraciones adecuadas.

El siguiente proceso es el precalentamiento de la leche para conseguir la eliminación de los gérmenes patógenos. El tipo de tratamiento térmico utilizado es determinante en muchas de las propiedades del producto final. Son tres tipos los más utilizados:

Precalentamiento a baja temperatura.

Generalmente se somete la leche a un tratamiento equivalente a la pasteurización alta, es decir 72°C durante 16 segundos. La desnaturalización de las proteínas del suero es baja, exigiéndose unos contenidos mínimos de 6 mg/g. En algunos casos la legislación específica que la desnaturalización debe ser inferior al 10%. La leche de partida debe ser de muy buena calidad para que el producto final cumpla las normas bacteriológicas.

Precalentamiento a temperatura media.

Las temperaturas utilizadas oscilan entre 76,5-85°C durante 15-30 segundos. En este tipo de leche el contenido en proteínas de suero no desnaturalizadas debe estar comprendido entre 1,5-6 mg/g de leche en polvo desnatada.

Precalentamiento a alta temperatura.

El tratamiento aplicado oscila entre los 90°C y 110°C durante pocos segundos, e incluso 121°C un segundo. El contenido en proteínas de suero no desnaturalizadas es menor de 1,5 mg/g de leche en polvo desnatada.

El siguiente proceso es la concentración de la leche

El siguiente proceso es la concentración de la leche tratada hasta un 40-45% de sólidos totales. El procedimiento utilizado es la evaporación a vacío.

Por último la leche se somete al proceso de desecación por atomización, que consiste en pulverizar la leche en forma de pequeñas gotas o niebla en el interior de una cámara por la que circula una corriente de aire calentado previamente para eliminar la humedad, ya que cuanto más seco esté más eficaz será el proceso permitiendo una disminución de la temperatura. El aire se hace circular en sentido ascendente o bien se le da un movimiento ciclónico, que suele ser la técnica más utilizada. En la actualidad existen nuevos desecadores que combinan la contracorriente y la técnica del lecho fluidificado con lo que se reducen las temperaturas y los tiempos de contacto del aire con las gotitas de leche.

La recuperación de las partículas de leche en polvo se realiza utilizando cámaras de fondo cónico junto con corrientes de aire complementarias, evitando así un calentamiento prolongado del polvo.

Durante este proceso y con el fin de obtener un polvo de las mejores características es importante el control de las temperaturas de entrada y salida del aire caliente, así como de la temperatura y concentración de la leche en la entrada de la cámara y del flujo y tamaño de las gotas durante el proceso.

1.3. MODIFICACIONES DE LAS FRACCIONES DE CARBOHIDRATOS Y PROTEINAS DURANTE EL TRATAMIENTO TERMICO Y LA CONSERVACION.

Los distintos tratamientos térmicos aplicados a la leche y su posterior conservación, afectan en mayor o menor grado a los componentes mayoritarios dependiendo de la severidad del tratamiento. Las modificaciones se traducen generalmente en una pérdida del valor nutritivo y en la variación de sus propiedades organolépticas. Las modificaciones en las que intervienen las proteínas y/o los carbohidratos son muy complejas, pero de forma simplificada pueden agruparse del modo siguiente:

- 1.3.1. Reacción de Maillard.
- 1.3.2. Desnaturalización de seroproteínas.
- 1.3.3. Degradación de caseínas.
- 1.3.4. Interacción proteína-proteína.
- 1.3.5. Isomerización y degradación de lactosa.

1.3.1. Reacción de Maillard.

La reacción de Maillard es una de las reacciones más importantes que tienen lugar en el procesado térmico de los alimentos. Fué descubierta por el químico francés Maillard (1912) estudiando el calentamiento de una solución de glucosa con lisina, y consiste en un conjunto de reacciones relacionadas que todavía no han sido elucidadas en su totalidad. Hodge (1953) recopiló toda la información disponible en un esquema simplificado (figura 3) que sigue siendo considerado en la actualidad como la descripción más apropiada del proceso de pardeamiento no enzimático.

La reacción de Maillard modifica las propiedades organolépticas de los alimentos al formarse una gran variedad de compuestos que son los responsables de los sabores, aromas y color característicos. También da lugar a una pérdida del valor nutritivo, debido a la disminución de la biodisponibilidad de los aminoácidos implicados en el proceso.

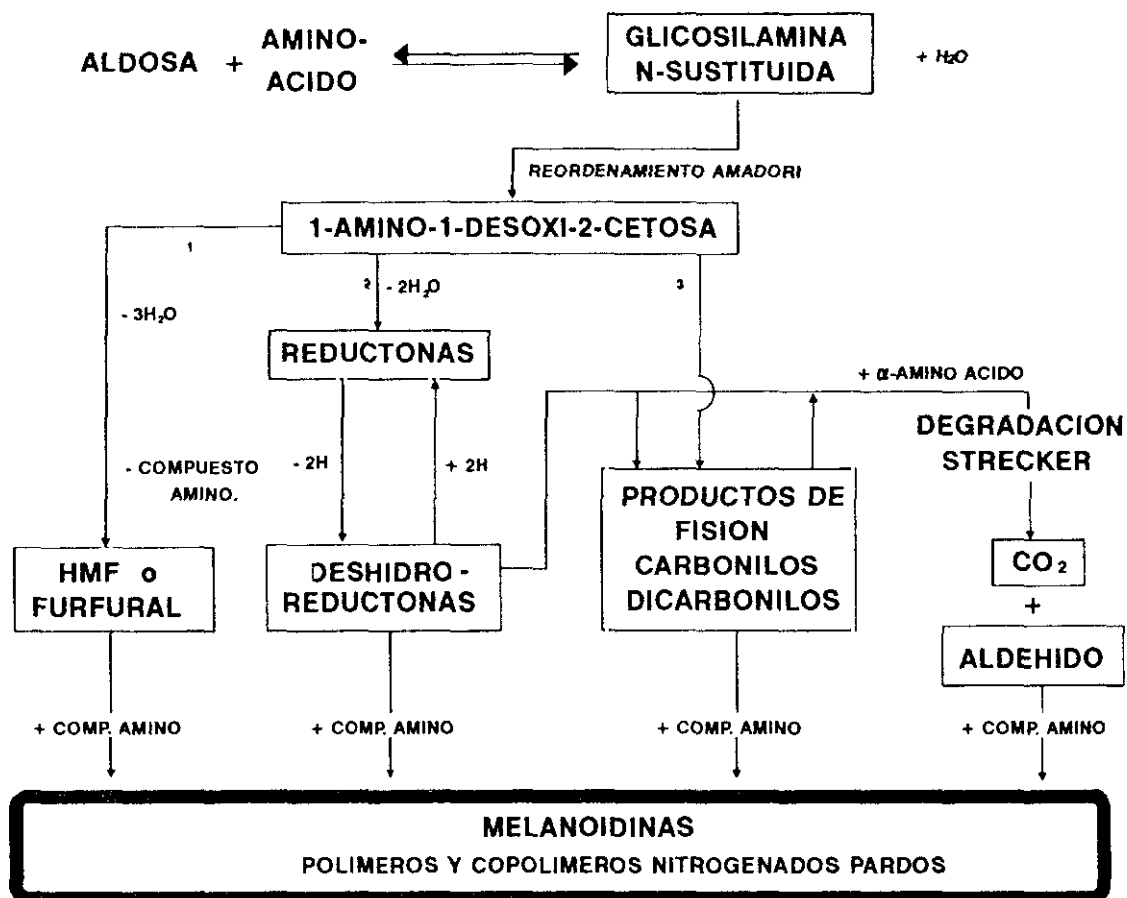


Figura 3. Esquema de la reacción de Maillard según Hodge (1953).

Como se puede apreciar en la figura 3, la reacción de Maillard transcurre en distintas etapas hasta la formación final de pigmentos pardos de alto peso molecular llamados melanoidinas.

Podemos hacer una clasificación de las distintas reacciones en tres etapas fundamentales.

Etapas iniciales.

Las primeras etapas de la reacción de Maillard conducen a la formación de una serie de compuestos conocidos como compuestos de Amadori. En el caso de la leche, relativamente rica en lisina con un grupo ϵ -amino libre muy reactivo, es este aminoácido el que reacciona con la lactosa para formar lactulosil-lisina [ϵ -N-(1-desoxi-D-lactulosil)-L-lisina] como compuesto mayoritario. El esquema de formación de estos compuestos se detalla en la figura 4.

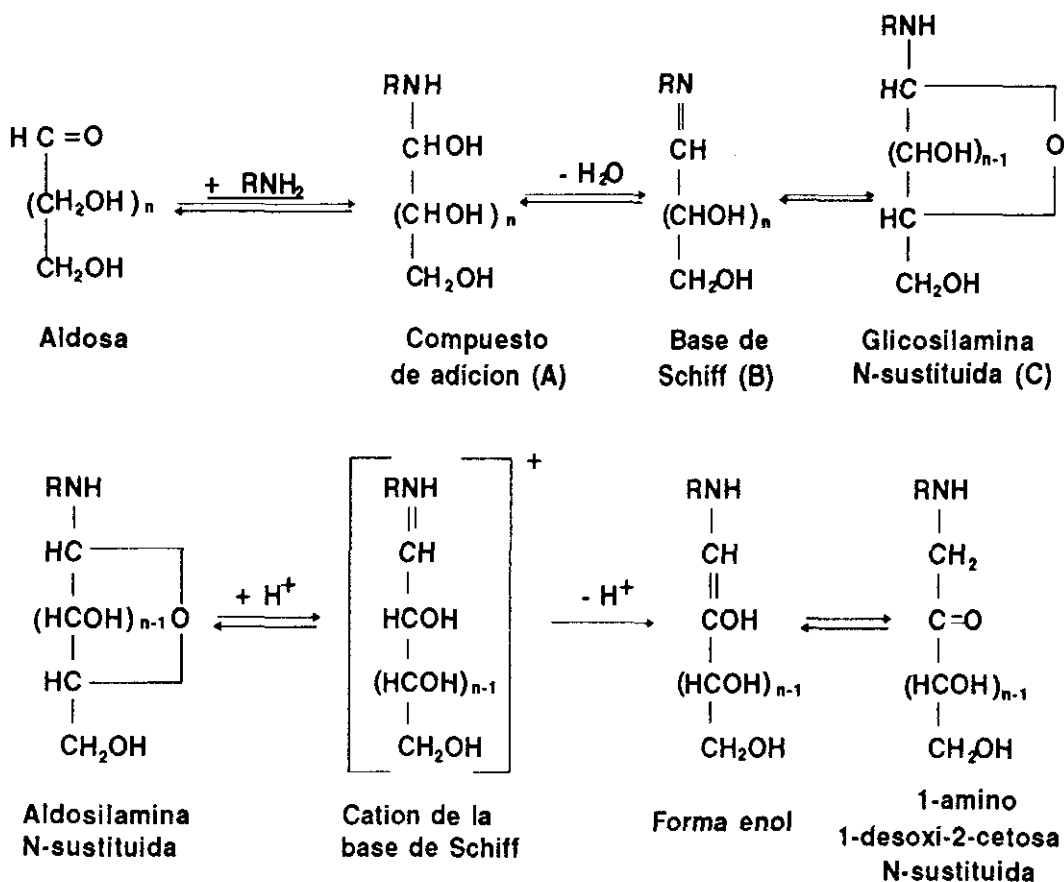


Figura 4. Esquema de las etapas iniciales de la reacción de Maillard. Formación de los compuestos de Amadori

El primer paso es una condensación entre el grupo ϵ -amino de la lisina y el grupo carbonilo de la lactosa dando lugar al

compuesto de adición (A). Esta reacción esta catalizada por las bases que eliminan un protón del grupo amino que se comporta como nucleófilo. A continuación el compuesto así formado pierde una molécula de agua para formar la base de Schiff (B), que seguida de una ciclación posterior se transforma en una glicosilamina N-sustituida (C). Estos compuestos son poco estables, a excepción de los procedentes de aminoácidos aromáticos, y sufren un reordenamiento posterior, pasando por el catión de la base de Schiff, para formar la 1-amino-1-desoxi-2-cetosa correspondiente, que es el primer compuesto irreversible de la reacción (lactulosil-lisina). Esta última reacción se conoce como reordenamiento de Amadori y es la que se produce normalmente en los alimentos. Existe sin embargo otro tipo de reordenamiento conocido como el de Heyns que tiene lugar cuando el azúcar reaccionante es una cetosa formándose la 2-amino-2-desoxi-aldosa correspondiente.

Etapas intermedias.

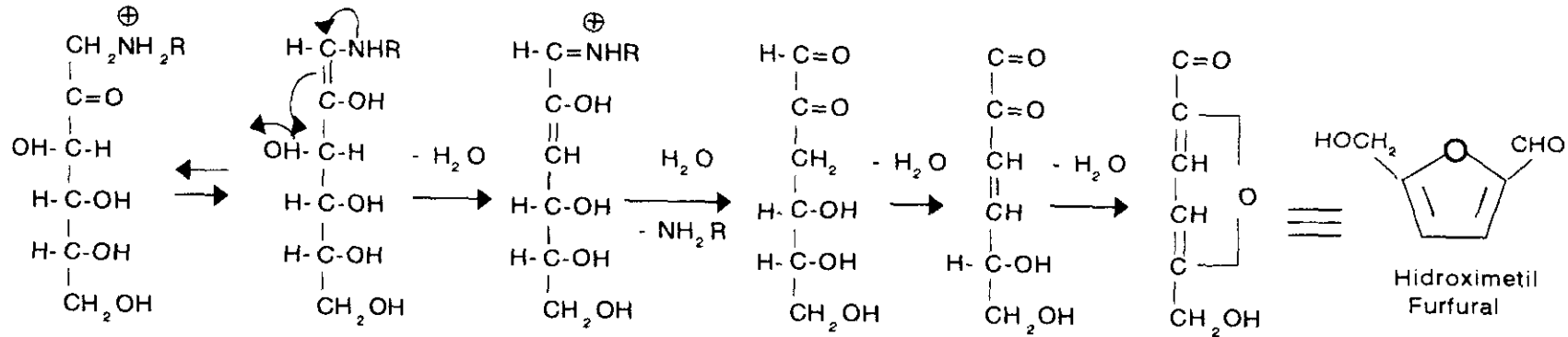
Las siguientes etapas de la reacción parten de la degradación de los compuestos de Amadori, que tiene lugar a través de dos vías fundamentales dependiendo del pH (figura 5).

A pH ácido está favorecida la 1,2-enolización, que por pérdida del grupo hidroxilo en el C₃ conduce a la formación de la 3-desoxiglicosulosa. La pérdida de un segundo hidroxilo en el C₄ y posterior ciclación da lugar a derivados de hidroxi-metil-furfural como compuestos estables.

A pH básico es la 2,3-enolización la reacción favorecida. La eliminación del grupo amino del C₁ da lugar a la formación de la 1-desoxiglicosulosa, compuesto muy inestable. La enolización de este último forma las reductonas y los compuestos dicarbonílicos por hidrólisis, así como una variedad de O-heterociclos (furonas y pironas) por ciclación.

Los distintos compuestos formados en las dos vías de

1,2 ENOLIZACION



17

2,3 ENOLIZACION

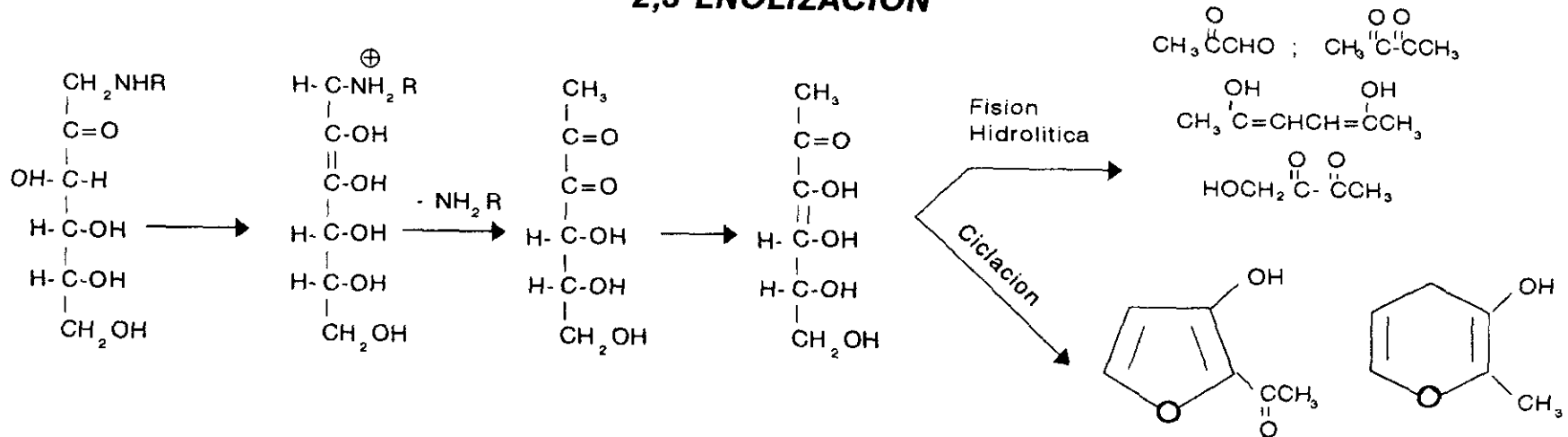


Figura 5. Esquema de las etapas intermedias de la Reacción de Maillard. Degradación de los compuestos de Amadori.

degradación ya mencionadas sufren la reacción conocida como degradación de Strecker al reaccionar con los grupos amino libres dando lugar a una gran variedad de compuestos volátiles, responsables de los distintos aromas y sabores típicos de los alimentos que han sufrido la reacción de Maillard. Dentro de estos compuestos se incluyen los pirroles, pirazinas, oxazoles y tiazoles.

Etapas finales.

Las etapas finales de la reacción de Maillard son muy complejas y, aún hoy, poco conocidas. En ellas se incluyen reacciones de condensación aldólica y polimerizaciones entre grupos aldehído y amino para formar, a partir de los precursores de bajo peso molecular antes mencionados, los polímeros nitrogenados de color marrón conocidos como melanoidinas.

1.3.1.1. Factores que influyen en la Reacción de Maillard.

Los numerosos estudios realizados sobre la reacción de Maillard ponen de relieve la presencia de factores que actúan favoreciendo o inhibiendo la reacción. Estos factores se pueden clasificar en los siguientes grupos.

Naturaleza y concentración de los reactantes.

Los compuestos implicados en la reacción de Maillard son los azúcares reductores y los aminoácidos con grupos amino libres presentes en las proteínas.

En los primeros estudios de la reacción con la utilización de sistemas modelos se vio que los monosacáridos son más reactivos que los disacáridos y estos a su vez que los oligosacáridos. Dentro de los monosacáridos las pentosas son más reactivas que las hexosas, y las aldosas más que las cetosas (Lewis y Lea, 1950; Pomeranz y col., 1962; Burton y McWeeney, 1963). En trabajos más recientes Kato y col. (1986, 1988)

comprueban que en el calentamiento de ovoalbúmina con varias aldohexosas y lactosa, el pardeamiento es mayor para la galactosa seguida de glucosa, y mucho menor con la utilización de lactosa.

En el caso de las leches, se ha comprobado este hecho al comparar los resultados obtenidos durante el tratamiento térmico y la conservación de leches con lactosa hidrolizada (Lea, 1948; Burvall y col., 1978; Rawson y Mahoney, 1983; Mittal y col., 1988). El pardeamiento es mucho mayor cuando la lactosa se encuentra hidrolizada, debido a la mayor reactividad de los monosacáridos resultantes.

La naturaleza de los aminoácidos también tiene una marcada influencia sobre la velocidad de la reacción. De todos ellos L-lisina es el más reactivo con diferencia debido a la presencia de un grupo ϵ -amino libre. Ashoor y Zent (1984) hacen una clasificación de los aminoácidos según su reactividad en tres grupos:

- pardeamiento alto (lisina, glicina, triptófano y tirosina).
- pardeamiento intermedio (prolina, leucina, isoleucina, alanina, hidroxiprolina, fenilalanina, metionina, valina, glutamina y asparragina).
- pardeamiento bajo (histidina, treonina, arginina, cisteína, ácido aspártico y ácido glutámico).

Actividad de agua (a_w).

En la conservación de alimentos desecados el efecto de la actividad de agua es de gran importancia en el desarrollo de la reacción de Maillard. En general se puede decir que un aumento de la actividad de agua supone un incremento en la velocidad de la reacción hasta alcanzar un máximo. Labuza y Saltmarch (1981) en el estudio del almacenamiento de seroproteínas en polvo, observan que el pardeamiento y la pérdida de lisina disponible es máximo a una a_w de 0,44, mientras que en el almacenamiento de

leches en polvo es a una actividad de agua de 0,6-0,7 con la que se obtiene el mayor grado de reacción de Maillard.

Actividades de agua muy elevadas conducen, sin embargo, a una inhibición del pardeamiento debido a un efecto de dilución de los reactantes (Labuza, 1980).

El rango de actividades de agua en el cual la reacción se ve favorecida ha sido descrito por los distintos autores entre 0,3-0,7 (Loncin, 1968; Ben-Gara y Zimmerman, 1972; Warmbier y col., 1976; Burvall y col., 1978; Labuza y Saltmarch, 1981; Kato y col., 1986, 1988; Ringe y Love, 1988; Desrosiers y col., 1989).

Actividades de agua en el rango de 0,2-0,3 se consideran adecuadas para la conservación, ya que las transformaciones son mínimas debido a que este agua se encuentra fuertemente ligada y no es disponible para favorecer las interacciones entre los distintos componentes. Sin embargo Narayan y Cross (1992) hacen un estudio de la interacción entre glucosa y α -acetil-lisina en un rango de actividad de agua de 0,19-0,21 y a 40, 50 y 60°C de temperatura, observando que el grado de reacción de Maillard es superior al que podría esperarse para estos contenidos de humedad.

pH.

El pH y la capacidad tampón del sistema condicionan tanto la velocidad como los mecanismos de degradación de los compuestos de Amadori (Nursten, 1980). La influencia del pH en la velocidad del pardeamiento ha sido estudiada por un gran número de autores mediante el empleo de sistemas modelo, observándose que a pH básico, en el rango de 6-9 la reacción esta favorecida. La disminución o el aumento del pH respecto a dicho rango supone una disminución del pardeamiento al inhibirse determinadas reacciones, sobre todo a pH extremos. A pH ácido hay una disminución, y a pH básico la falta de protones necesarios para los reordenamientos de Heyns y Amadori da lugar a una inhibición

considerable.

Otros factores.

Metales como el cobre y el hierro parecen tener una acción favorecedora sobre la reacción de Maillard (Patton, 1955; Kato y col., 1981). Sin embargo, según Powell y Spark (1971) este efecto podría ser debido a variaciones del pH producidas por las sales.

Otro de los factores catalizadores de la reacción de pardeamiento son los fosfatos. Potman y van Wijk (1989) realizan un detallado estudio sobre sistemas modelo comprobando el efecto catalizador de dichas sales en el rango de pH de 5 a 7, efecto indicado ya por Patton (1955).

Entre los compuestos que inhiben la reacción de Maillard, Patton (1955) incluye una lista de varios como formaldehído, bisulfito sódico, agua oxigenada y anhídrido sulfuroso.

Igualmente se ha comprobado que el aumento de concentración de determinados aminoácidos como ácido glutámico, aspártico y L-cisteina producen una inhibición del pardeamiento (Pokorny y col., 1988; Pham y Cheftel, 1990).

1.3.1.2. Aspectos nutricionales y tóxicos de la reacción de Maillard.

La reacción de Maillard puede reducir seriamente el valor nutritivo de los alimentos cuando estos son sometidos a tratamientos térmicos muy severos. Esto es debido a la destrucción de aminoácidos esenciales y a la formación de compuestos tóxicos y antinutritivos.

El estudio de la toxicidad de los compuestos procedentes de la reacción de Maillard presenta grandes dificultades debido a la complejidad de las reacciones y al escaso conocimiento que en

la actualidad existe sobre ellas. Por todo ello son los compuestos originados en las primeras etapas los más estudiados.

Por lo que se refiere a los productos lácteos, los tratamientos térmicos aplicados en la industria son en general poco intensos, y por tanto los productos de reacción de Maillard presentes en leches procesadas son, fundamentalmente, los originados durante las primeras etapas de la reacción. Solamente aparecen en cantidades apreciables compuestos procedentes de las últimas etapas de la reacción cuando el producto ha sido sobreprocesado o conservado en condiciones inadecuadas.

De los compuestos derivados de la reacción de Maillard, la lactulosil-lisina y sus productos de hidrólisis han sido los más estudiados.

Finot (1973) observó que parte de la lactulosil-lisina suministrada a animales de laboratorio en la dieta se hidrolizaba por rotura del enlace galactosa-glucosa para dar fructosil-lisina, liberándose una cierta cantidad de lisina de la cual solo una pequeña parte es capaz de ser absorbida por el animal (Finot y col., 1977).

Erbersdobler (1977) comprobó que el 30-40% de la fructosil-lisina ligada a caseína administrada era absorbida en el intestino y excretada sin metabolizar por la orina. El resto es metabolizado por la microflora intestinal, excretándose pequeñas cantidades en las heces (Finot y Magnenat, 1981).

Existen también varios estudios referentes al efecto de los compuestos de Amadori sobre el metabolismo mineral. Así Finot y Furniss (1986) indican que la fructosil-lisina ligada a caseína, y no en forma libre, aumenta la excrección urinaria y el contenido de zinc en el riñón, sugiriendo que esta acción puede ser debida a la existencia de péptidos de bajo peso molecular, descritos anteriormente por Ford y Shorrocks (1971). También se

ha observado que los productos de la reacción de Maillard disminuyen la retención de zinc tanto en humanos (Johnson y col., 1983) como en animales de laboratorio (O'Brien y col., 1987).

Numerosos autores han estudiado la mutagenicidad de determinados compuestos procedentes de la reacción de Maillard en sistemas modelo y en alimentos sobrecalentados (Powrie y col., 1981; Jagerstad y col., 1983; Shinohara y col., 1983 y Aeschbacher, 1986). Sin embargo, no existe evidencia de que los productos lácteos sometidos a los tratamientos térmicos convencionales de esterilización puedan tener acción mutagénica sobre el organismo (Sekizawa y Shibamoto, 1986).

1.3.2. Desnaturalización de las seroproteínas.

La leche contiene aproximadamente 33 g/l de proteínas, de los cuales 27 g/l corresponden a las caseínas totales y 6 g/l a las proteínas del suero. Existen además una serie de sustancias nitrogenadas no proteicas que suponen alrededor de 1,5 g/l.

Se define como proteínas del suero a la fracción proteica de la leche que permanece en disolución después de la precipitación de las caseínas a pH 4,6. Son proteínas globulares de elevada hidrofobicidad presentes en leche como monómeros u oligómeros. La β -lactoglobulina en sus dos variantes genéticas A y B, y la α -lactoalbúmina son las proteínas mayoritarias representando el 50 y 12% respectivamente del total de las seroproteínas.

La β -lactoglobulina a temperatura ambiente y en un rango de pH entre 5 y 7 se presenta como un dímero de dos subunidades idénticas, conteniendo dos puentes disulfuro y un grupo tiol libre por molécula. La α -lactoalbúmina es la segunda proteína más abundante de las seroproteínas. Recientemente Hiraoka y col. (1980) vieron que se trataba de una metaloproteína en la cual existe un ión calcio fuertemente ligado sobre los grupos

carboxilo de los aminoácidos ácidos. En leche se presenta como monómero con cuatro puentes disulfuro por molécula.

Otras proteínas presentes en leche son la seroalbúmina (BSA), inmunoglobulinas (Ig), lactoferrina y una serie de enzimas tales como lactoperoxidasa, catalasa, fosfatasa alcalina y plasmina.

El comportamiento de las proteínas de suero frente al calor es muy diferente al de las caseínas. Al tratarse de proteínas globulares con alto contenido en cisteína, bajo contenido en prolina, y no presentar fósforo en su estructura, son más inestables térmicamente que las caseínas.

Durante el tratamiento térmico de la leche se producen cambios en la estructura terciaria de las seroproteínas, manteniéndose los enlaces peptídicos, proceso conocido con el nombre de desnaturalización. Al perderse la estructura proteica, los grupos activos de las proteínas pueden reaccionar con mayor facilidad entre sí, con otras proteínas o con otros componentes tales como los azúcares reductores (lactosa). Una consecuencia visible de esta reacción es la formación de agregados y posterior precipitación de estos. El grado de desnaturalización de las proteínas de suero depende de la intensidad del tratamiento térmico aplicado.

El efecto de la temperatura sobre las proteínas del suero ha sido estudiado por numerosos autores (Larsen y Rolleri, 1955; Lyster, 1970; Ruegg y col., 1977; Hillier y col., 1979; Hillier y Lyster, 1979; de Wit, 1981; de Wit y Klarenbeek, 1984; Bernal y Jelen, 1985), estableciéndose el siguiente orden de mayor a menor estabilidad frente a la desnaturalización por el calor:

α -lactoalbúmina > β -lactoglobulina > BSA

La desnaturalización de las seroproteínas va acompañada de un efecto endotérmico que puede ser observado utilizando la técnica de la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Con el empleo de esta técnica de Wit (1981) y de Wit y Klarenbeek (1984) realizan un estudio profundo sobre la desnaturalización de las seroproteínas totales e individualizadas por acción de la temperatura en un amplio rango (40-150°C). Los resultados obtenidos indican que β -lactoglobulina presenta una temperatura de desnaturalización de 78°C, coincidiendo con los resultados de Ruegg y col. (1977). Se ha observado que el calentamiento por debajo de 78°C supone una desnaturalización reversible debido a una desestabilización de la estructura tridimensional, que es regenerada por un enfriamiento posterior (de Wit, 1981). Un calentamiento más severo da lugar a una desnaturalización irreversible de la proteína inducida por la ruptura de los puentes disulfuro intramoleculares, hecho que ya fué observado por Watanabe y Klostermeyer (1976). Este fenómeno favorece el despliegue y la agregación, dando lugar a la formación de complejos con otras proteínas, especialmente k-caseínas, mediante la formación de puentes disulfuro (Smits y van Brouwershaven, 1980; de Wit, 1981; Doi y col., 1983; Singh y Fox, 1987; Haque y Kinsella, 1988; Singh y Creamér, 1991).

La α -lactoalbúmina es la proteína más resistente de todas frente a la desnaturalización por el calor (Larsen y Rolleri, 1955; Valdicelli y col., 1986). Estos resultados se contradicen sin embargo con los obtenidos por Ruegg y col. (1977) y de Wit y Klarenbeek (1984), en el estudio del comportamiento de α -lactoalbúmina por calorimetría. Estos autores observan que la temperatura de desnaturalización para esta proteína es de 62°C aunque este efecto es reversible en un 90%.

Recientes estudios (Bernal y Jelen, 1984) han demostrado que esta desnaturalización reversible es debida a una disociación del ión calcio ligado a la proteína y su posterior reasociación durante el enfriamiento.

Se ha estudiado también la posible formación de complejos entre α -lactoalbúmina y otras proteínas. Hartman y Swanson (1965) indican que la interacción entre α -lactoalbúmina y k-caseína es muy pequeña o no existe. Sin embargo la formación de un complejo α -lactoalbúmina- β -lactoglobulina es capaz de interaccionar con la k-caseína (Elfagm y Wheelock, 1977; Hunziker y Tarassuk, 1965).

La seroalbúmina (BSA) muestra una desnaturalización a 64°C (de Wit y Klarenbeek, 1984) semejante a la observada para la α -lactoalbúmina. Sin embargo su desnaturalización no presenta el grado de reversibilidad de α -la, por lo cual la BSA es la seroproteína menos resistente frente a los distintos tratamientos térmicos. Su elevada hidrofobicidad hace que un calentamiento a 40-50°C conduzca a la precipitación por pérdida de su estructura terciaria (Macritchie, 1973; Lin y Koenig, 1976). Sin embargo, la BSA desnaturalizada tiene un efecto protector sobre la proteína no desnaturalizada (Terada y col., 1980) por lo que una parte permanece estable después de un calentamiento prolongado a 65°C.

Junto con la temperatura, otra serie de factores como son el pH, la fuerza iónica y la presencia de lactosa, modifican el comportamiento de las seroproteínas frente al calor (Harwalkar, 1986).

De Wit y Klarenbeek (1984) observan que la β -lactoglobulina aumenta su termoestabilidad a pH de 3, y disminuye con el aumento de pH a 7.5. La BSA y la α -lactoalbúmina se desnaturalizan a pH 3 a temperatura ambiente.

La lactosa ha demostrado ser un agente protector frente a la desnaturalización. Bernal y Jelen (1985) determinan unas temperaturas de desnaturalización para β -lactoglobulina de 81.2 y 82.2°C sin adición y con adición de lactosa respectivamente. Estos autores sugieren que este hecho es debido a un aumento en el grado de hidratación de las proteínas que contribuye a

mantener su estabilidad. Sin embargo, la presencia de lactosa durante el calentamiento de seroproteínas a elevadas temperaturas tiene un efecto contrario. Según de Wit (1981) existe un fuerte efecto exotérmico observado mediante DSC al calentar β -lactoglobulina en presencia de lactosa por encima de los 100°C. Este efecto es debido a la reacción de Maillard, confirmando los resultados obtenidos por Turner y col. (1978) que aislaron un complejo formado durante el tratamiento UHT de soluciones de lactosa y β -lactoglobulina.

Andrews (1975) observó la formación de polímeros proteicos en el almacenamiento de leches UHT. Según de Wit y Klarenbeek (1984) la formación de estos polímeros estaría favorecida por la disminución de pH observada en el calentamiento de soluciones de proteínas en presencia de lactosa.

1.3.3. Degradación de caseínas.

Las caseínas constituyen la fracción proteica que precipita por acidificación de la leche a pH 4,6. Son proteínas fosforiladas, hidrofóbicas que se encuentran en forma de agregados polidispersos. Son termorresistentes y muy susceptibles a la acción enzimática (proteasas y exopeptidasas).

Las caseínas están constituidas por cuatro especies moleculares principales α_{S1} -, α_{S2} -, β - y κ -caseínas, que en la leche se encuentran ligadas formando micelas por interacción con el fosfato cálcico coloidal. Además del fosfato cálcico, la presencia de citratos coloidales y de iones de sodio, magnesio y potasio contribuyen a la estabilidad de las micelas.

Una pequeña proporción de β -caseínas y α_{S2} -caseínas se hidroliza por acción de la proteasa endógena de la leche, plasmina, para dar una serie de fragmentos (γ_1 , γ_2 y γ_3 -caseínas, proteosas-peptonas) presentes en leche cruda.

El tratamiento térmico de la leche a elevadas temperaturas

provoca una desintegración de las micelas de caseína con formación de proteínas no sedimentables ricas en k-caseína (Aoki y col., 1975; Creamer y Matheson, 1980; Singh y Fox, 1985; Mohammad, 1985). Los factores que influyen en este proceso son, fundamentalmente, el pH, la temperatura, la fuerza iónica y el porcentaje de β -lg desnaturalizada (Singh y Fox, 1986).

El calentamiento a temperaturas de unos 90°C produce agregación de las proteínas de suero y sedimentación de los complejos en las micelas, sin embargo el tamaño de estas apenas sufre modificaciones (Hostettler y col., 1965; Josephson y col., 1967). Tratamientos térmicos más drásticos como la esterilización UHT producen una agregación de las micelas de caseína debido tanto a la deposición de las seroproteínas desnaturalizadas sobre las micelas, como al aumento del calcio micelar responsable del aumento en el tamaño de las micelas (Josephson y col., 1967; Carroll y col., 1971).

Las caseínas participan en mayor grado que las seroproteínas en la reacción de Maillard, siendo la k-caseína la más reactiva (Turner y col., 1978). Según estos autores, esta mayor reactividad se debe a una menor accesibilidad de la lisina presente en las proteínas del suero como consecuencia de su compleja estructura terciaria, y a la posterior formación de complejos cuando se rompe dicha estructura.

1.3.3.1. Proteólisis de las caseínas.

La actividad proteolítica durante el almacenamiento de leches UHT es la responsable de la coagulación, aparición de sabores amargos y aumento del nitrógeno no proteico (NPN), y es una de las causas de gelificación durante la conservación. Estos cambios pueden ser producidos por proteasas endógenas o bacterianas, diferenciándose ambas en la acción que presentan sobre las caseínas. Así, la proteólisis acompañada de un incremento en el nitrógeno no proteico y de la formación de para-k-caseína es debida a enzimas de origen bacteriano, mientras que

la proteólisis debida a la plasmina produce un aumento de nitrógeno no caseínico y la formación de γ -caseínas (Renner, 1988).

La mayoría de las proteasas de bacterias psicótrofas son resistentes a las temperaturas elevadas, y solo son parcialmente destruidas por los tratamientos HTST (72°C, 15 s) y UHT (138-145°C, 2 s) (Law, 1979; Fairbairn y Law, 1986). Sin embargo la actividad enzimática se reduce considerablemente mediante un precalentamiento de la leche a 55°C durante 1 hora antes de la esterilización (Driessen, 1983).

1.3.4. Interacción proteína-proteína.

Las interacciones proteína-proteína se producen por reacción en medio básico entre los grupos amino libre de la lisina y la deshidroalanina, procedente de la degradación por β -eliminación de serina y cistina, formándose un nuevo aminoácido llamado lisino-alanina (LAL) (De Groot y Slump, 1969; Klostermeyer y Reimerdes, 1975; Aymard y col., 1978). La LAL se forma en leche durante el tratamiento térmico por reacción de los grupos serinofosfato de la caseína en vez de la cisteína (Fritsch y Klostermeyer, 1981). Este aminoácido no ha sido detectado en leche en polvo, pero en leches líquidas su contenido varía entre 100-1000 mg/kg de proteína, dependiendo de la severidad del tratamiento térmico.

La determinación de LAL se realiza por cromatografía de intercambio iónico (Erbersdobler y Trautwein, 1984) y cromatografía de gases (Büser y Erbersdobler, 1985). Su formación está influida por el tipo de tratamiento térmico aplicado. Se ha detectado mayor formación de LAL en leche esterilizada por el procedimiento clásico, 260 mg/kg, no detectándose en leches UHT directo (Koning y van Rooijen, 1982). Se han encontrado cantidades comprendidas entre 20 y 40 mg/kg en leches UHT indirecto cuando se emplean temperaturas de 140°C y tiempos de calentamiento del orden de 20 y 30 segundos, mientras que en el

calentamiento a 151°C durante 12 segundos el contenido es de 12 mg/kg (Fritsch y col., 1983). Dehn-Müller y col. (1991) en un barrido de leches UHT comerciales observan que el contenido en LAL varía desde trazas, en algunas muestras UHT directo, hasta 174 mg/kg.

Woodard y Short (1973) demostraron la nefrotoxicidad de LAL en ratas, sin embargo este efecto no ha sido detectado en otras especies animales (De Groot y col., 1976). A pesar de ello, Dehn-Müller y col. (1991) indican que en leches UHT el contenido en LAL no debería exceder los 75mg/kg.

1.3.5. Isomerización y degradación de Lactosa.

Los glúcidos de la leche están compuestos mayoritariamente por lactosa (5%), junto con la presencia de otros azúcares en pequeñas cantidades como glucosa y galactosa. En leches en polvo el contenido en lactosa es del 52%, mientras que en el lactosuero en polvo el porcentaje es del 70%.

La lactosa (4-O-β-D-galactopiranosil-D-glucosa) es sintetizada en las glándulas mamarias del animal por la acción conjunta de la N-galactosiltransferasa y la lactosasintetasa (α-lactoalbúmina). En la leche se encuentra en solución en una mezcla de sus isómeros α-lactosa y β-lactosa. En la figura 6 se representa la estructura de la molécula.

Ambas formas isoméricas tienen gran importancia en la leche debido a sus diferentes propiedades de solubilidad y cristalización. La baja solubilidad de este azúcar puede ocasionar problemas de cristalización en el procesado de determinados productos lácteos. Este efecto puede ser ventajoso en otros casos como el de la granulación de leches en polvo para mejorar sus propiedades de humectabilidad y dispersabilidad. La absorción de una cantidad de agua suficiente hace que cristalice una parte de la lactosa provocando la adhesión de las partículas

de polvo.

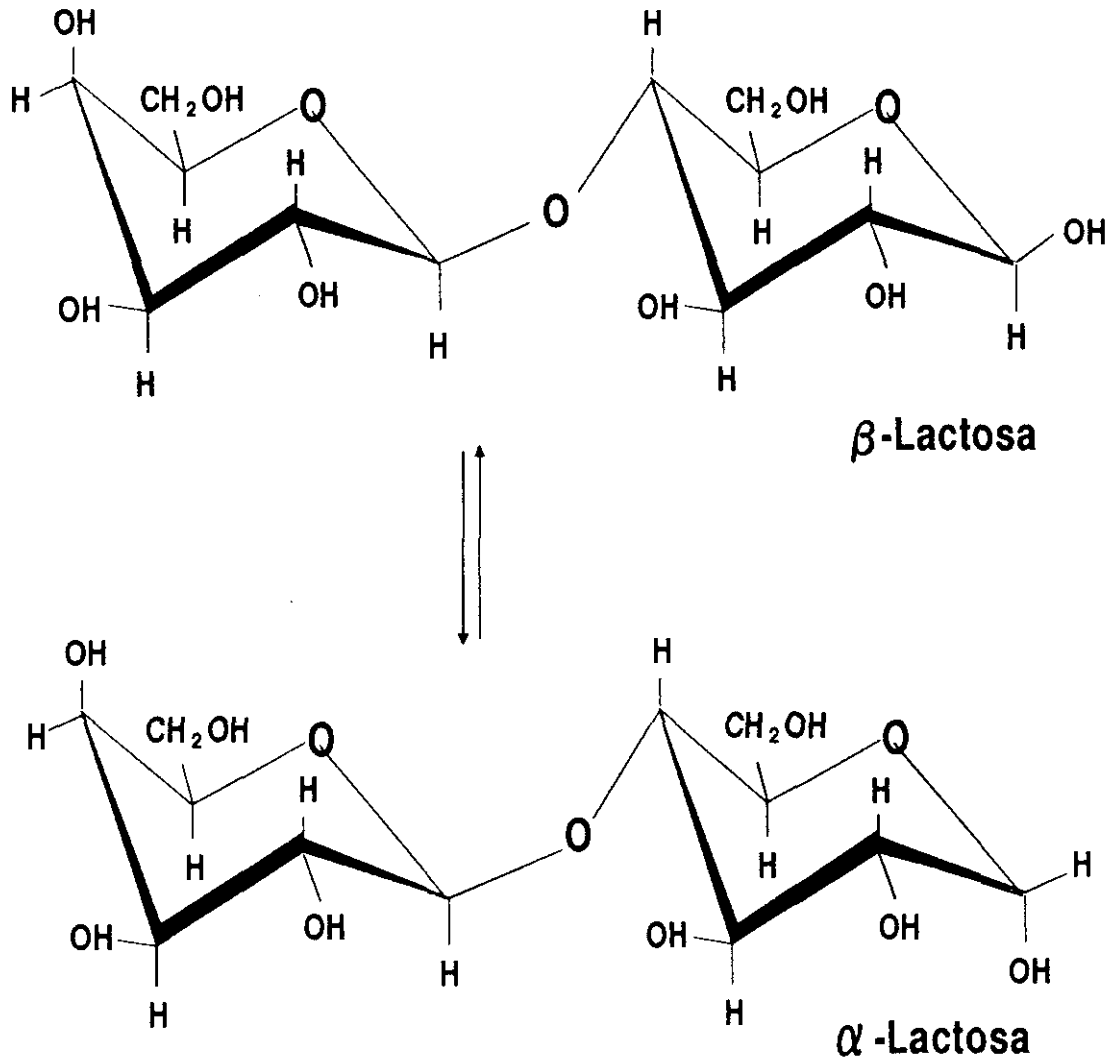


Figura 6. Formas anoméricas de la lactosa en solución.

La lactosa tiene gran importancia en las modificaciones sufridas por los componentes lácteos como consecuencia del tratamiento térmico, participando en dos de las reacciones más importantes producidas durante este proceso como son la reacción de Maillard y la formación de lactulosa. La primera de ellas se verá detalladamente en otro apartado, por lo cual nos referiremos aquí exclusivamente a la formación de lactulosa.

1.3.5.1. Lactulosa.

La lactulosa (4-O-β-galactopiranosil-D-fructosa) es un disacárido producido por isomerización de la lactosa cuando esta se calienta en soluciones alcalinas, y durante el tratamiento térmico de la leche.

Fué detectada por primera vez por Montgomery y Hudson (1930), quienes la aislaron de una solución de lactosa en agua saturada con hidróxido cálcico calentada a 35°C durante 36 horas. Estos autores postulan que se forma a partir de la lactosa mediante la transformación de Lobry de Bruyn y Alberda van Ekenstein (1897), por la cual la mitad glucosa se isomeriza a fructosa catalizada por grupos hidroxilo.

La lactulosa es un azúcar que apenas se absorbe ya que no es hidrolizado por los enzimas específicos de la mucosa intestinal. Fermenta en el colon transformándose en ácidos láctico y acético, proveyendo al intestino grueso de una fuente de carbono junto con el desarrollo de un pH bajo que favorece el crecimiento del *Bifidobacterium bifidum* (Méndez y Olano, 1979). Es por ello que este azúcar se incorpora a algunas leches destinadas a la alimentación infantil.

Por otra parte se ha demostrado que pacientes intolerantes a la lactosa pueden ser sensibles a la lactulosa presente en leches procesadas, presentando diarreas debido a su efecto laxante (Hendrickse y col., 1977).

La lactulosa se encuentra en leches en cinco formas anoméricas, que se representan en la figura 7.

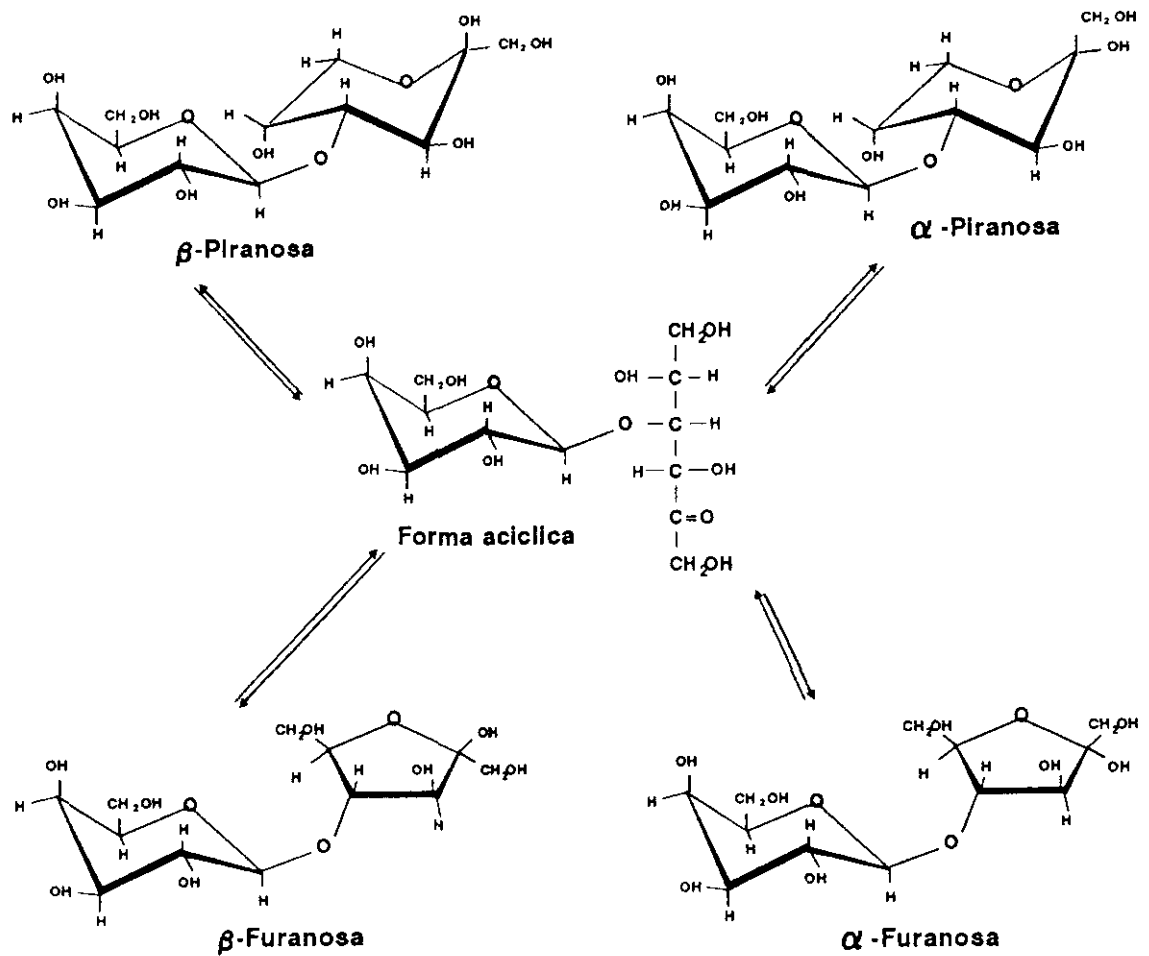
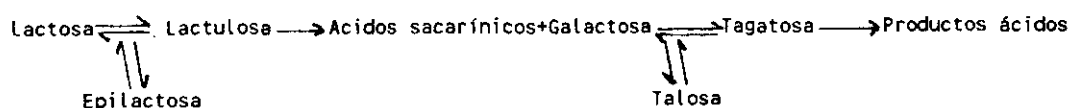


Figura 7. Isómeros posibles de la lactulosa en solución.

La lactulosa formada se degrada rápidamente a ácidos sacarínicos y galactosa, que a su vez son degradados para dar compuestos ácidos. Corbett y Kenner (1953) estudiaron, por cromatografía en papel, la descomposición de la lactosa disuelta en agua saturada con cal a 25°C, detectando lactulosa, galactosa, tagatosa, talosa y ácido sacarínico. Olano y Martínez-Castro (1981) indican dos posibles vías de degradación de lactulosa: (1) Vía enediol con adición de un protón para formar la aldosa epímera, epilactosa; (2) Por β-eliminación con formación de galactosa y ácidos sacarínicos. Debido a las mayores concentraciones de galactosa frente a las de epilactosa encontradas en leches, estos autores sugieren que la degradación tendría lugar preferentemente por la vía de la β-eliminación.



Fué Adachi (1957) el primero en detectar la lactulosa en leche evaporada. Este mismo autor, en trabajos posteriores (1958, 1959), y en el estudio de diferentes sustratos como leche esterilizada en autoclave, leche desnatada y soluciones de lactosa-caseína, observa por cromatografía en papel, una disminución en el contenido de la lactosa inicial, un aumento de la galactosa y la formación de lactulosa y un nuevo monosacárido, tagatosa. Comprobó que el contenido en lactulosa aumentaba en función del tratamiento térmico.

Adachi y Patton (1961), en una revisión sobre la presencia de lactulosa en leche calentada, indican que la formación de este azúcar tiene lugar por dos vías, isomerización de la lactosa en medio básico y vía reacción de Maillard por hidrólisis del compuesto de Amadori lactulosil-lisina. Sin embargo estudios posteriores (Richards y Chandrasekhara, 1960; Richards, 1963) han demostrado que la degradación de lactulosil-lisina no conduce a la formación de lactulosa por hidrólisis del enlace amino-

carbonilo, que por otra parte, y según observo Hodge (1955), presenta una gran estabilidad frente a la hidrólisis.

La formación de lactulosa en leche depende fundamentalmente de la severidad del tratamiento térmico (Adachi, 1958; Martínez-Castro y Olano, 1978; Geier y Klostermeyer, 1983; Andrews, 1984), y del pH, a medida que aumenta el pH aumenta su formación (Adachi y Patton, 1961; Martínez-Castro y Olano, 1980; Geier y Klostermeyer, 1983). Según Adachi y Patton (1961), Richards y Chandrasekhara (1960) y Richards (1963) los grupos aminos de las caseínas de la leche tendrían también un efecto catalizador. Sin embargo estudios posteriores (Greg y Payne, 1985; Andrews y Prasad, 1987) han demostrado, tanto en el estudio de sistemas modelo como de leches, que las proteínas no catalizan la reacción, e incluso al aumentar su concentración presentan un efecto inhibitorio. Lo que sí parece demostrado es que un aumento en la concentración de los fosfatos y citratos aumenta la formación de lactulosa (Martínez-Castro y Olano, 1980; Klostermeyer y Geier, 1983; Martínez-Castro y col., 1986), debido probablemente a un aumento en el pH.

1.4. PARAMETROS UTILIZADOS EN LA EVALUACION DEL DETERIORO DE LOS CONSTITUYENTES.

Como ya se ha indicado en el apartado anterior, son tres fundamentalmente, las reacciones responsables del deterioro sufrido por las fracciones de carbohidratos y proteínas durante el tratamiento térmico y la conservación de leches. La evaluación de estas modificaciones puede llevarse a cabo mediante la determinación de una serie de parámetros tales como los que se indican en el siguiente esquema:

- Compuestos de la reacción de Maillard:

Lisina disponible

Hidroximetil furfural (HMF)

Furosina

Otros compuestos

- Isomerización y degradación de la lactosa:

Determinación de lactulosa.

- Degradación de las seroproteínas:

Determinación de las seroproteínas no desnaturalizadas.

1.4.1. Determinación de la lisina disponible.

Una de las determinaciones más fiables para evaluar la reacción de Maillard es la medida de la lisina disponible o reactiva, que es la lisina no ligada al carbohidrato.

La mayoría de los métodos utilizados se basan en la reacción específica de determinados compuestos con el grupo ϵ -amino libre de la lisina: Fluorodinitrobenceno (FDNB, Carpenter, 1960), ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS, Kakade y Liener, 1969), fijación de colorantes (Dye-binding, Hurrell y Carpenter, 1975), guanidación (Mauron y Bujard, 1964), reducción con borohidruro (Thomas, 1972), etc.

El método FDNB consiste en la formación de un derivado de lisina, dinitrofenil-lisina (DNP-lisina), liberado por hidrólisis

ácida y medido por colorimetría.

El método propuesto por Kakade y Liener (1969) se basa también en la formación de un derivado coloreado de la lisina con el TNBS, trinitrofenil-lisina (TNP-lisina), que es medido colorimetricamente.

El método propuesto por Hurrell y Carpenter (1975) se basa en la fijación de colorantes aniónicos (Orange 12, Remazol Brilliant Blue R) a un bajo pH sobre los grupos amino de la lisina.

El método de guanidación se basa en la transformación de la lisina con su grupo ϵ -amino libre en homoarginina y su posterior medida por GLC previa formación del N-trifluoroacetil n-butyl ester. La formación de homoarginina requiere tiempos excesivamente largos (4 días), por lo que este método ha sido muy poco utilizado.

Estos métodos son poco específicos por lo cual las medidas de lisina suelen ser erróneas. Estudios posteriores han introducido modificaciones encaminadas a disminuir los tiempos de análisis, así como a obtener una mayor precisión en la medida de los derivados. Tomarelli y col. (1985) miden la lisina reactiva en fórmulas infantiles utilizando el método TNBS, determinando la ϵ -TNP-lisina por HPLC.

Se ha intentado también la medida de la reacción de Maillard mediante la determinación del compuesto de Amadori formado en las primeras etapas. Henle y col. (1991) determinan el porcentaje de lisina ligada o no disponible en muestras de leche por medida directa de lactulosil-lisina realizando una hidrólisis enzimática previa.

Los resultados obtenidos por los diferentes autores varían en función de los distintos métodos aplicados. En la tabla II se incluyen los porcentajes de pérdida de lisina disponible en

leches líquidas según el tratamiento térmico aplicado.

Tabla II. Porcentaje de pérdida de la lisina disponible en leche sometida a distintos tratamientos térmicos (Burton, 1984).

Referencia	Pérdida de lisina disponible (%)			
	Pasterización	UHT directo	UHT indirecto	Esterilización
Vuyst y col. (1972)	1,9	-	-	3,3
Renner (1974)	1-2		3-4	6-10
Blanc (1977)	0,7-1,1	1,1	1,7	6,2
Mottar y Naudts (1979)	2	4,3	6,5	9,9
Blanc (1980)	0,61-0,74	0,49	0,86	-
Renner y Dorguth (1980)	-	3	4	-
Finot y col. (1981)	-	0	-	11-13
Möller (1981)	-		2,2-2,3	-

Según Van den Bruel y col. (1971) las distintas condiciones de preparación de leches en polvo no suponen una pérdida de lisina, como ya indicaran Pol y Groot (1960). Para Mauron y col. (1955) y Okamoto y Hayashi (1985) esta pérdida es del 3,6% y del 2% respectivamente.

La conservación de leches en polvo tiene gran importancia ya que pequeños incrementos de temperatura y humedad originan una fuerte reactivación de la reacción de Maillard. Para Richards (1963), el almacenamiento de leches en polvo a 45°C y con un 75% de humedad relativa presenta una gran pérdida de lisina disponible que es máxima entre los 20 y 40 días, estabilizándose hasta los 120 días. Kiesecker y Clarke (1984) determinan la pérdida de lisina disponible en el almacenamiento de leches en polvo elaboradas a baja, media y alta temperatura, y conservadas a 10, 20, 30 y 40°C. A 10°C las pérdidas de lisina son respectivamente de 2; 6 y 12,1%. A 40°C estos valores aumentan

hasta 23,5; 27,5 y 35,3%. Al almacenar leches con un contenido de humedad del 5% a 40°C los porcentajes aumentan hasta 45, 42 y 53%.

Okamoto y Hayashi (1985) observan que el aumento en la pérdida de lisina solo tiene lugar en el almacenamiento a 40°C y con una actividad de agua (a_w) mayor de 0,40, siendo del 5% para una a_w de 0,57 y del 29% para una a_w de 0,80.

1.4.2. Determinación de HMF.

La determinación del hidroximetil furfural (HMF) ha sido ampliamente utilizada como medida de la reacción de Maillard, al formarse dicho compuesto en la degradación de los compuestos de Amadori. Keeney y Bassette (1959) propusieron un método colorimétrico para la determinación de HMF en leches esterilizadas. Este método permite la cuantificación tanto del HMF libre como la de HMF libre más HMF potencial, denominado HMF total, y sigue siendo en la actualidad uno de los más utilizados. Presenta el inconveniente de que el reactivo utilizado no es específico para el HMF, pudiendo reaccionar con otros compuestos carbonílicos procedentes de la reacción de Maillard. Van Boekel y Rehman (1987), y posteriormente Morales y col. (1992), proponen un método rápido y específico para la determinación de HMF en leches por HPLC.

En la tabla III quedan reflejados los valores de HMF recogidos de la bibliografía para los distintos tratamientos térmicos.

Estos resultados son difíciles de interpretar si tenemos en cuenta los resultados obtenidos por Klostermeyer y col. (1978), Konietzko (1981) y Dehn-Müller y col. (1991) referentes al contenido de HMF en leches no calentadas que es respectivamente de 11,1 $\mu\text{mol/l}$, 2,7-5,3 $\mu\text{mol/l}$ y 6,6. Además, los valores correspondientes a leches esterilizadas en recipientes herméticos

de 14 $\mu\text{mol/l}$ (Schmidt y Renner, 1978), 12-24 $\mu\text{mol/l}$ (Mottar y Naudts, 1979) y 12 $\mu\text{mol/l}$ (Konietzko, 1981) se superponen con los correspondientes a leches UHT indirecto.

Tabla III. Concentración de hidroximetil-furfural (HMF) en leche cruda y procesada (O'Brien y Morrissey, 1989).

Referencia	HMF ($\mu\text{mol/l}$)				
	Cruda	Pasteurizada	UHT directo	UHT indirecto	Esterilización
Zadow (1970)	-	-	-	10 ¹ , 20 ²	-
Klostermeyer y col. (1978)	11,1	-	-	-	-
Schmidt y Renner (1978)	-	-	-	-	13,7
Mottar y Naudts (1979)	-	-	3,1-7,4	5,2-16,8	11,7-24,1
Mottar y col. (1979)	-	-	4-16	-	-
Toter (1979)	-	-	tr-9,2	-	-
Renner y Dorguth (1980)	-	-	4,3-10,4	6-21,4	-
Konietzko (1981)	2,7-5,3	-	-	-	12
Dehn-Müller y col. (1991)	6,6	-	-	tr-22	-

¹ Leche entera. ² Leche desnatada.

Burton (1984) en una revisión sobre el contenido de HMF en leches líquidas, concluye a partir de los resultados obtenidos por los diferentes autores que la determinación de HMF no puede ser considerada como una medida adecuada para establecer la severidad del tratamiento térmico aplicado, ya que los contenidos iniciales de HMF en leche cruda presentan una gran variabilidad.

Durante el almacenamiento de leches UHT Fink y Kessler (1986) no observan variaciones significativas en el contenido en HMF durante un período de seis meses a 4 y 20°C. Sin embargo la conservación a 35°C produce un aumento en HMF que es ligeramente superior en leches UHT indirecto. Resultados similares son obtenidos por Malatje (1986) en el almacenamiento de leches UHT

a 30 y 40°C durante seis meses.

El efecto del tipo de precalentamiento en la fabricación de leches en polvo sobre los contenidos de HMF ha sido estudiado por Baldwin y Ackland (1991). Estos autores observan que aumentando la intensidad del tratamiento térmico se produce un ligero aumento en el contenido de HMF, y la conservación de la leche a 30°C durante 12 meses supone un incremento del HMF que alcanza valores máximos a los nueve meses.

1.4.3. Furosina

La furosina es un derivado de lisina obtenida en la hidrólisis ácida de los compuestos de Amadori, fructosil-lisina y lactulosil-lisina (figura 8).

Dichos compuestos, y en especial lactulosil-lisina, se forman mayoritariamente en leche en las primeras etapas de la reacción de Maillard como consecuencia de las condiciones moderadas de calentamiento aplicadas durante el procesamiento de leches.

Por todo ello la furosina ha sido considerada hasta el momento como el más valioso indicador de la pérdida de valor nutritivo de la proteína ligada a los azúcares reductores como consecuencia de la reacción de Maillard en alimentos, ya que su medida es un índice de la cantidad de lisina ligada como lactulosil-lisina y por tanto no disponible biológicamente.

La furosina fué detectada por primera vez por Erbersdobler y Zucker (1966) en hidrolizados de leches en polvo sobreprocesadas, como un pico desconocido que eluía detrás de arginina en los cromatogramas obtenidos en el análisis de aminoácidos.

(Galactosa)-Glucosa + Lisina-Proteina

1. Compuesto de adición

2. Glicosilamina N-sustituida

3a. Base de Schiff

3b. Forma enol

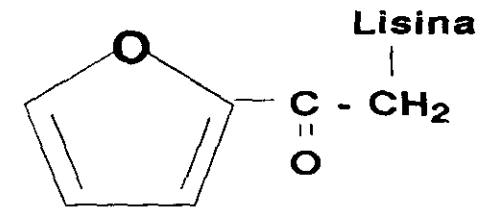
4. (Galactosa)-Fructosil-lisina-Proteina

Pardeamiento

Hidrolisis
acida

LISINA

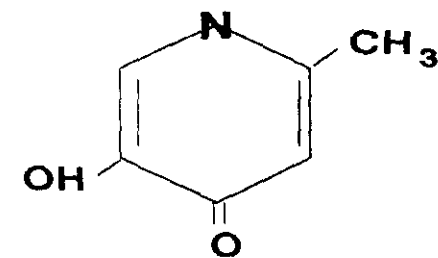
+



FUROSINA

+

Nor-leucina



PIRIDOSINA

Figura 8. Esquema de las primeras etapas de la reacción de Maillard y de la formación de Furosina y Piridosina

Brüggeman y Erbersdobler (1968) detectaron este mismo compuesto en la hidrólisis de los productos de reacción resultantes del calentamiento de glucosa con lisina, y en la hidrólisis de fructosil-lisina [ϵ -N-(1-desoxi-D-fructosil)-L-Lisina].

Finot y col. (1968) corroboran los resultados de Erbersdobler y Zucker (1966) en muestras de leche, y obtienen dicho compuesto, con un rendimiento constante, de la hidrólisis ácida de fructosil y lactulosil-lisina sintetizadas. Así mismo realizan su aislamiento y purificación por cromatografía en columna de intercambio iónico, y proceden a la elucidación de su estructura por espectrometría infrarroja, de masas, resonancia magnética nuclear y espectroscopia UV-Visible.

El compuesto es identificado como furosina [ϵ -N-(2-furoilmetil)-L-lisina] (Finot y col., 1968 y Heyns, 1968).

Nakai y col. (1975) proceden al aislamiento y purificación de furosina a partir del calentamiento de caseína con glucosa. Los resultados obtenidos concuerdan con los de Finot y col. (1968).

Finot y col. (1969) encuentran un segundo pico procedente de la hidrólisis de fructosil-lisina, identificándolo como piridosina [ϵ -1,4-dihidro-6-metil-3-hidroxi-4-oxo-1-piridil)-L-norleucina]. Su cuantificación, sin embargo, resulta complicada ya que eluye en una zona de gran solapamiento de compuestos.

Las condiciones de hidrólisis utilizadas son determinantes en los rendimientos obtenidos en la formación de furosina, y los datos reflejados en la bibliografía son a veces contradictorios.

Finot y col. (1981) llevan a cabo la hidrólisis calentando la muestra a reflujo con ácido clorhídrico 6 y 7,75 M a 110°C durante 24 horas. En el caso de los compuestos de Amadori lactulosil-lisina y fructosil-lisina sintetizados, los

rendimientos varían con la molaridad del ácido. Las muestras de leche, sin embargo, presentan un mayor rendimiento en la formación de furosina que los compuestos de Amadori libres para una misma normalidad de HCl. Los resultados obtenidos son los indicados en la tabla IV.

Tabla IV. Rendimientos de lisina y furosina en la hidrólisis ácida de los compuestos de Amadori según Finot y col. (1981).

	Hidrólisis ácida	
	HCl 6N	HCl 7.75N
Desoxi-cetosil-lisina libre		
Lisina regenerada (%)	49.8	43.8
Furosina (%)	20.3	29.3
Desoxi-lactulosil-lisina ligada a proteínas		
Lisina regenerada (%)	40.0	
Furosina (%)	32.0	

Erbersdobler y Dehn-Müller (1989) obtienen un rendimiento superior (40%) al utilizar una mayor normalidad de HCl (7,78).

Molnar-Perl y col. (1986) estudian la relación furosina/piridosina en la hidrólisis de fructosil-lisina sintetizada y de proteínas vegetales, variando los tiempos de hidrólisis y las concentraciones de HCl utilizadas. Observan que los contenidos máximos en piridosina se obtienen con HCl 6N, aunque los de furosina aumentan con la normalidad del ácido, y los tiempos óptimos para la reacción son de 5 horas para el compuesto de Amadori y 20-22 horas en el caso de las proteínas.

Erbersdobler (1986) en una revisión de los trabajos existentes sobre furosina, recoge los resultados obtenidos por varios autores sobre los porcentajes de formación de furosina y piridosina en la hidrólisis de distintos sustratos. En resumen los factores de conversión para furosina varían entre el 30-36%.

Recientemente Cefalu y col. (1991) realizan la hidrólisis con ácido clorhídrico 6N en fase de vapor de proteínas de la membrana hepática, obteniendo los mayores porcentajes de formación de furosina a 1,5 y 6 horas, con lo cual se reducen drásticamente los tiempos de análisis.

Es en la formación de piridosina así como en la regeneración de lisina donde existe una mayor discrepancia según los distintos autores. Para la mayoría, la relación piridosina/furosina es siempre inferior a 1, oscilando entre 0,3-0,5. Sin embargo, para Steinig y Montag (1982) esta relación en la hidrólisis de fructosil-lisina es de 1,18, y para Henle y col. (1991) varía según el tipo de muestra, siendo de 2 en leches y 5 en soluciones de caseína calentadas con lactosa.

La buena reproducibilidad en la formación de furosina ha permitido su utilización en el cálculo de los valores de lisina disponible o reactiva y lisina ligada.

1.4.3.1. Métodos de análisis de furosina.

La técnica más utilizada en la determinación de furosina, desde su identificación en hidrolizados ácidos de leche, es la cromatografía de intercambio iónico (IEC) con el empleo de autoanalizadores de aminoácidos (Finot y col., 1977; Erbersdobler, 1979; Erbersdobler y col., 1979; Finot y col., 1981; Hurrell y col., 1983; Molnár-Perl y col., 1986; Erbersdobler y col., 1987). La cuantificación se realiza por colorimetría de los derivados obtenidos en la reacción con ninhidrina, utilizándose como sustancias de referencia los aminoácidos arginina y lisina generalmente.

Esta técnica no ha permitido hasta muy recientemente (Erbersdobler y col., 1984, 1987) la detección de furosina en muestras de leche UHT. El desarrollo de nuevos equipos más sofisticados y el empleo de un detector de fluorescencia con una mayor sensibilidad, ha hecho posible la determinación de furosina en este tipo de muestras. Erbersdobler y col. (1987) establecen unos niveles de furosina en el rango de 8-14 mg/l en el tratamiento UHT directo, 15-53 mg/l en el UHT indirecto y 60-80 mg/l para la esterilización clásica. Posteriormente Nangpal y Reuter (1990) y Dehn-Müller y col. (1991) encuentran unos contenidos de furosina semejantes para los tres tipos de leches.

Los mayores inconvenientes de esta técnica analítica son los largos tiempos de análisis así como la necesidad de derivatización de las muestras para su detección.

Sleicher y Wieland (1981) son los primeros en utilizar la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para la determinación de furosina en muestras biológicas de pacientes diabéticos. Para ello utilizan una columna C_{18} de 5μ de diámetro de partícula. El eluyente utilizado es ácido fosfórico 5,6 mM a un flujo de 1ml/min, y detector UV a 280nm. La calibración se realiza con el empleo de fructosil-lisina como patrón.

Así mismo, Chiang (1983) determina el contenido en furosina en alimentos desecados por medio de la HPLC. La columna utilizada es una C_8 de 10μ de tamaño de partícula. El eluyente es tampón acetato 0,5% llevado hasta pH=4,6 con ácido acético glacial a un flujo de 2 ml/min. La detección se realiza también a 280nm.

Posteriormente Drexel y col. (1987) modificando el método de Schleicher y Wieland (1981), logran reducir los tiempos de análisis aumentando la resolución de los distintos componentes, consiguiendo simultáneamente una mayor duración de las fases estacionarias.

Son sin embargo Resmini y col. (1990) quienes utilizan por

primera vez la cromatografía líquida de alta eficacia en el análisis de furosina en leche líquida. La columna utilizada es una C₈, termostaticada a 35°C. La elución de la muestra se realiza con el empleo de un gradiente binario siendo el eluyente A una solución al 0,5% de ácido acético y el eluyente B una mezcla de ClK al 0,3% y ácido acético 0,5% en agua. La detección es a 280nm. Para la calibración utiliza 2-acetil furano como patrón externo. Con este método consiguen detectar por primera vez furosina en leche pasteurizada (1-1,6 mg/l) y en leche cruda (1mg/l). La cuantificación de furosina en leches sometidas a distintos tratamientos térmicos muestra unos valores de 19-73 mg/l en leches UHT, 99-138 mg/l en leches esterilizadas y 106-960 mg/l en leches en polvo.

Büser y Erbersdobler (1985) utilizan por primera vez la cromatografía de gases (GLC) para la determinación de furosina, piridosina y lisinoalanina. Las muestras son derivatizadas formando los heptafluorobutiril isobutil esteres, y la detección se lleva a cabo con el empleo de un detector específico de P-N (NPD). Los resultados obtenidos se correlacionan bien con los determinados por cromatografía de intercambio iónico (IEC) (Erbersdobler, 1984).

Cefalu y col. (1991) utilizan la cromatografía de intercambio iónico de alta eficacia (Dionex) para la determinación de furosina en muestras biológicas. Usando una columna CarboPack de 5 μ de tamaño de partícula, con el empleo de NaOH 150mM como eluyente y detección amperométrica, la furosina eluye en 5 minutos.

1.4.4. Otros compuestos.

La formación de compuestos coloreados en la reacción de Maillard ha sido utilizada para determinar la extensión en que esta se produce en alimentos por medida del color desarrollado. Este método tiene poca aplicación en la actualidad debido a varios hechos. Por una parte, los tratamientos térmicos a que son

sometidos los productos lácteos son moderados con lo cual generalmente no se produce un pardeamiento visible. En segundo lugar, la esterilización UHT produce un blanqueamiento de la leche como consecuencia del aumento en el tamaño de las micelas de caseína (Singh y Patil, 1990). Por todo ello, esta determinación solo ha sido realizada en estudios de conservación y en condiciones muy drásticas (Andrews, 1963; Kiesecker y Clark, 1984).

Otro de los métodos desarrollados para la determinación de la reacción de Maillard es la evaluación colorimétrica de la proteína ligada a azúcares reductores (PRS), propuesto por Choi (1949). Sin embargo no ha sido muy utilizado, ya que la presencia de otras sustancias reductoras como los grupos -SH de las proteínas desnaturalizadas pueden interferir en la reacción.

En el transcurso de la puesta a punto de un método de análisis de furosina por cromatografía de gases, Büser y Erbersdobler (1985) detectan un nuevo compuesto procedente de la hidrólisis, que es identificado posteriormente como N- ϵ -carboximetil lisina mediante el acoplamiento CG-EM (Büser y Erbersdobler, 1986 y Büser y col., 1987). Sin embargo este compuesto ya fué identificado por Ahmed y col. (1985, 1986), Baynes y col. (1986) y Liardon y col. (1987) en muestras biológicas en el análisis de proteínas glicosiladas.

Al igual que la furosina, la carboximetil lisina podría servir de indicador de las primeras etapas de la reacción de Maillard en leche, ya que su concentración depende de la cantidad de lactulosil-lisina presente, y aumenta con la severidad del tratamiento térmico. Sin embargo, la relación entre furosina y carboximetil lisina no es siempre constante, según demuestran los trabajos de Büser y Erbersdobler (1986) y Büser y col. (1987). Esto puede ser debido a la influencia de otros factores en su formación como la existencia de procesos oxidativos, la alcalinidad de las muestras, etc.

Los tratamientos térmicos muy severos facilitan el progreso de la reacción de Maillard, y en alimentos muy calentados el grado de pardeamiento puede ser estimado por medida de determinados compuestos característicos de estas etapas avanzadas. La determinación de volátiles resultantes de la degradación de Strecker (Eichner y Ciner-Doruk, 1981) así como la de CO₂ (Chang y Min, 1986) ha sido utilizada.

Por último, la detección de un nuevo compuesto identificado como ϵ -pirrol-lisina (Nakayama y col., 1980) ha sido objeto de varios trabajos encaminados a establecer métodos para la determinación de este compuesto como indicador de las etapas avanzadas de la reacción de Maillard. Chiang (1988) establece un método por HPLC para la determinación de pirrol-lisina en varios alimentos. La columna utilizada es una C₈ de 5 μ de tamaño de partícula. El eluyente es un tampón acetato al 0,5% y pH 4,3 a un flujo de 1,6 ml/min, utilizando un detector electroquímico. Los resultados obtenidos muestran que mientras el contenido en furosina disminuye con el calentamiento prolongado, ϵ -pirrol-lisina aumenta progresivamente. Schübler y Ledl (1989) modifican el método anterior. La detección la realizan en el UV a 295 nm, y como eluyente utilizan un buffer acetato 1,5M con la adición de un 2,6% de cianometano y un 1,3% de tetrahidrofurano.

1.4.5. Determinación de lactulosa.

De los diferentes métodos existentes para estimar el tratamiento térmico sufrido por una leche, la determinación de lactulosa es el más utilizado. Martínez-Castro y Olano (1978) pusieron de manifiesto que las leches esterilizadas tienen un mayor contenido en lactulosa que las leches UHT, y estas a su vez que las leches pasteurizadas. Por ello, estos mismos autores proponen en 1980 la determinación de lactulosa como índice del tratamiento térmico aplicado.

Existen una gran variedad de técnicas analíticas para la

determinación de lactulosa en leches. El mayor problema en la cuantificación es la elevada concentración de lactosa comparada con la de lactulosa. Algunos de estos métodos incluyen etapas de separación o el uso de reacciones específicas de aldosas para eliminar la lactosa y cuantificar la lactulosa por métodos específicos de cetosas (Andrews, 1986). El resto incluyen métodos espectrofotométricos, enzimáticos y cromatográficos, siendo estos últimos a los que nos referiremos más extensamente debido a su mayor sensibilidad y precisión.

1.4.5.1. Métodos espectrofotométricos.

Están basados en la medida de la densidad óptica de los productos de reacción de la lactulosa con reactivos específicos de cetosas. Se pueden citar entre otros los trabajos de Adachi (1959, 1965) en los que mide la coloración producida al añadir a la leche desproteïnizada clorhidrato de cisteïna, ácido sulfúrico y carbazol, o la producida por la reacción de oxidación de las aldosas a ácidos aldónicos en presencia de hipoyodato. Zagrodzki y col. (1968) hacen uso de la reacción de la antrona en medio ácido. Todos estos métodos presentan el inconveniente de necesitar niveles relativamente altos de lactulosa. Adhikari y col. (1991) proponen un nuevo método basado en la propiedad de la lactulosa de producir una tonalidad roja en el calentamiento con ácido sulfúrico 6,4 N. Esta reacción es mucho más específica para las cetosas que para las aldosas, por lo que los elevados contenidos de lactosa en leche representan una bajísima interferencia. Su utilización permite la detección como mínimo de 10 mg/100 ml de lactulosa.

1.4.5.2. Métodos enzimáticos.

Geier y Klostermeyer (1980) proponen un método enzimático basado en la utilización de seis enzimas, seguido de una medida colorimétrica a 340 nm. El procedimiento es laborioso y se utiliza en Alemania como método de referencia. Este método fué

modificado por Andrews (1984) reduciendo la cantidad de enzimas necesarios para el análisis. Kuhlmann y col. (1991) establecen un micrométodo automatizado basado en el propuesto por Geier y Klostermeyer (1980), en el cual se reducen los tiempos de análisis y el gasto de enzimas.

1.4.5.3. Métodos cromatográficos.

Dentro de ellos se incluyen la cromatografía en papel y en capa fina, la cromatografía líquida de alta eficacia y la cromatografía de gases.

Los primeros estudios sobre determinación de lactulosa por métodos cromatográficos, se llevaron a cabo mediante cromatografía en papel. Posteriormente, se empleó la cromatografía en capa fina, más rápida que la anterior. Martínez-Castro y col. (1987) hacen una extensa revisión en cuanto a soportes, eluyentes y reveladores empleados en la determinación de lactulosa. Esta técnica solo se utiliza en el análisis cualitativo.

Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC).

Una de las primeras técnicas utilizadas en el análisis de lactulosa fué la cromatografía de intercambio iónico en condiciones isocráticas (Verhaar y col., 1979) o en gradiente (Ersser y Mitchel, 1984), con el empleo de diferentes tipos de columna: Dowex (Carubelli, 1966), Aminex (Verhaar y col., 1979) y columnas de polietilenamina preparadas en el laboratorio (Bilik y col., 1979).

Dentro de esta técnica, la fase inversa ha sido ampliamente utilizada (Brons y Olieman, 1983; Nikolov y col., 1985). También se han utilizado columnas de sílice con algún modificador en el eluyente (Greig y Payne, 1985). En todos los casos el eluyente empleado fué una mezcla de acetonitrilo-agua con un porcentaje óptimo de acetonitrilo de 70-80% dependiendo del tipo de columna.

El empleo de otro tipo de columnas como las de sílice-amino ligadas presenta el inconveniente de que pueden formarse bases de Schiff, aunque este efecto puede paliarse utilizando columnas de sílice diol modificadas (Brons y Olieman, 1983).

El sistema de detección en todos los casos es el índice de refracción, ya que la lactulosa no posee ningún grupo cromóforo ni fluoróforo, y por tanto no puede ser detectada ni por absorción en la región UV-Visible, ni por fluorescencia. El uso de este tipo de detector implica que la elución debe realizarse de forma isocrática (Parrish y col., 1980; Brons y Olieman, 1983).

Existen diferentes métodos de derivatización post-columna basados en la reacción con la antrona (Carubelli, 1966), con el orcinol (Verhaar y col., 1979) o con 2-2'bicinconinato (Ersser y Mitchell, 1984), hecho que permite la utilización de gradiente en el análisis.

Cromatografía de gases (CGL).

Con esta técnica se logra una adecuada separación de la lactulosa del resto de los carbohidratos, aunque es necesaria una derivatización previa, y presenta la ventaja frente a la HPLC de poseer una mayor sensibilidad con una reproducibilidad semejante.

La lactulosa eluye en un rango de temperaturas comprendido entre 200-260°C, dependiendo del tipo de fase utilizada, soporte y gas portador. Para la determinación de lactulosa se han utilizado distintos tipos de columnas como columnas clásicas de acero inoxidable, capilares de vidrio y sílice fundida, y columnas microrrellenas.

Las fases con las que se consigue una separación óptima de lactosa y lactulosa son la OV-17, OV-25 y SE-54 (Haverkamp y col., 1971; Nikolov y Reilly, 1983). El uso de columnas capilares

largas permite la separación de ambos azúcares utilizando como fase metil-siliconas como la SE-30, OV-1 y OV-101. Se ha observado que la lactulosa se cromatografía como un pico agudo y otro ancho que aparece como un hombro (Martínez-Castro y Olano, 1980; Nikolov y Reilly, 1983). Esto podría atribuirse a una incompleta derivatización, lo que daría lugar a una absorción parcial sobre la columna aumentando así la anchura del pico. Olano y col. (1986) proponen un método basado en la utilización de columnas microrrellenas, con el cual se obtiene una resolución semejante a la obtenida con el empleo de columnas capilares pero con una reducción considerable en los tiempos de análisis.

La determinación cuantitativa de lactulosa por cromatografía de gases en diferentes tipos de muestras ha sido objeto de varios trabajos (Müller y col., 1969; Demaimay y Baron, 1978; Laker, 1979). La cuantificación de lactulosa en productos lácteos requiere una previa extracción de los azúcares del resto de los componentes, que se realiza, siguiendo el procedimiento de Reineccius y col. (1970) pero omitiendo el uso de columnas de intercambio iónico (Martínez-Castro y Olano, 1978, 1980), o precipitando los otros componentes lácteos con metanol (Olano y Martínez-Castro, 1981). A continuación se liofiliza o se evapora la muestra a baja temperatura para proceder a la derivatización de los azúcares transformándolos en los trimetilsilil-eteres que se analizan por GC. Esta técnica permite cuantificar lactulosa en leches pasterizadas cuyos contenidos en lactulosa son muy bajos.

Los niveles de lactulosa en los distintos tipos de leche coinciden según todos los autores, y son los que se indican en la tabla V.

La presencia de lactulosa en leches pasterizadas no ha podido ser detectada cuando la determinación se lleva a cabo utilizando métodos enzimáticos. Sin embargo el empleo de la cromatografía de gases permite la cuantificación de lactulosa en bajas concentraciones (Martínez-Castro y Olano, 1978).

Tabla V. Concentraciones de lactulosa encontradas en leches procesadas.

Referencias	Lactulosa (mg/100 ml)			
	Pasteurización	UHT directo	UHT indirecto	Esterilización
Martínez-Castro y Olano (1978)	4-15		10-30	85-200
Geier y Klostermeyer (1983)	-		10-51	87-137
Andrews (1984)	-	5-10	15-72	69-120
Nangpal y Reuter (1990)	-	7-11	13-65	75-134

Junto con la determinación de lactulosa, Olano y col. (1988) y Olano y Calvo (1989) proponen que los niveles de epilactosa y galactosa podrían ser utilizados también como indicadores del tratamiento térmico. Estos niveles son superiores a 5 y 16 mg/100 ml en leches esterilizadas, y presentan un rango de 1-3 mg/100 ml y 9-12 mg/100 ml en leches UHT, para la epilactosa y la galactosa respectivamente (Martínez-Castro y Olano, 1980; Olano y col., 1988; Olano y Calvo, 1989).

Por otra parte, el almacenamiento de leches líquidas a temperatura ambiente no origina un aumento significativo en los niveles de lactulosa (Andrews, 1984, 1985). Nangpal y Reuter (1990) hacen un estudio de la conservación de leches UHT a 20, 30 y 50°C durante 6 semanas. A 20 y 30°C los incrementos de 2 y 4 mg/100 ml respectivamente son prácticamente despreciables, sin embargo a 50°C hay un aumento considerable de 80 mg/100 ml.

En leches en polvo, los niveles de lactulosa han sido muy poco estudiados, presentando unos bajos contenidos (Richards, 1963; Martínez-Castro y Olano, 1978).

Richards (1963) estudia el efecto de la conservación de leche en polvo a 45°C con un 75% de humedad relativa. El contenido en lactulosa aumenta ligeramente, mientras que la mayor

variación corresponde a la galactosa la cual aumenta considerablemente hasta alcanzar un máximo y luego disminuye.

1.4.6. Determinación de seroproteínas no desnaturalizadas.

El grado de desnaturalización de las seroproteínas depende del tratamiento térmico aplicado a una leche, y puede ser utilizado como índice del calentamiento. Por ello se han desarrollado un gran número de métodos encaminados a evaluar el grado de desnaturalización producido en leches procesadas. La utilización más frecuente de esta determinación ha sido la clasificación de leches en polvo, en función de los distintos tipos de precalentamiento aplicados previamente al proceso de atomización.

El método más utilizado en la clasificación de las leches en polvo es el método ADMI propuesto por el American Dry Milk Institute. Se basa en la determinación turbidimétrica del nitrógeno de las seroproteínas no desnaturalizadas (UMSPN), obteniéndose la siguiente clasificación: bajo calentamiento (mayor o igual a 6 mg UMSPN/g), calentamiento medio (5,99-1,51 mg UMSPN/g) y alto calentamiento (menor o igual a 1,5 mg UMSPN/g). Sin embargo este método presenta algunos inconvenientes en la determinación de la fracción nitrogenada, por lo que se han desarrollado una serie de variantes encaminadas a mejorar la exactitud de dicha determinación.

La determinación del "heat number" (IDF Standard, 1982), basado en el procedimiento de Rowland (1938a y b), se expresa como el porcentaje del nitrógeno caseínico insoluble a pH ácido (4,8) frente al nitrógeno total, y se basa en la medida del porcentaje de seroproteína desnaturalizada unida a caseína. Según esta clasificación para un número menor o igual a 80 se habla de una leche en polvo de bajo calentamiento, y si es mayor o igual a 88 de una leche de alto calentamiento.

Existen también métodos basados en la medida indirecta de

las seroproteínas desnaturalizadas, mediante el cálculo del contenido en cisteína y cistina, aminoácidos presentes mayoritariamente en las seroproteínas, del complejo aislado de caseínas y proteínas desnaturalizadas (de Koning y col., 1976; Mrowetz y Klostermeyer, 1977).

Son, sin embargo, los métodos cromatográficos los que presentan una mayor exactitud. González-LLano y col. (1990) hacen una completa revisión de los métodos cromatográficos utilizados. Las primeras separaciones de seroproteínas por HPLC se llevaron a cabo por cromatografía de exclusión (Diosady y col., 1980; Dimenna y Segall, 1981) pero con una incompleta resolución de las seroproteínas mayoritarias α -lac, β -lg y BSA. El desarrollo de nuevas columnas más eficaces ha hecho posible la resolución de todas las proteínas del suero (Gupta, 1983; Murphy y Mulvihill, 1988). Otras técnicas utilizadas han sido la cromatografía de intercambio iónico (Humphrey y Newsome, 1984; Andrews y col., 1985; Bican, 1985; Manji y Kakuda, 1987; Hill y col., 1987), y la cromatografía en fase reversa (Pearce, 1983; Visser y col., 1986, Kim y col., 1987, Parris y Baginski, 1991).

Muchos de los métodos citados se han utilizado en la clasificación de leches procesadas (Manji y Kakuda, 1987), y fundamentalmente en la clasificación de leches en polvo (Kneifel y Ulberth, 1985; Van den Bedem y Leenheer, 1988; Parris y Baginski, 1991).

Resmini y col. (1989) proponen un método por HPLC de fase reversa para la cuantificación de seroproteínas no desnaturalizadas, con el empleo de una columna polimérica y trifluoroacético en el eluyente. En 1990, estos autores establecen una diferenciación entre leches UHT directo, indirecto y esterilizada en función del contenido en β -lactoglobulina. En la actualidad se está ensayando dicho método como método oficial para diferenciar leches UHT de esterilizadas. Se propone como límite inferior para las leches UHT un contenido de 20 mg/l de β -lactoglobulina no desnaturalizada.

1.5. OBJETIVOS.

La Federación Internacional de Lechería, el grupo de expertos de leche y productos lácteos de la C.E.E., así como los Organismos responsables del control de calidad de alimentos en los países industrializados, pretenden establecer los parámetros que permitan determinar de modo inequívoco la calidad de las leches comerciales.

La mayor parte de los estudios realizados se basan en la determinación de algún compuesto originado o transformado durante el proceso térmico, que pueda ser utilizado como indicador de la intensidad del tratamiento aplicado. No obstante, la diversidad de factores que intervienen en el resultado del proceso térmico (composición y calidad microbiana de la leche cruda, tipo de sistema de tratamiento, pretratamiento de la materia prima, etc.) hace que un solo indicador no proporcione información suficiente para determinar la calidad del producto final.

El objetivo general de la presente memoria ha consistido en el establecimiento de los parámetros más adecuados para la determinación de la calidad de la leche UHT y de la leche en polvo a lo largo del periodo de vida comercial.

Para lograr dicho objetivo se ha elegido el estudio de tres parámetros: furosin, lactulosa y β -lactoglobulina no desnaturalizada, cuyos niveles en leche procesada dependen de diferentes aspectos relacionados con la calidad.

1.6. PLAN DE TRABAJO.

El trabajo desarrollado en la presente memoria se llevó a cabo en cuatro etapas consecutivas.

En la primera etapa se pusieron a punto los métodos analíticos necesarios para la determinación de los parámetros objeto de estudio.

En la segunda etapa se determinaron los niveles de dichos parámetros (furosina, lactulosa y β -lactoglobulina) en las leches comerciales españolas.

En la tercera etapa se estudió el efecto de las condiciones de conservación de la leche en la formación de furosina y lactulosa, así como en la desnaturalización de seroproteínas.

En la cuarta etapa se estudiaron las transformaciones que tienen lugar en sistemas modelo de distinta complejidad.

II. MATERIALES Y METODOS

2.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

2.1.1. Síntesis de sustancias patrón.

Al no disponerse de patrones puros de fructosil-lisina, furosina y piridosina en el comercio, se llevó a cabo su síntesis tal y como queda reflejado en los apartados siguientes.

2.1.1.1. Síntesis de fructosil-lisina [α -acetil- $N\epsilon$ -(desoxi-1-D-fructosil-1)-L-Lisina].

Se procedió a la síntesis de fructosil-lisina como compuesto de Amadori precursor de furosina. Se eligió frente a la síntesis de lactulosil-lisina, al ser esta de bajo rendimiento y de difícil purificación.

La síntesis se realizó siguiendo el método de Finot y col. (1969). Se pesan 0,5 g de α -acetil-lisina y 3,25 g de D-glucosa, añadiéndose 47,5 ml de metanol. La suspensión se calienta a reflujo durante cuatro horas. La solución obtenida se enfría y se concentra a vacío hasta la total eliminación del metanol. El residuo se disuelve en una mínima cantidad de H_2O y se purifica por cromatografía en columna de intercambio iónico.

La resina utilizada es una Dowex 50Wx4, 100-200 mesh (176 cm^3), la cual se acondiciona mediante el siguiente pretratamiento. Primero se lava con una solución de NaOH 2 N y a continuación con agua destilada. Se regenera con una solución de HCl 2 N, volviéndose a lavar a continuación con agua hasta obtener un pH neutro. La resina se activa en forma de "piridina" con la utilización de una solución acuosa de piridina 2 M, se lava seguidamente con H_2O y se eluye con el tampón formiato de piridina 0,2 M de pH=3,25. La solución tampón se prepara ajustando el pH de una solución de piridina 0,2 M con ácido fórmico.

Una vez acondicionada la columna se deposita la muestra,

eluyéndose en un principio con 200 ml aproximadamente de agua, con el fin de eliminar el exceso de azúcar. A continuación se pasa el tampón formiato de piridina recogiendo fracciones de 15 ml. El seguimiento de las fracciones se realiza por medio de la cromatografía en capa fina (CCF).

La purificación se lleva a cabo por recristalización. Para ello, las fracciones que contienen fructosil-lisina se liofilizan y redisuelven en un volumen pequeño de metanol. La adición rápida de 2-butanona en exceso, con agitación durante veinte horas, provoca la precipitación de dicho compuesto. El precipitado se filtra y se lleva a estufa de vacío hasta obtener un peso constante.

La confirmación de la estructura y el grado de pureza de la fructosil-lisina sintetizada se lleva a cabo por microanálisis.

2.1.1.2. Síntesis de furosina [ϵ -N-(2-furoil-metil)-L-lisina] y piridosina [ϵ -(1,4-dihidro-6-metil-3-hidroxi-4-oxo-1-piridil)-L-norleucina].

Se realiza partiendo de 500 mg de α -acetil-fructosil-lisina pura, a la cual se añaden 500 ml de HCl 6 N y se calienta a reflujo durante 24 horas (Finot y col., 1968). La solución resultante se concentra a sequedad a vacío, disolviéndose el residuo seco en una pequeña cantidad de agua para proceder a su purificación. Esta se llevó a cabo por cromatografía en columna de intercambio iónico, utilizando una resina Dowex 50Wx4 (345 cm³) en forma ácida. La elución se realiza con una solución de HCl 2 N y se recogen fracciones de 20 ml.

La estructura de furosina se confirma por resonancia magnética nuclear (RMN), infrarrojo (IR) y espectroscopía UV (UV), y la de piridosina por RMN y UV.

2.1.2. Preparación de sistemas modelo que simulan un ultrafiltrado de leche (SMUF).

Para la preparación de los sistemas salinos se han utilizado dos tipos de soluciones siguiendo el método de Jenness y Koops (1962):

Solución salina A	Solución salina B
KH ₂ PO ₄ 15,80 g	CaCl ₂ .2H ₂ O 13,20 g
K ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .H ₂ O 12,00 g	MgCl ₂ .6H ₂ O 6,52 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .5H ₂ O ... 21,20 g	H ₂ O Milli-Q hasta 200 ml
K ₂ SO ₄ 1,80 g	
KCl 6,00 g	
H ₂ O Milli-Q hasta 200 ml	

2.1.2.1. SMUF con lactosa.

Se preparó una solución al 5% de lactosa en SMUF, pero cuatro veces concentrada para su posterior atomización. Se tomaron 40 ml de la solución salina A y 40 ml de la solución salina B y se añadió una pequeña cantidad de agua, agitando bien la solución. A continuación se disolvieron 0,6 g de CO₃K₂ y 100 g de lactosa enrasando con agua hasta casi completar los 500 ml. Una vez disuelta toda la lactosa se ajustó el pH a 6,6 con KOH 1 N y se llevó a 500 ml con agua.

2.1.2.2. SMUF con lactosa y α -acetil-lisina.

Se preparó la solución en la misma forma que la anterior, pero añadiendo además 2,5 g de α -acetil-lisina (0,5%).

2.1.2.3. SMUF con fructosil-lisina.

Se preparó una solución de fructosil-lisina en SMUF al 0,02%. Para ello se tomaron 2 ml de la solución salina A y 2 ml de la solución salina B, se añadió una pequeña cantidad de agua

y 30 mg de CO_3K_2 , se disuelven a continuación 20 mg de fructosil-lisina, ajustando el pH de la solución a 6,6 con KOH 1 N y enrasando con H_2O hasta un volumen de 100 ml.

2.1.3. Elaboración de sistemas en polvo: Atomización.

Se procedió a la atomización de dos muestras de leche, un concentrado de proteínas de suero de quesería (WPC) con un contenido en seroproteínas del 33%, y los sistemas salinos SMUF con lactosa y SMUF con lactosa y α -acetil-lisina.

Las dos muestras de leche se obtuvieron partiendo de una leche en polvo desnatada según se indica a continuación:

Muestra 1.- Se pesan 100 g de leche y se reconstituyen con agua hasta un 45% de sólidos totales.

Muestra 2.- Se pesan otros 100 g de leche que se reconstituyen de igual forma, burbujeando a continuación CO_2 hasta obtener un pH de 6,4.

La muestra correspondiente al WPC se preparó de forma idéntica a la muestra 1 de leche en polvo.

Las muestras de leche y el WPC se atomizaron con objeto de igualar las condiciones de tratamiento de los distintos sistemas en polvo para su posterior conservación.

La atomización de las muestras citadas anteriormente se llevó a cabo en el laboratorio utilizando un atomizador modelo 190 (Büchi) (figura 9).

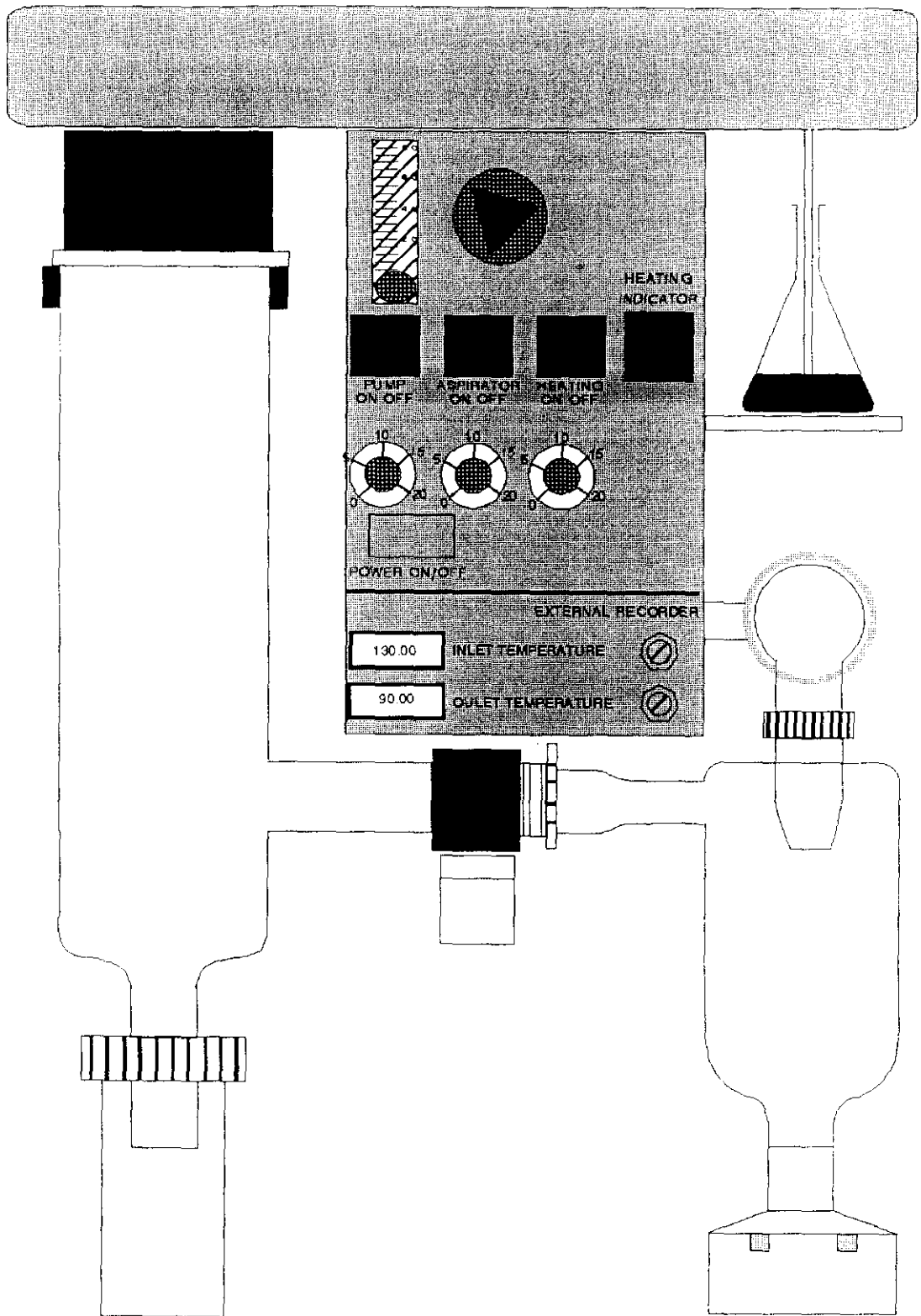


Figura 9. Esquema del atomizador modelo 190 (Büchi).

Se ensayaron distintas condiciones de atomización hasta llegar a un óptimo, siendo las que se indican a continuación las consideradas como más idóneas:

- Temperatura de entrada: 130°C
- Temperatura de salida: 90°C
- Velocidad máxima de aspiración de aire.
- Flujo de aire: 600 Nl/h
- Bomba: posición 5-6 que proporciona un flujo de 700 ml/h de alimentación de muestra, y la temperatura de salida deseada.

Con la caída de temperatura obtenida el atomizado resultante presenta una humedad residual menor del 3%. La aspiración máxima proporciona, por otra parte, un aumento del rendimiento de atomización, mientras que con el flujo de aire seleccionado el tamaño de las partículas del polvo no es demasiado fino.

2.1.4. Muestras de leche comerciales.

Para estudiar el comportamiento de los componentes mayoritarios de la leche sometida a distintos tipos de tratamiento térmico, se ha realizado un amplio muestreo de leches UHT y leches en polvo existentes en el comercio, determinándose las concentraciones de furosin, lactulosa y proteínas de suero no desnaturalizadas.

2.1.4.1. Leches UHT.

Se han analizado cuarenta muestras de leche UHT comerciales, de las cuales 19 han sido sometidas a tratamiento UHT directo, y 21 a tratamiento UHT indirecto. De ellas, 13 muestras corresponden a leche desnatada y 27 a leche entera.

2.1.4.2. Leches en polvo.

Se han analizado 11 muestras de leche en polvo, de las cuales cinco son desnatadas, cuatro enteras y una semidesnatada.

2.2. ENSAYOS DE CONSERVACION.

Con objeto de estudiar el efecto de los distintos parámetros del almacenamiento, como tiempo, temperatura y actividad de agua (a_w) sobre los diferentes componentes lácteos, se ha realizado un ensayo de conservación utilizando distintos tipos de muestras.

2.2.1. Sistemas en polvo.

En el ensayo de conservación de los sistemas en polvo se estudió el efecto de la temperatura y la a_w sobre la fracción de carbohidratos y proteínas, determinándose la formación de furosina y lactulosa, la desnaturalización de las seroproteínas y la variación del pH.

2.2.1.1. Preparación de soluciones saturadas.

Las actividades de agua ensayadas fueron 0,33, 0,44 y 0,65. Para obtenerlas se prepararon las siguientes soluciones salinas:

	a_w
- Solución saturada en caliente de Cl_2Mg	0,33
- Solución saturada en caliente de CO_3K_2	0,44
- Solución saturada en caliente de NO_2Na	0,65

Una vez preparadas, se depositaron en desecadores en los cuales se hizo el vacío una vez introducidas las muestras.

2.2.1.2. Condiciones de conservación.

Los sistemas en polvo se almacenaron durante 100 días a 20, 30 y 50°C, y a las actividades de agua mencionadas en el apartado anterior. La toma de muestra se realizó cada 20 días. El ensayo completo de conservación queda reflejado en la tabla VI.

Tabla VI. Esquema de conservación de los sistemas en polvo.

Temperatura (°C)	Actividad de agua (a_w)		
	0,33	0,44	0,65
20	+*		
30	+	+*	+
50	+	+*	+

+. Condiciones de almacenamiento correspondientes a las muestras SMUF con lactosa, SMUF con lactosa y α -acetil-lisina, leche y WPC.

*. Condiciones de almacenamiento correspondientes a la muestra de leche tratada previamente con CO₂.

2.2.2. Sistemas líquidos.

2.2.2.1. Evolución de α -acetil-fructosil-lisina.

Para estudiar el comportamiento de fructosil-lisina durante el almacenamiento, y con objeto de poder explicar la evolución del compuesto de Amadori en leche, se llevó a cabo un estudio de conservación de la fructosil-lisina sintetizada.

Para ello, se ha dispuesto de catorce ampollas de vidrio, en cada una de las cuales se depositan 2 ml de una solución de fructosil-lisina en SMUF al 0,02%. Trece de estas ampollas se esterilizan a 120°C durante 20 minutos, tomándose la número catorce como blanco.

Una de las ampollas se analiza después del proceso de esterilización, actuando como testigo frente a las doce restantes, las cuales se almacenan durante 60 días a dos temperaturas diferentes. Seis de ellas se mantienen en estufa a

20°C, y las otras seis a 40°C. La toma de muestra se realiza cada 10 días.

2.2.2.2. Leches UHT.

Este ensayo de conservación se ha realizado en cuatro lotes de leche UHT, directo e indirecto, de distinta procedencia:

Lote I.....Leche española UHT indirecto (149°C, 22,6 sg)

Lote II.....Leche alemana UHT indirecto (139°C, 3 sg)

Lote III.....Leche alemana UHT directo (144°C, 5 sg)

Lote IV.....Leche española UHT directo (150°C, 4,6 sg)

Las muestras se han almacenado durante tres meses a cuatro temperaturas diferentes, 20, 30, 40 y 50°C, realizándose la toma de muestra cada 15 días, y procediéndose a la medida del pH para cada muestra. La determinación de furosina, lactulosa y seroproteínas no desnaturalizadas se realizó cada 30 días, al considerarse que para estos intervalos de tiempo las variaciones son indicativas de la evolución de los distintos componentes con la conservación.

2.3. TECNICAS ANALITICAS.

En este apartado se incluyen las diversas técnicas analíticas utilizadas.

2.3.1. Cromatografía en capa fina.

Esta técnica se ha empleado en la identificación de los productos sintetizados: α -acetil-fructosil-lisina, furosina y piridosina, en el seguimiento de las fracciones obtenidas en la purificación por cromatografía en columna.

2.3.1.1. Cromatografía en capa fina de α -acetil-fructosil-lisina.

Se emplearon tres sistemas cromatográficos sobre dos soportes diferentes, que son los que se indican a continuación:

1. Consiste en una cromatografía bidimensional utilizando los sistemas de eluyentes propuestos por Finot y col. (1969). El primer eluyente es la mezcla 2-butanona/ac. acético/agua (50/30/20), y como segundo eluyente Piridina/ac. acético/agua (90/10/20). Como soporte se utilizaron placas de celulosa MN300 de 20 x 20 cm y 0,25 mm de espesor de capa, que se prepararon en el laboratorio. El revelado de las placas se realizó con una solución de ninhidrina al 0,2% en etanol/ac. acético/colidina (50/10/2), calentándose posteriormente en estufa a 110°C durante unos minutos.

2. Este segundo sistema es monodimensional, con el empleo del mismo tipo de soporte y revelador que en el sistema anterior, pero con la utilización como eluyente de la mezcla Piridina/ac. acético/agua (90/10/20) (Finot y col., 1969).

3. Es igual al anterior, pero el soporte utilizado en este caso son placas comerciales de Silicagel 60 (DC-Alufolien Kieselgel 60, Merck), de 20 x 20 cm y 0,2 mm de espesor.

Se eligió este último sistema, al obtenerse una mayor resolución de los diferentes compuestos a separar, necesitar menor cantidad de muestra y ser más rápido.

2.3.1.2. Cromatografía en capa fina de furosina y piridosina.

Todos los sistemas de eluyentes ensayados se han utilizado sobre placas comerciales DC-Alufolien Kieselgel 60 (Merck) de 20 x 20 cm de tamaño y 0,2 mm de espesor. Como revelador se utilizó en todos los casos la solución de ninhidrina ya indicada en el

apartado anterior.

1. El primer sistema ensayado es el propuesto por Nakai y col. (1975) que utiliza como eluyente la mezcla n-propanol y amoníaco en agua al 9,5% en las proporciones 20/10.

2. Basándonos en el eluyente utilizado en HPLC, se ensayó la mezcla acetonitrilo/agua/ac. acético en las proporciones 50/20/1, 25/25/1 y 25/25/5, siendo este último con el cual se obtenía una mayor separación entre los distintos compuestos procedentes de la hidrólisis de α -acetil-fructosil-lisina, como lisina, α -acetil-lisina, furosina y piridosina.

2.3.2. Cromatografía de gases.

Por medio de la cromatografía de gases se ha determinado el contenido en lactulosa en los distintos tipos de muestras de leche y sistemas modelo estudiados. Para ello se ha utilizado el método puesto a punto por Olano y col. (1986).

2.3.2.1. Preparación de las muestras.

Para la obtención de los carbohidratos a partir de las muestras de leche, se siguió el método descrito por Martínez-Castro y Olano (1980). 1 ml de leche se llevó hasta 10 ml con metanol, consiguiéndose así la precipitación de las proteínas y la grasa que se filtran al cabo de una hora. En el caso de las muestras de leche en polvo es necesaria una reconstitución previa por disolución de 1 g de muestra en 10 ml de agua.

Los sistemas SMUF en polvo se reconstituyeron de la misma forma que las leches, pero para la preparación de la muestra se tomó 1 ml de la solución que se llevó hasta un volumen de 10 ml, realizando primeramente una completa disolución de las sales con agua y enrasando a continuación con metanol.

A 1 ml de la solución de los carbohidratos así obtenida se le añade 1 ml de una solución de β -fenilglucósido al 0,1% en metanol/agua (70/30) como patrón interno.

Las soluciones metanólicas de los carbohidratos con el patrón interno se evaporaron en un rotavapor a temperatura ambiente. A las muestras secas se les añadió 0,1 ml de trimetilsilil imidazol como agente de derivatización, y se mantuvieron en estufa a 65°C durante media hora. A continuación, y una vez enfriadas, se añadieron 0,1 ml de hexano y 0,2 ml de agua y se inyectaron de 0,2 a 1 μ l de la fase orgánica.

2.3.2.2. Condiciones cromatográficas.

Se utilizó un cromatógrafo de gases Sigma 3B (Perkin Elmer), dotado de un detector de ionización de llama. Los datos se recogieron en un integrador LCI-100 (Perkin Elmer).

La columna utilizada es una OV-17 microrrellena de acero pretratado (3m x 0,8 cm d.i. x 1 mm d.e.) al 2,5% sobre un soporte Volaspher desilanzado (120-140 mesh). Como gas portador se empleó nitrógeno.

Las condiciones cromatográficas son las descritas por Olano y col. (1986):

Tª del inyector y detector	300°C
Tª inicial del horno	200°C
Tiempo inicial	2 min
Rampa de calentamiento	15°C/min
Tª final del horno	270°C
Tiempo final	15 min

2.3.3. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Esta técnica se ha utilizado en la determinación de furosina y proteínas de suero no desnaturalizadas.

2.3.3.1. HPLC de furosina y piridosina. Puesta a punto del método analítico.

El sistema cromatográfico utilizado consistió en una bomba modelo 510 (Waters Assoc.), un inyector Rheodyne modelo 7125 y un detector de longitud de onda variable SM 4000 (LDC Analytical), conectados a un sistema de tratamiento de datos System Gold (Beckman). Se utilizó una columna Spherisorb ODS2 (Phenomenex) de 5μ de diámetro de partícula y 0,46 x 25 cm de tamaño. Los análisis se realizaron en condiciones isocráticas a temperatura ambiente, con una longitud de onda de detección de 280 nm y una sensibilidad de 0,01 AUFS.

Como fase móvil se ensayaron tres sistemas de eluyentes:

1. Acido fosfórico 5,6 mM (Schleicher y Wieland, 1981) a un flujo de 1 ml/min.
2. Buffer acetato al 0,5% (Chiang, 1983) que se preparó a partir de una solución de acetato sódico al 0,5% en agua, ajustando el pH de la solución a 4,3 con ácido acético glacial. El flujo utilizado fué de 1 ml/min.
3. Una solución de heptanosulfonato sódico como contraión, con la adición de acetonitrilo como modificador orgánico y un 0,2% de ácido fórmico para obtener un pH ácido que evite la disociación del grupo carboxilo del aminoácido. Se probaron distintas molaridades del contraión (2, 3, 5 y 10 mM) y distintas proporciones de acetonitrilo (15, 18, 20, 22 y 25%).

2.3.3.1.1. Preparación de muestras de leche.

Se parte de 0,5 ml de leche y se añaden 3 ml de HCl 7 N, que nos da una normalidad resultante de 6. En el caso de leche en polvo, se pesan 50 mg de muestra y se añaden 3 ml de HCl 6 N. Esta mezcla se hidroliza a 110°C durante 24 horas en tubos de hidrólisis cerrados a vacío. Los hidrolizados obtenidos se evaporan a sequedad utilizando un concentrador SpeedVac Concentrator A-160 (Savant). El residuo se disuelve en 0,5 ml de agua y se filtra a través de una membrana Anotec (Whatman) de 0,2 μ de poro. El filtrado se pasa a través de un cartucho Sep-Pak C₁₈ (Millipore) previamente acondicionado con metanol y agua. Una vez eluída la muestra, se pasa un determinado volumen de la mezcla agua/acetonitrilo/ácido fórmico (95/5/0,2) para eluir la furosina que pudiera quedar retenida, hasta un volumen final de 5 ml.

2.3.3.1.2. Análisis cuantitativo de furosina.

El análisis cuantitativo de furosina se realizó por el método del patrón externo, al no disponerse de un compuesto de naturaleza semejante y que no estuviera presente en leches.

Linealidad de respuesta.

El estudio de linealidad se realizó con dos soluciones acuosas del patrón de furosina sintetizado (I y II) con concentraciones de 0,4 mg/100 ml y 8 mg/100 ml respectivamente. Se inyectaron por duplicado los siguientes volúmenes de cada solución:

- Solución I:

1 μ l	0,004 μ g
5 μ l	0,008 μ g
10 μ l	0,040 μ g

* La muestra de leche se diluyó a la mitad antes de la adición del patrón con el objeto de que la cantidad añadida no fuese muy inferior a la presente en la muestra de leche.

Se calcularon a continuación los contenidos finales y con ellos el porcentaje de recuperación de la furosina añadida.

2.3.3.1.3. Análisis cuantitativo de piridosina.

Se realizó, al igual que el de furosina, por el método del patrón externo.

Linealidad de respuesta.

Se realizó a partir de una solución acuosa del patrón de piridosina previamente sintetizado con una concentración de 8 mg/100 ml. Se inyectaron por duplicado los siguientes volúmenes de la solución:

5 μ l	0,4 μ g
10 μ l	0,8 μ g
15 μ l	1,2 μ g
20 μ l	1,6 μ g

Se calculó la recta de regresión representando cantidad de piridosina inyectada en μ g frente a absorbancias expresadas en unidades de área. El límite de detección se calculó, al igual que el de furosina, como dos veces el error standard obtenido en el análisis de regresión lineal.

2.3.3.2. HPLC de seroproteínas no desnaturalizadas.

Para la determinación cuantitativa de las seroproteínas no desnaturalizadas se ha utilizado el método de Resmini y col. (1989). El sistema cromatográfico empleado fué un equipo Beckman compuesto de una bomba programable modelo 126, un detector UV de

longitud de onda variable modelo 166 y un inyector Rheodyne con un loop de carga de 20 μ l. Para el análisis se utilizó una columna polimérica de fase reversa PLRP-S (Polymer Laboratories LTD) de 150 x 4,6 mm y 8 μ de tamaño de partícula, y la detección se realizó a 205 nm.

Para la elución se utilizó un gradiente binario de los eluyentes:

- A. Agua/0,1% de ácido trifluoroacético
- B. Acetonitrilo/0,1% de ácido trifluoroacético

con un flujo de 1 ml/min. El gradiente de elución utilizado, expresado en porcentaje del eluyente B, es el que se describe a continuación:

0-1 min	35% B
1-8 min	38% B
8-16 min	42% B
16-22 min	46% B
22-22,5 min	100% B
22,5-23 min	100% B
23-23,5 min	35% B
23,5-35 min	35% B

2.3.3.2.1. Preparación de las muestras.

Para la obtención del suero, 50 ml de leche se llevan a un pH de 4,6 por adición de HCl 2 N, manteniéndose a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación se centrifuga la muestra a 4000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 5°C. El sobrenadante se filtra a través de membranas Anotec (Whatman) de 0,22 μ , inyectándose seguidamente en el cromatógrafo.

2.3.3.2.2. Análisis cuantitativo de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina.

El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón externo, calculando la ecuación de la recta correspondiente para cada proteína. Para ello se inyectaron por triplicado distintos volúmenes de 2 soluciones patrón de α -lactoalbúmina con concentraciones de 0,1 y 1 mg/ml (I y II), y dos soluciones de β -lactoglobulina de 0,4 y 4 mg/ml (III y IV).

Tabla VII. Esquema correspondiente a los volúmenes (μ l) y cantidades (μ g) inyectados de α -lactoalbúmina (α -lac) y β -lactoglobulina (β -lg).

Volumen inyectado (μ l)	α -lac (μ g)		β -lg (μ g)	
	Sol. I	Sol. II	Sol. III	Sol. IV
2	0,2	2	0,8	8
3,5	-	3,5	-	14
5	0,5	5	2	20
7,5	-	7,5	-	30
10	1	10	4	40

La β -lactoglobulina se cuantificó como un solo componente, sumando las áreas correspondientes a la β -lactoglobulina A y B.

2.3.4. Otras técnicas analíticas.

2.3.4.1. Espectroscopía ultravioleta-visible (UV).

Los espectros se obtuvieron en un espectrofotómetro modelo DU-70 (Beckman), con una unidad de tratamiento de datos.

2.3.4.2. Análisis elemental.

Los análisis de C, H y N se llevaron a cabo utilizando un Elemental Analyzer 240 C (Perkin Elmer).

2.3.4.3. Espectroscopía Infrarroja (IR).

Los análisis se realizaron en pastilla de BrK, utilizando un espectrómetro modelo 681 (Perkin Elmer).

2.3.4.4. Resonancia magnética nuclear (RMN).

El espectro RMN de protón se llevó a cabo utilizando un espectrómetro Varian XL-300 operando a 300 MHz, usando D₂O como disolvente y DSS como patrón interno. Los parámetros de adquisición fueron: ángulo de pulso 77°, tiempo de adquisición 4 segundos, anchura espectral 4000 Hz y número de puntos 32 K.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. SINTESIS DE FRUCTOSIL-LISINA.

Siguiendo el procedimiento de Finot y col. (1969), según se indica en el apartado 2.1.1.1. de materiales y métodos, se partió de 500 mg de α -acetil-lisina, obteniéndose 514,6 mg de α -acetil-fructosil-lisina pura con un rendimiento del 55,28%.

El seguimiento de las fracciones obtenidas en la purificación por cromatografía en columna de intercambio iónico se realizó por cromatografía en capa fina (CCF). En la figura 10 se muestra una cromatoplaaca correspondiente al seguimiento de las 40 fracciones eluidas.

A partir de la fracción 20 y hasta la 32 inclusive eluye un único compuesto con un R_f de 0,66 que corresponde al de α -acetil-fructosil-lisina. Dichas fracciones se concentraron a sequedad y se realizó una segunda purificación por recristalización con 2-butanona. El microanálisis obtenido fué el siguiente:

	%C	%H	%N	%O
Teórico	48	7,43	8	36,57
Experimental	50,32	7,20	7,85	34,63

Dicho resultado, si bien no es coincidente con el teórico y dado que se trata de un compuesto intermedio en la síntesis de furosina, se consideró aceptable.

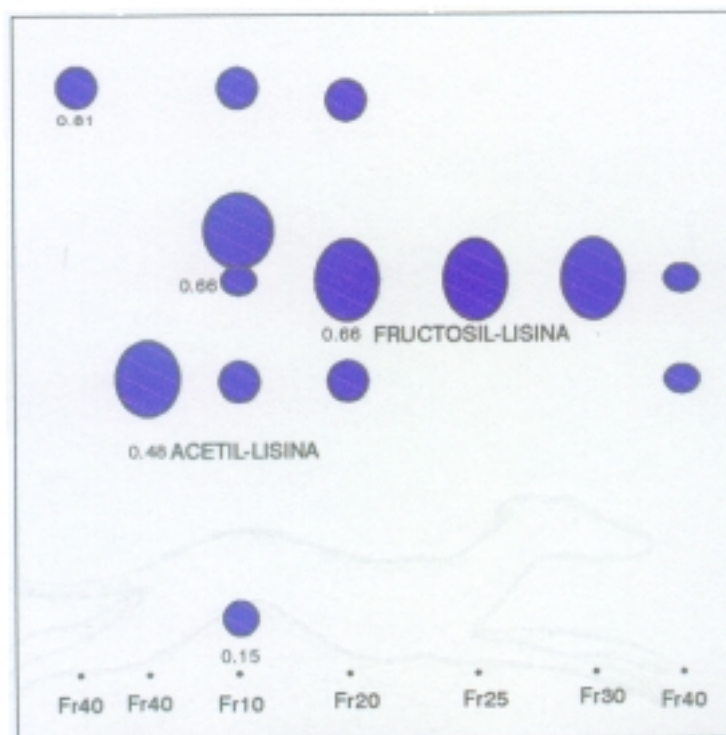


Figura 10. Cromatoplaqa de las fracciones correspondientes a la elución de α -acetil-fructosil-lisina.

3.2. SINTESIS DE FUROSINA Y PIRIDOSINA.

Se hidrolizó la α -acetil-fructosil-lisina previamente sintetizada siguiendo el procedimiento de Finot, y la hidrólisis resultante se purificó por cromatografía en columna de intercambio iónico para obtener furosina y piridosina. Se recogieron 240 fracciones de 15 ml que se analizaron cada 10 por CCF. En la figura 11 se muestran las cromatoplaqas correspondientes.

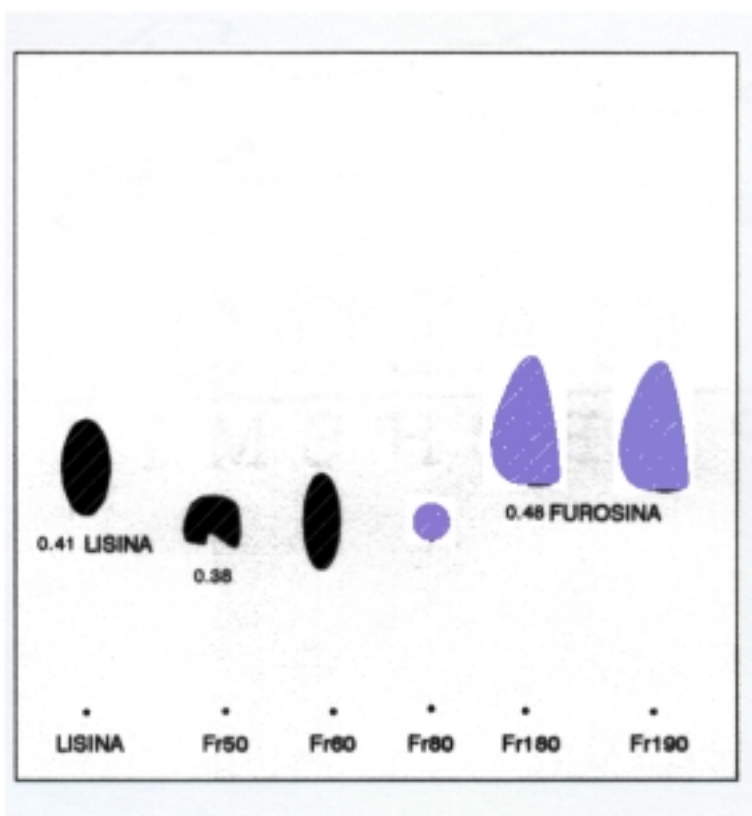


Figura 11. Cromatoplaqa de las fracciones correspondientes a la elución de furosina.

Las fracciones 170-195, correspondientes a la furosina, y 225-240 correspondientes a la piridosina, se concentraron a sequedad para eliminar el ácido clorhídrico y se diluyeron en una pequeña cantidad de agua liofilizándose posteriormente. La estructura de furosina se confirmó por espectroscopia de infrarrojo, RMN y UV.

El espectro UV en agua mostró dos máximos, uno más intenso a 280 nm, y un segundo a 224 nm (figura 12), con una relación de absorbancias a 280/254 de 2,9.

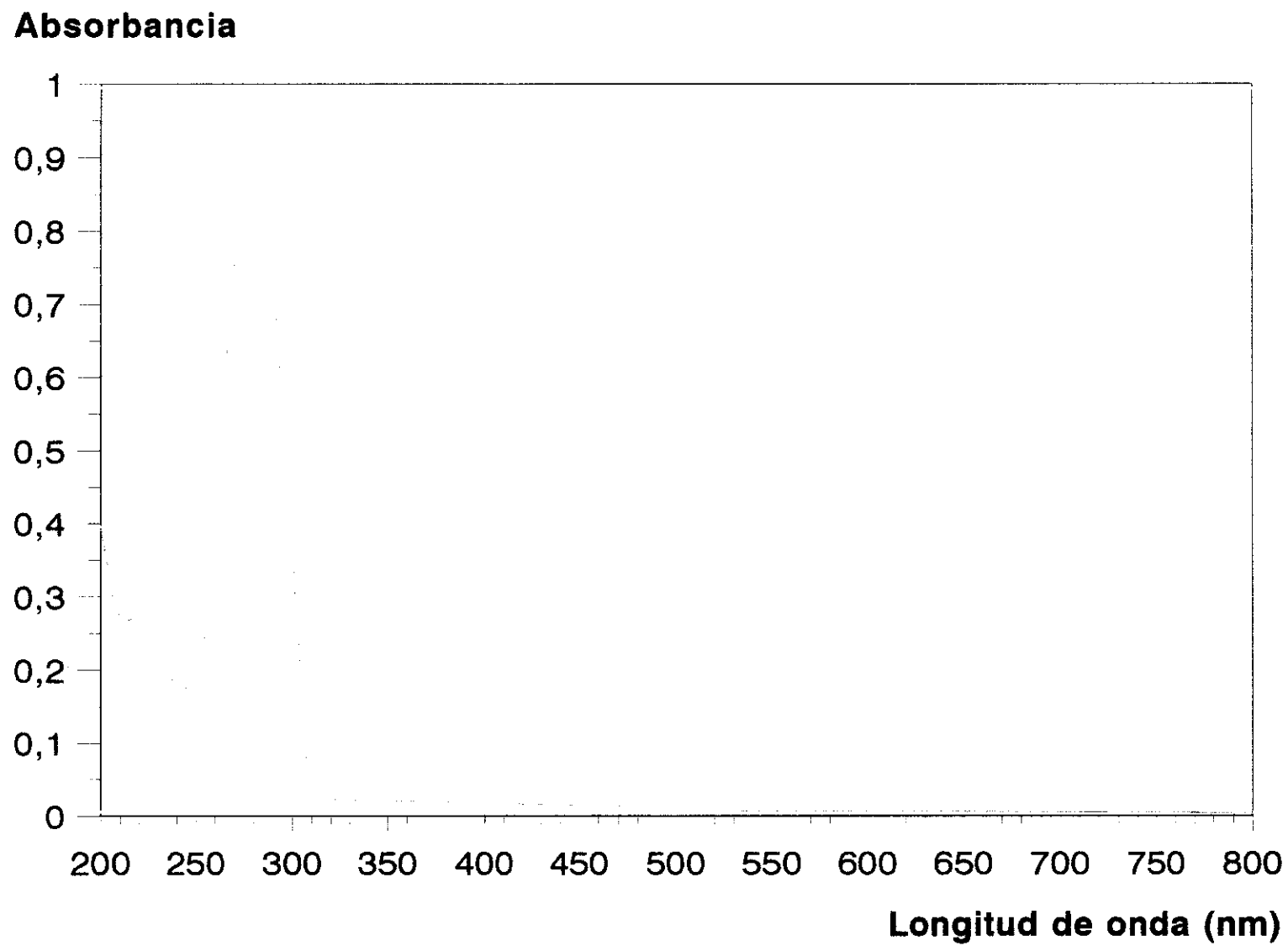


Figura 12. Espectro UV correspondiente a la furosina sintetizada.

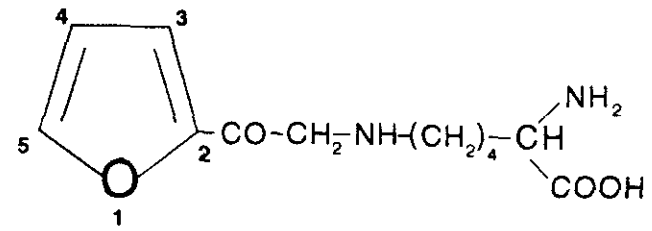
El espectro IR (figura 13) presenta las bandas a 780, 885 y 100 cm^{-1} correspondientes al anillo furano. A 1405 y 1470 cm^{-1} aparecen las bandas del grupo $-\text{CH}_2-$ unido a un carbonilo y del $-\text{CH}_2-$ olefínico respectivamente. A 1682 cm^{-1} se obtiene la banda del grupo cetona y a 1741 cm^{-1} la del grupo $\text{CO}-$ del ácido. Las bandas más intensas se observan a 3400-3500 cm^{-1} correspondientes a los grupos $-\text{NH}-$ y $-\text{NH}_2-$, y a 2900-3100 cm^{-1} las de los grupos $-\text{CH}_2-$ y $-\text{COOH}$.

El espectro RMN de protón (figura 14) mostró los multipletes correspondientes a 14 protones. A campo bajo aparecen tres multipletes mostrando las constantes de acoplamiento del anillo furánico 2-sustituido: δH3 7,64 ppm [$^3\text{J}(\text{H3},\text{H4})=4,2\text{Hz}$; $^4\text{J}(\text{H3},\text{H5})=0,8\text{Hz}$], δH4 6,82ppm [$^3\text{J}(\text{H3},\text{H4})=4,2\text{Hz}$; $^3\text{J}(\text{H4},\text{H5})=1,7\text{Hz}$] y δH5 7,97ppm [$^3\text{J}(\text{H4},\text{H5})=1,7\text{Hz}$; $^4\text{J}(\text{H3},\text{H5})=0,8\text{Hz}$]. El resto de las señales corresponden a los protones de la cadena de la molécula: 4,70 ppm ($\text{CO}-\text{CH}_2-$, singlete), 4,05 ppm ($\text{CH}-\alpha$, triplete), 3,28 ppm ($\text{CH}_2-\epsilon$, triplete), 2,06 ppm ($\text{CH}_2-\delta$, multiplete), 1,91 ppm ($\text{CH}_2-\beta$, doblete de triplete) y 1,6 ppm ($\text{CH}_2-\gamma$, multiplete).

Los espectros de IR, RMN y UV coinciden con los obtenidos por Finot y col. (1968) y Heyns y col. (1968) para furosina.

La confirmación de la estructura de piridosina se realizó por RMN y UV. El espectro UV en medio neutro mostró un máximo a 276 nm, en medio ácido se obtuvieron dos máximos a 276 y 246 nm, y en medio básico el máximo se desplazó a 330nm (figura 15).

El espectro RMN de protón para piridosina (figura 16) mostró igualmente los multipletes correspondientes a 14 protones. Las señales a 8,13 ppm (H3, singlete) y 7,18 ppm (H6, singlete) se asignan a los protones no acoplados en el anillo de piridina, y la señal a 2,66 ppm (CH_3 , singlete) al sustituyente 2-metil. Las señales a 4,36 ppm, 4,23 ppm, 2,1 ppm y 1,6 ppm corresponden a los protones de la cadena de la nor-leucina. Los resultados obtenidos concuerdan con los de Finot y col. (1969) para la piridosina.



FUROSINA

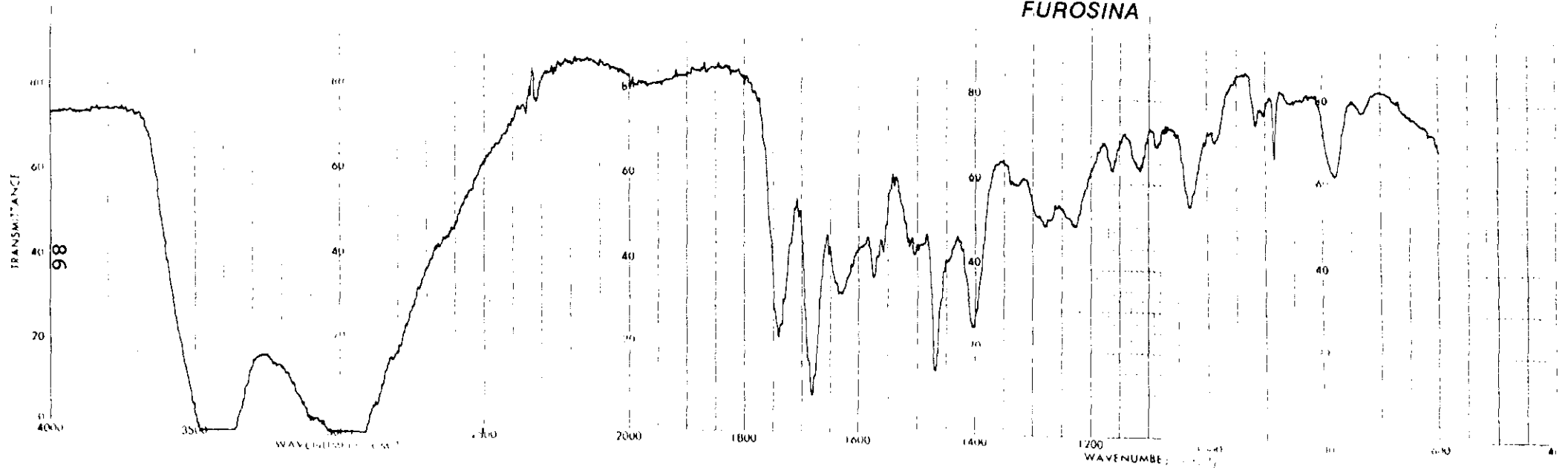


Figura 13. Espectro IR en pastilla de BrK correspondiente a la furosina sintetizada.

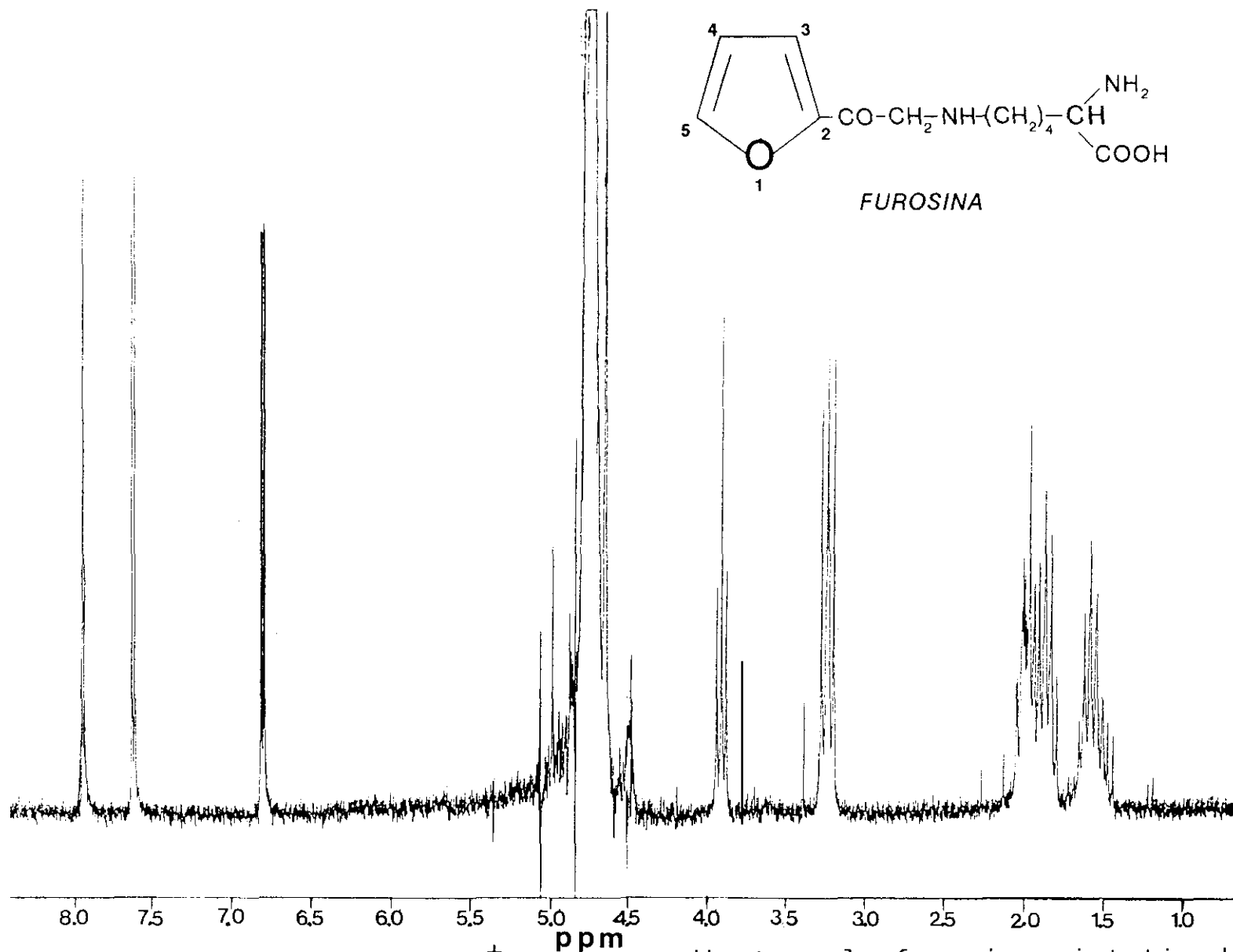


Figura 14. Espectro RMN de H^+ correspondiente a la furosina sintetizada.

Absorbancia

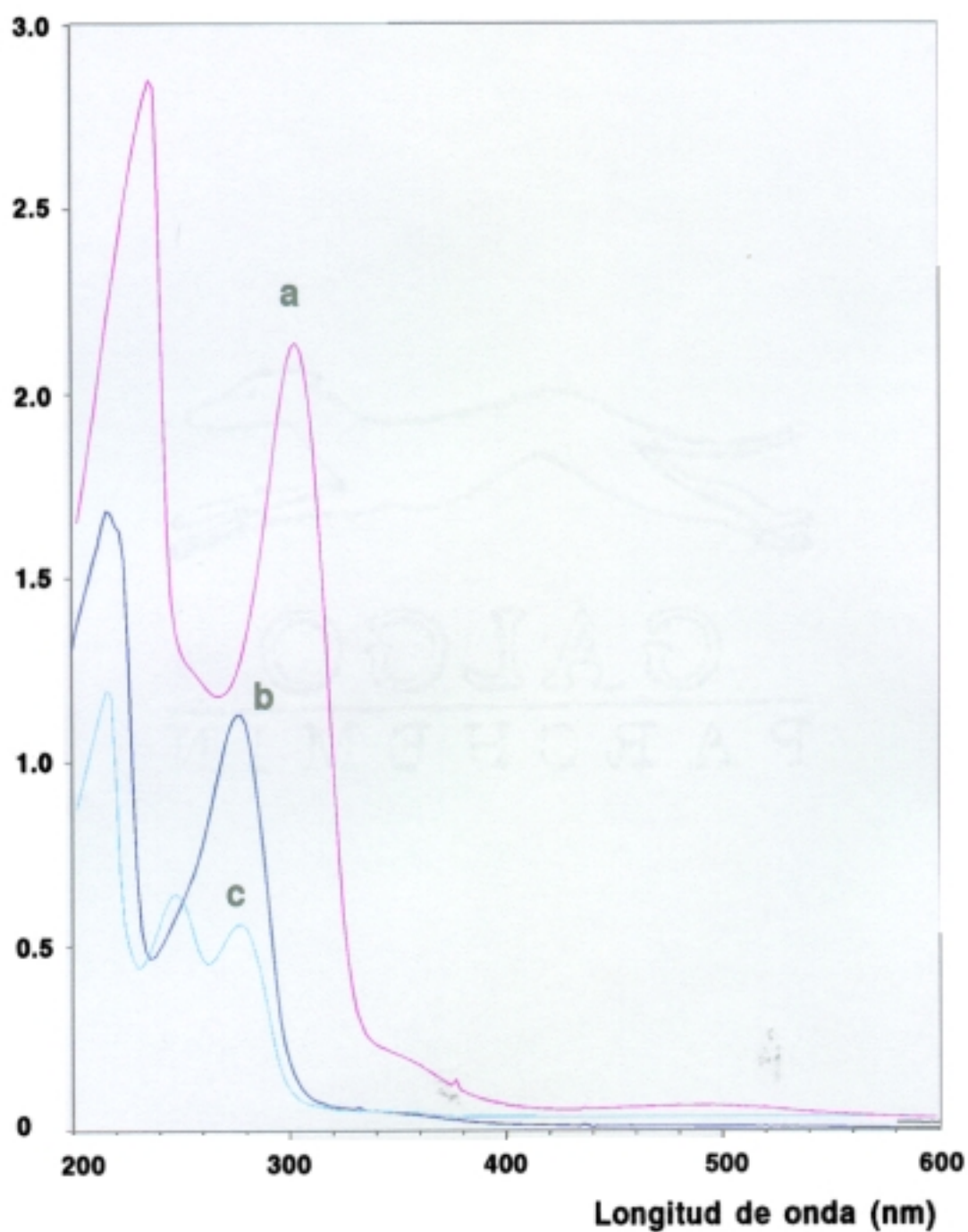


Figura 15. Espectro UV correspondiente a la piridosina sintetizada **a.** en medio básico **b.** en medio neutro **c.** en medio ácido.

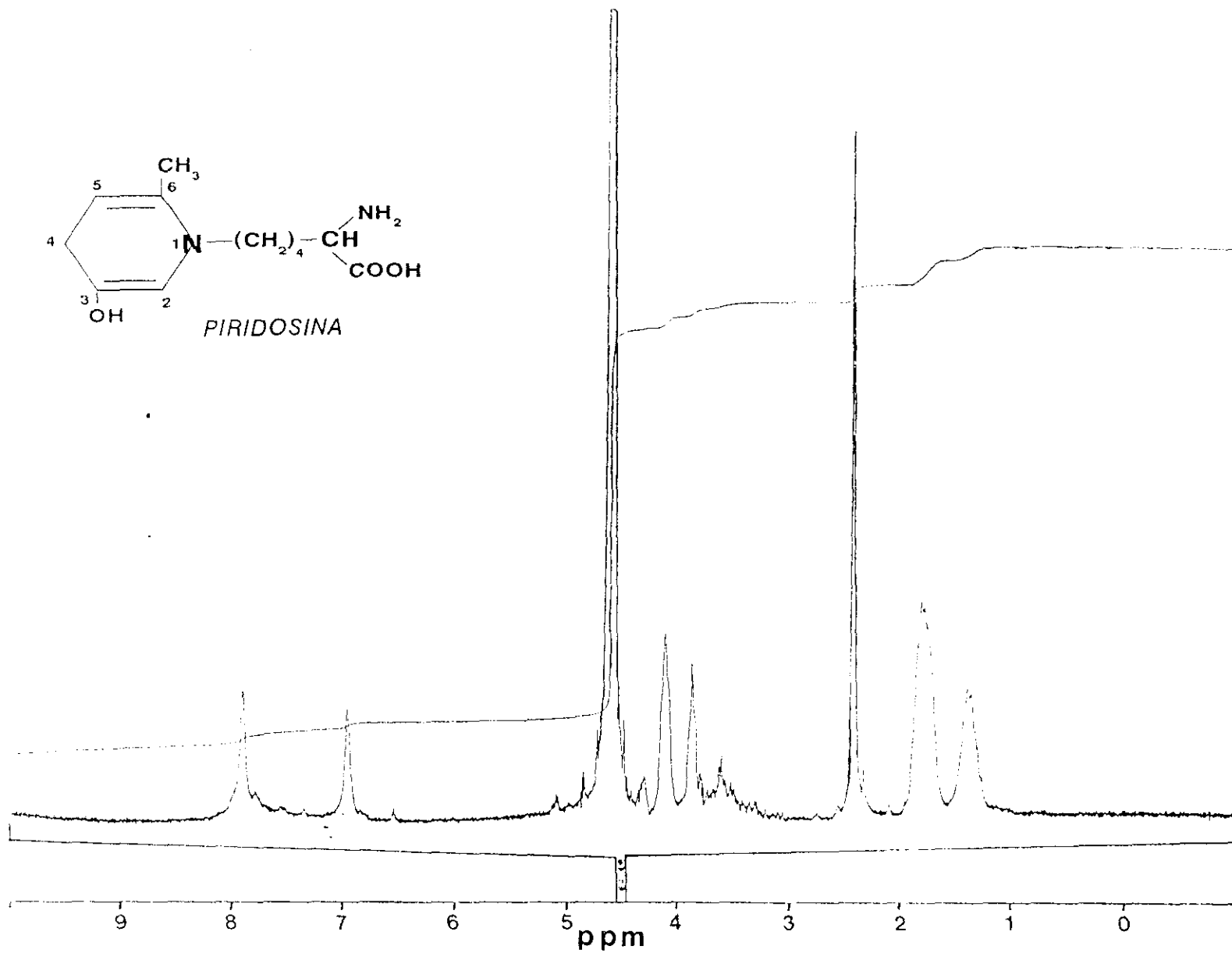


Figura 16. Espectro RMN de H^+ correspondiente a la piridosina sintetizada.

3.3. ANALISIS DE FUROSINA Y PIRIDOSINA POR HPLC. OPTIMIZACION DEL METODO.

Para la determinación de furosina se eligió la técnica HPLC. La variación entre los diferentes métodos de análisis de furosina por HPLC estriba fundamentalmente en la fase móvil utilizada.

El único método recogido en la bibliografía para la determinación cuantitativa de furosina por HPLC en leche es el descrito por Resmini y col. (1990), sin embargo el empleo de CLK en el eluyente y la utilización de conexiones de teflon en el cromatógrafo no permite su reproducción en los equipos disponibles en el laboratorio.

Para la elección de un método de determinación de furosina en leches se han ensayado los propuestos por Sleicher y Wieland (1981) y Chiang (1983), aunque ninguno de ellos es específico para productos lácteos. El primero de los métodos reseñados no es aplicable ya que los resultados obtenidos muestran que la furosina eluye con un tiempo de retención de aproximadamente 40 minutos y como un pico asimétrico, con mucha cola. Estos resultados estarían de acuerdo con las observaciones de Drexel y col. (1987) que indican una fuerte retención de furosina y proponen una modificación consistente en la adición de acetonitrilo como modificador orgánico para disminuir los tiempos de análisis (15-17 min).

El método de Chiang (1983) se realizó en las mismas condiciones descritas en la bibliografía, pero con el empleo de una columna C_{18} en vez de la C_8 propuesta. La furosina eluye en 11 minutos como un pico bastante ancho, obteniéndose un valor muy bajo de eficacia de 2500 platos teóricos.

Con el fin de mejorar los resultados obtenidos se ensayó un tercer método basado en los trabajos de Chang y col. (1985) y Van Boeckel y col. (1987) para la determinación por HPLC de par iónico de aminoácidos aromáticos y sus aminas correspondientes

en muestras de quesos. Se eligió como contraíón la sal sódica del ácido heptanosulfónico, y acetonitrilo como modificador orgánico, ensayándose para la optimización del método distintas concentraciones del contraíón y distintos porcentajes del modificador orgánico, según se indica en el apartado de materiales y métodos. Los resultados obtenidos son los que se indican en las figuras 17 y 18.

Como puede apreciarse una variación de 2 a 10 mM del contraíón no afecta a la retención de furosina, ya que el $\log K'$ apenas sufre modificación. Por el contrario el número de platos teóricos varía de forma significativa por debajo de la concentración de 5 mM, pero de 5 a 10 mM es prácticamente constante. Sin embargo, el porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil tiene una marcada influencia sobre los dos parámetros estudiados.

Un aumento en la concentración del modificador orgánico del 15 al 25% implica una disminución del $\log K'$ que se traduce en unos tiempos de análisis más cortos, aunque por encima del 20% este aumento supone una fuerte caída en el número de platos teóricos.

Los resultados obtenidos muestran que el eluyente óptimo es aquel que presenta una concentración 5 mM del contraíón y un 20% de acetonitrilo, eluyéndose la furosina en un tiempo de 10-10,5 minutos.

Comparando este método analítico con el de Chiang y col. (1983) se observa que aunque los tiempos de retención de furosina son semejantes, los valores de la eficacia son muy inferiores para este último (figura 19). Por todo ello se eligió como eluyente una solución de heptanosulfonato sódico 5 mM y acetonitrilo al 20%.

Eficacia (N)
 $\times 10^3$

Log K'

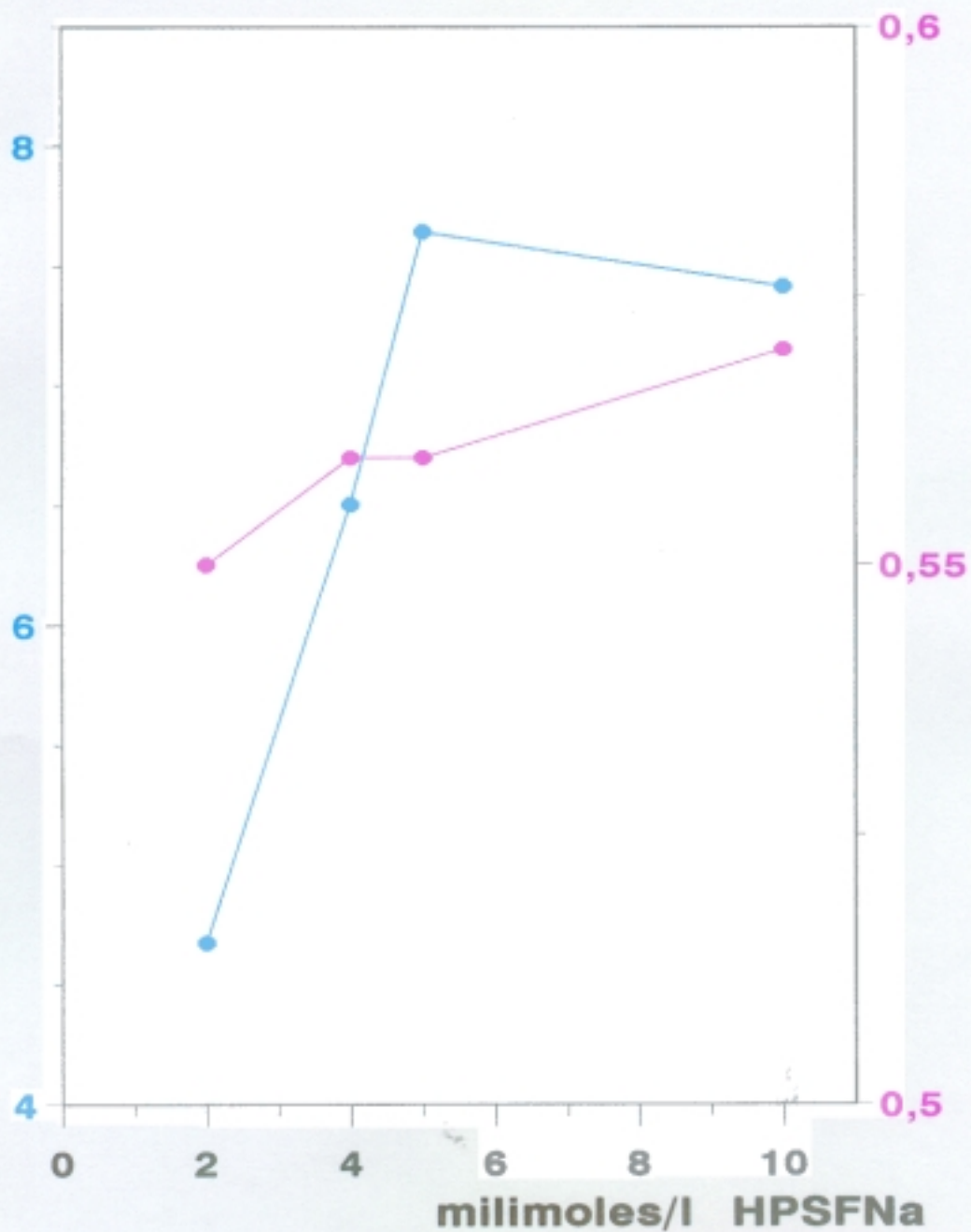


Figura 17. Variación del número de platos teóricos (N) y del logaritmo del factor de capacidad (log K') con la concentración de heptanosulfonato sódico (HPSFNa).

Eficacia (N)
 $\times 10^3$

Log K'

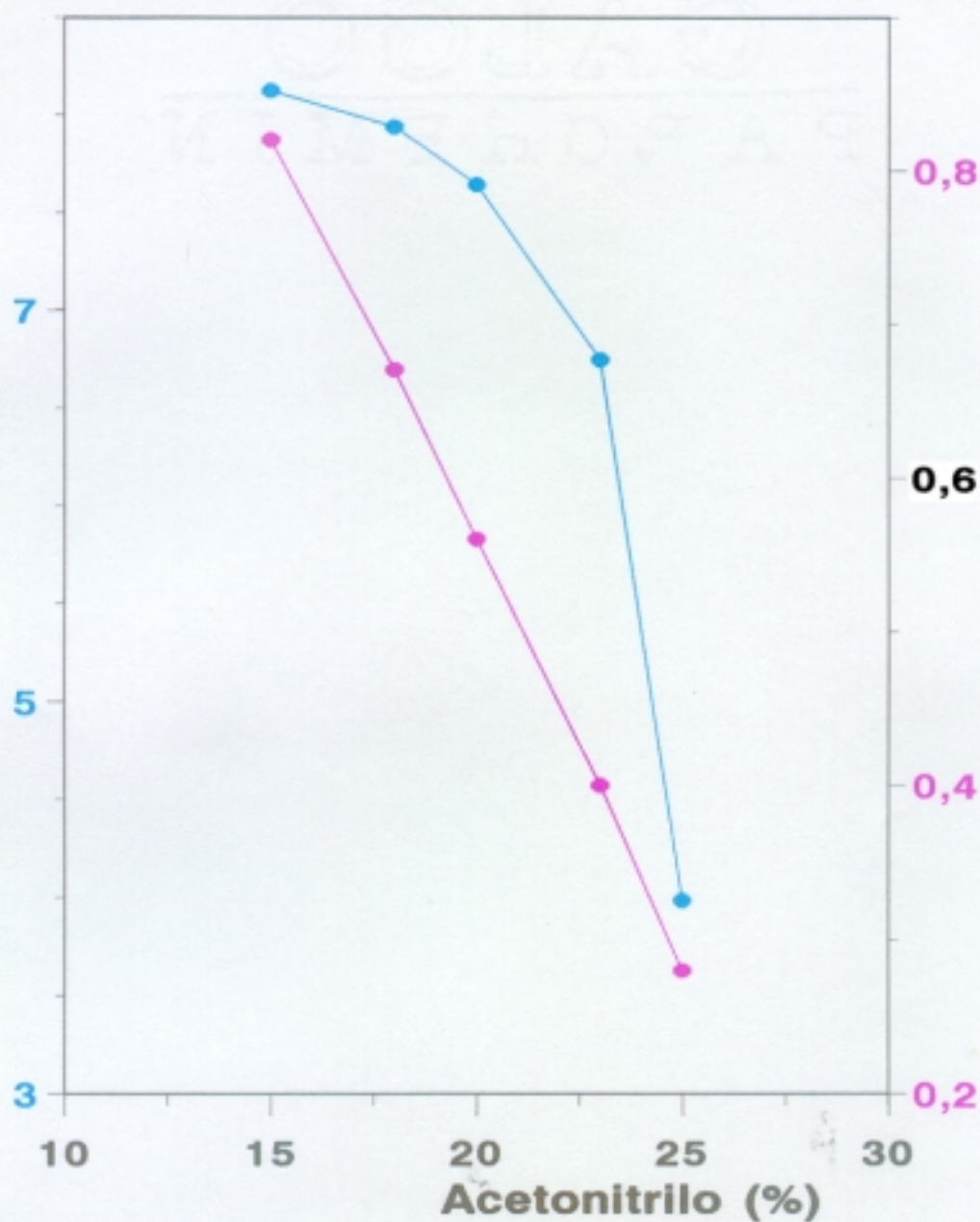


Figura 18. Variación del número de platos teóricos (N) y del logaritmo del factor de capacidad (log K') con el porcentaje de acetonitrilo.

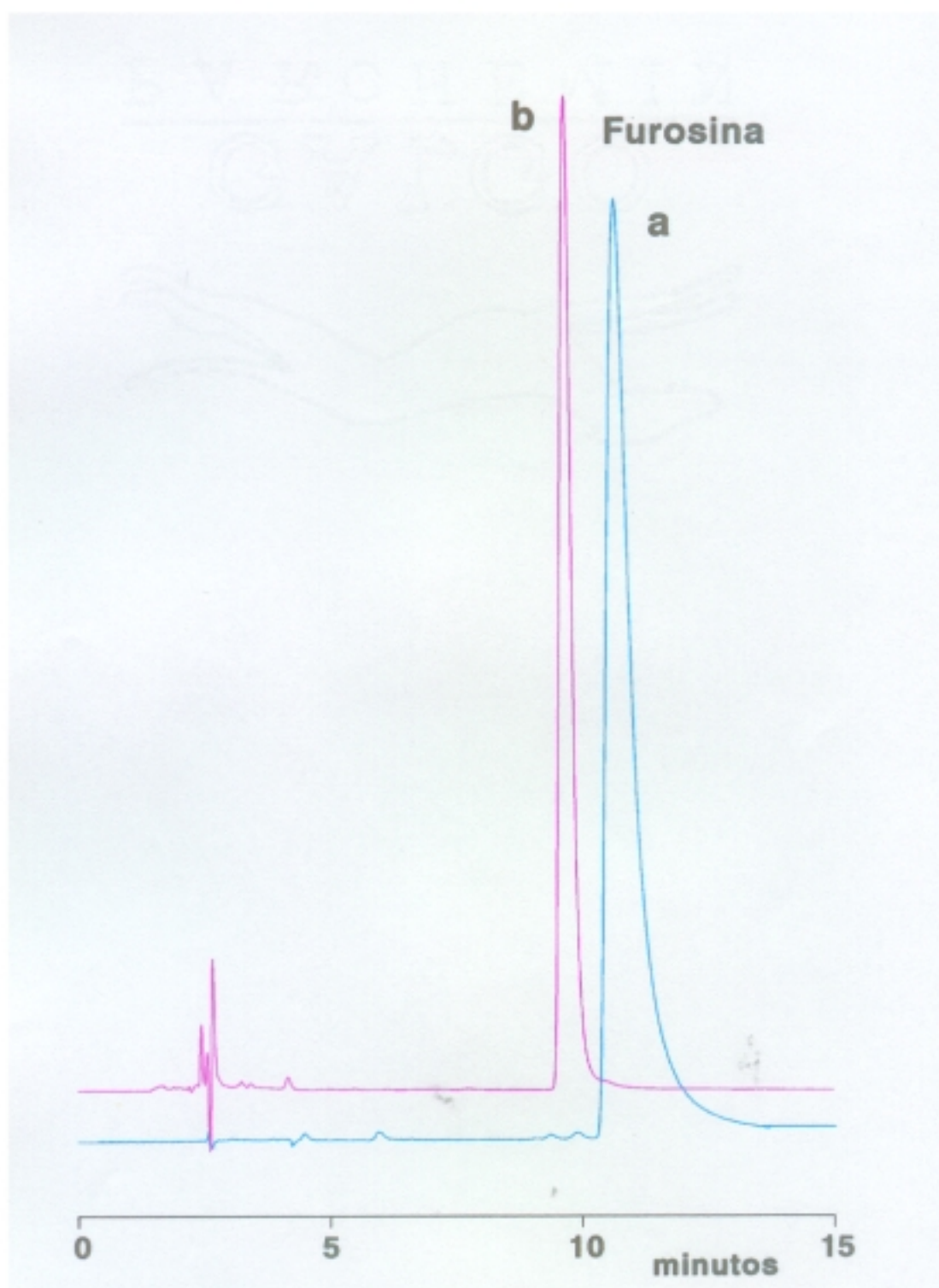


Figura 19. Comparación de los cromatogramas obtenidos para la furosina. **a.** método de Chiang (1983) **b.** método puesto a punto en el presente trabajo.

Los cromatogramas obtenidos de los hidrolizados ácidos de las muestras de leche presentan una serie de compuestos minoritarios en la zona de elución de furosina, interfiriendo en su cuantificación especialmente en el caso de leches UHT directo en las cuales el contenido en furosina es bajo. Basándonos en el trabajo de Resmini y col. (1990) se realizó una purificación por Sep-Pak de los hidrolizados obtenidos según se describe en el apartado de materiales y métodos, consiguiéndose así la eliminación de las interferencias (figura 20).

3.3.1. Análisis cuantitativo de furosina.

3.3.1.1. Linealidad de respuesta.

Los resultados obtenidos muestran que la respuesta de furosina es lineal en el rango de 0,004-1,6 µg. El cálculo de la regresión lineal conduce a la ecuación de la recta:

$$Y = 71,92 X - 0,1318446 (\pm 0,0024)$$

con un coeficiente de determinación de 0,99997 (figura 21). El límite de detección calculado como dos veces el error standard es de 0,0048 µg.

Debido a la complejidad del proceso de preparación de las muestras de leche para su análisis, se llevó a cabo el cálculo de la recta de calibrado añadiendo furosina al hidrolizado de leche cruda.

En la figura 22 se representan las cantidades de furosina correspondientes al volumen de hidrolizado inyectado frente a las absorbancias medidas en unidades de área. La ecuación de la recta obtenida

$$Y = 53,82 X + 0,0176125 (\pm 0,0008)$$

presenta una pendiente inferior a la obtenida utilizando

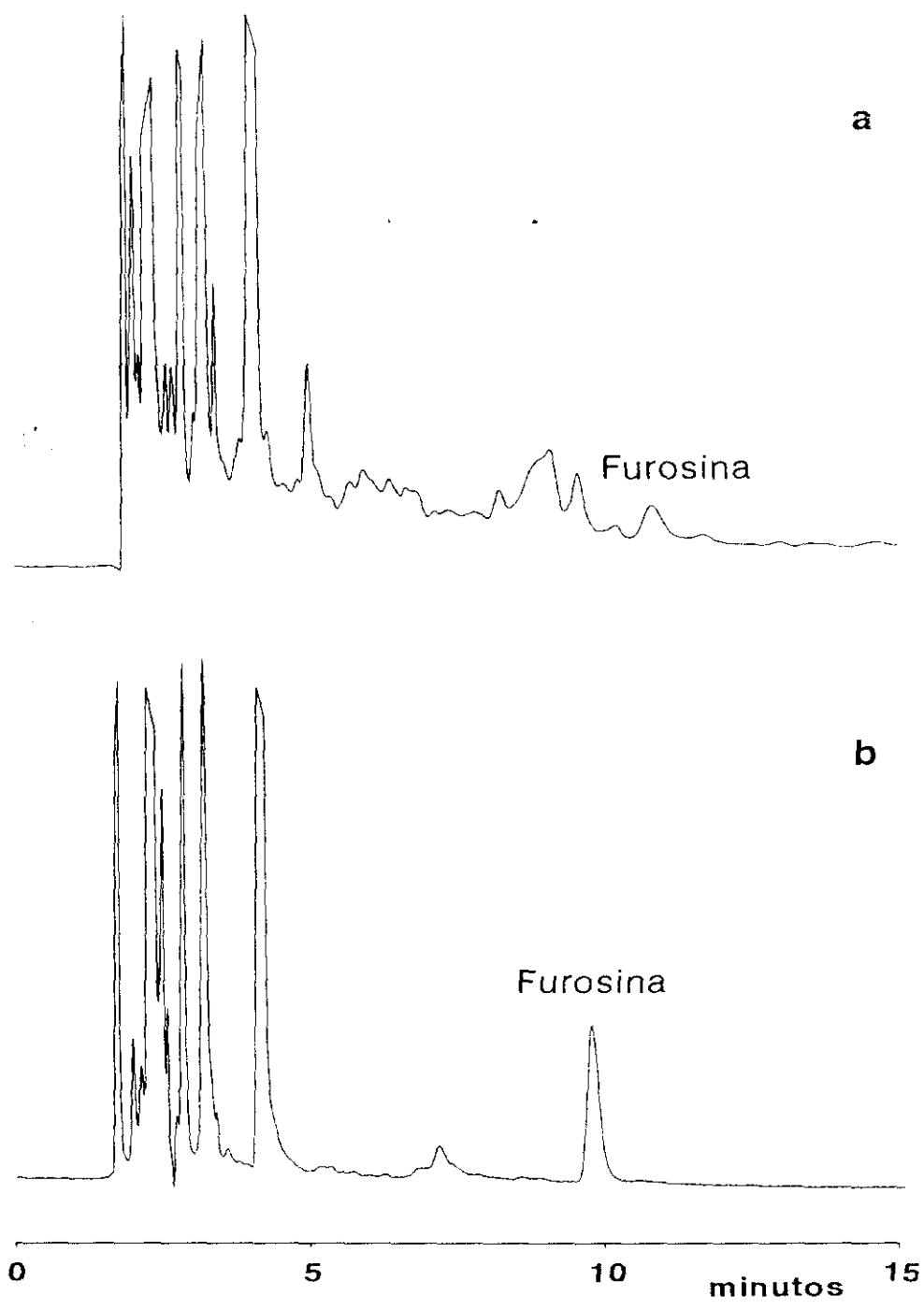


Figura 20. Cromatograma correspondiente a una muestra de leche. **a.** sin purificar **b.** purificada por Sep-Pak.

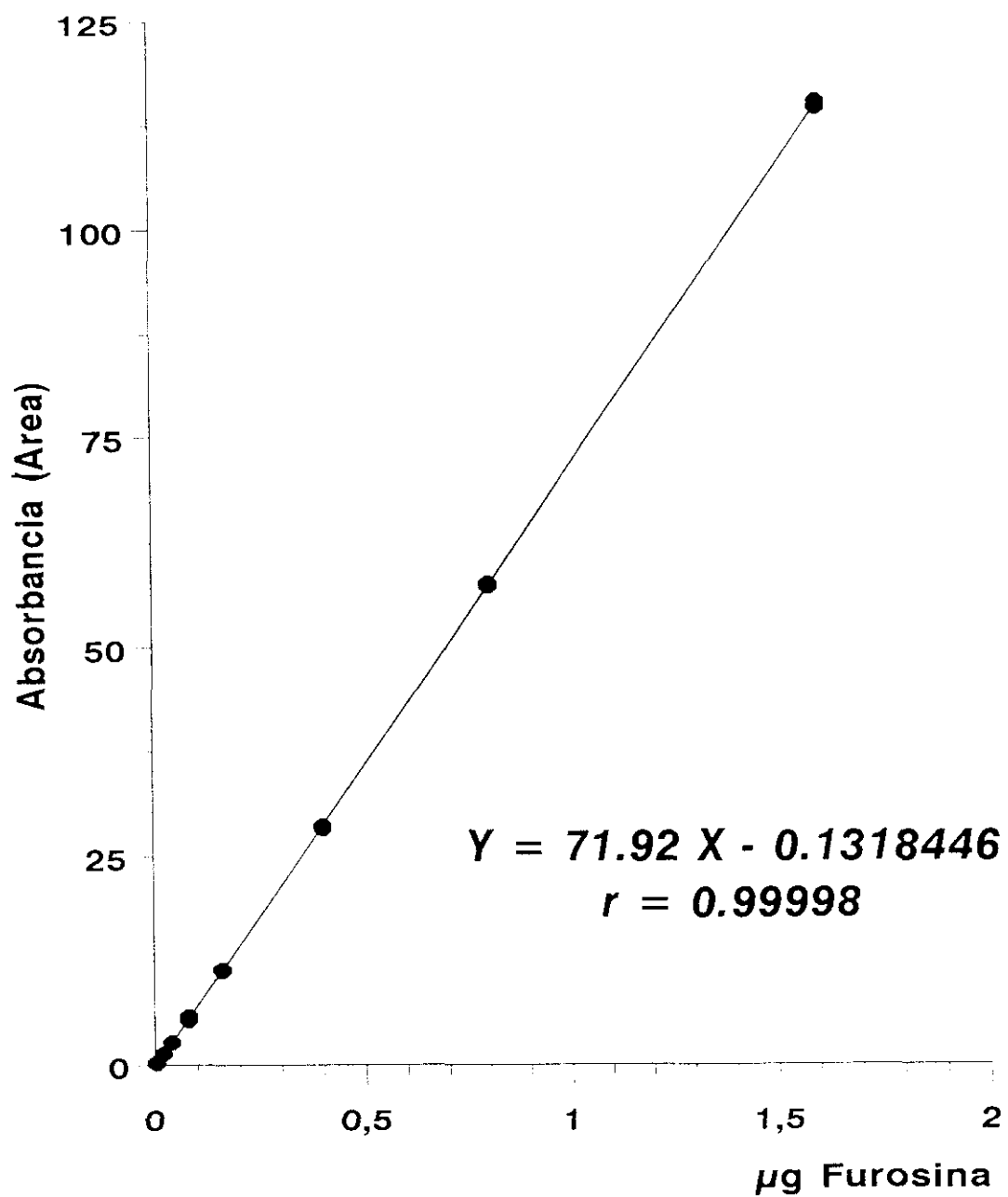


Figura 21. Ecuación de regresión de furosina patrón.

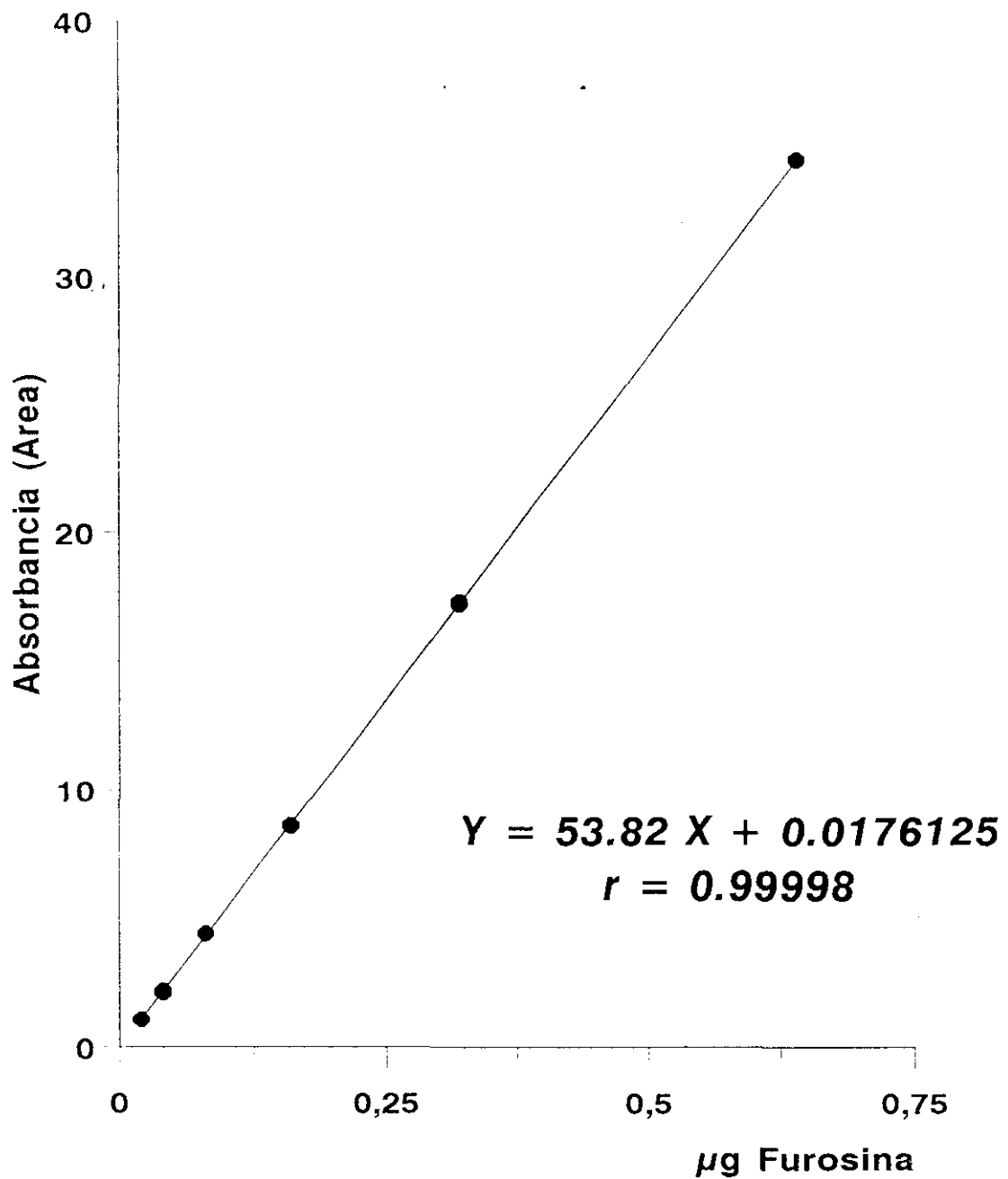


Figura 22. Ecuación de regresión de furosina añadida a un hidrolizado de leche cruda.

soluciones acuosas de furosina pura, lo que es indicativo de una pérdida durante el proceso de preparación de muestra (evaporación, filtrado y tratamiento con Sep-Pak). El coeficiente de determinación es de 0,99997, igual al obtenido para furosina patrón.

El uso de esta ecuación en la determinación de furosina en leches permite una correcta cuantificación al englobar las pérdidas producidas durante la preparación de las muestras de leche.

3.3.1.2. Precisión del método.

La precisión del método se estudió, inyectando en el mismo día siete replicados correspondientes a dos muestras de leche, una esterilizada y una UHT indirecto. También se ha hecho el estudio de repetibilidad día a día de dos muestras durante un período de siete días. Los resultados obtenidos se indican en la tabla VIII.

Tabla VIII. Ensayo de repetibilidad de dos muestras de leche dentro de un mismo día, y en análisis de una misma muestra durante siete días con intervalo de un día.

	Repetibilidad	
	7 replicados	día a día
Leche UHT indirecto		
\bar{X}	37.85	38.04
CV (%)	0.95	1.06
Leche esterilizada		
\bar{X}	72.16	72.40
CV (%)	0.68	2.10

Para completar el estudio de la precisión del método analítico, se han realizado siete hidrólisis de cada una de las muestras estudiadas. Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla IX.

Tabla IX. Repetibilidad del método, incluyendo todo el proceso analítico para tres muestras de leche con distinto tratamiento térmico.

Muestra	Furosina (mg/l) \bar{X}	CV (%)
Leche UHT directo	30.21	8.21
Leche UHT indirecto	39.44	4.37
Leche esterilizada	76.97	7.05

Los valores más altos del coeficiente de variación en la repetibilidad del método se deben a que se incluyen las variaciones correspondientes a los procesos de hidrólisis y preparación de las muestras.

3.3.1.3. Recuperación del método.

El cálculo de la recuperación del método analítico nos permite comprobar la validez de la recta de calibrado utilizada, y por tanto la fiabilidad del método en la determinación cuantitativa de furosina. La tabla X muestra los valores de furosina encontrados en leche a la que previamente se le había adicionado cantidades conocidas de furosina.

Tabla X. Estudio de recuperación de furosina sobre una muestra de leche UHT indirecto.

Muestra	Furosina (mg/l)		Recuperación (%)
	añadida	encontrada	
1	29.80	29.60	99.33
2	39.72	39.80	100.20
3	79.44	78.93	99.36
4	119.44	117.17	98.10
5	139.44	141.80	101.69

El valor medio del porcentaje de recuperación es de 99,53 con un coeficiente de variación del 2,76%. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

3.3.2. Análisis cuantitativo de piridosina.

La piridosina eluye a los 1,5 minutos. A este tiempo de retención aparecen multitud de compuestos en el cromatograma del hidrolizado de leche (figura 23) por lo que resulta imposible su cuantificación. Sin embargo, se determinó la respuesta de soluciones patrón de piridosina en el rango de 0,4-1,6 μg obteniéndose la siguiente ecuación de regresión

$$Y = 2,971 X - 0,0776 (\pm 0,0298)$$

con un coeficiente de determinación de 0,9987. El límite de detección, medido como dos veces el error standard es de 60 ng. Los resultados obtenidos indican que, para una misma cantidad inyectada, la respuesta de furosina es 25 veces superior a la de piridosina. Este hecho, unido a la menor formación de piridosina en la hidrólisis, explicaría su detección como trazas en

anteriores análisis por HPLC (Sleicher y Wieland, 1981; Resmini y col., 1990), frente a los elevados valores obtenidos con otros métodos analíticos (Finot y Mauron, 1972; Büser y Erbersdobler, 1985).

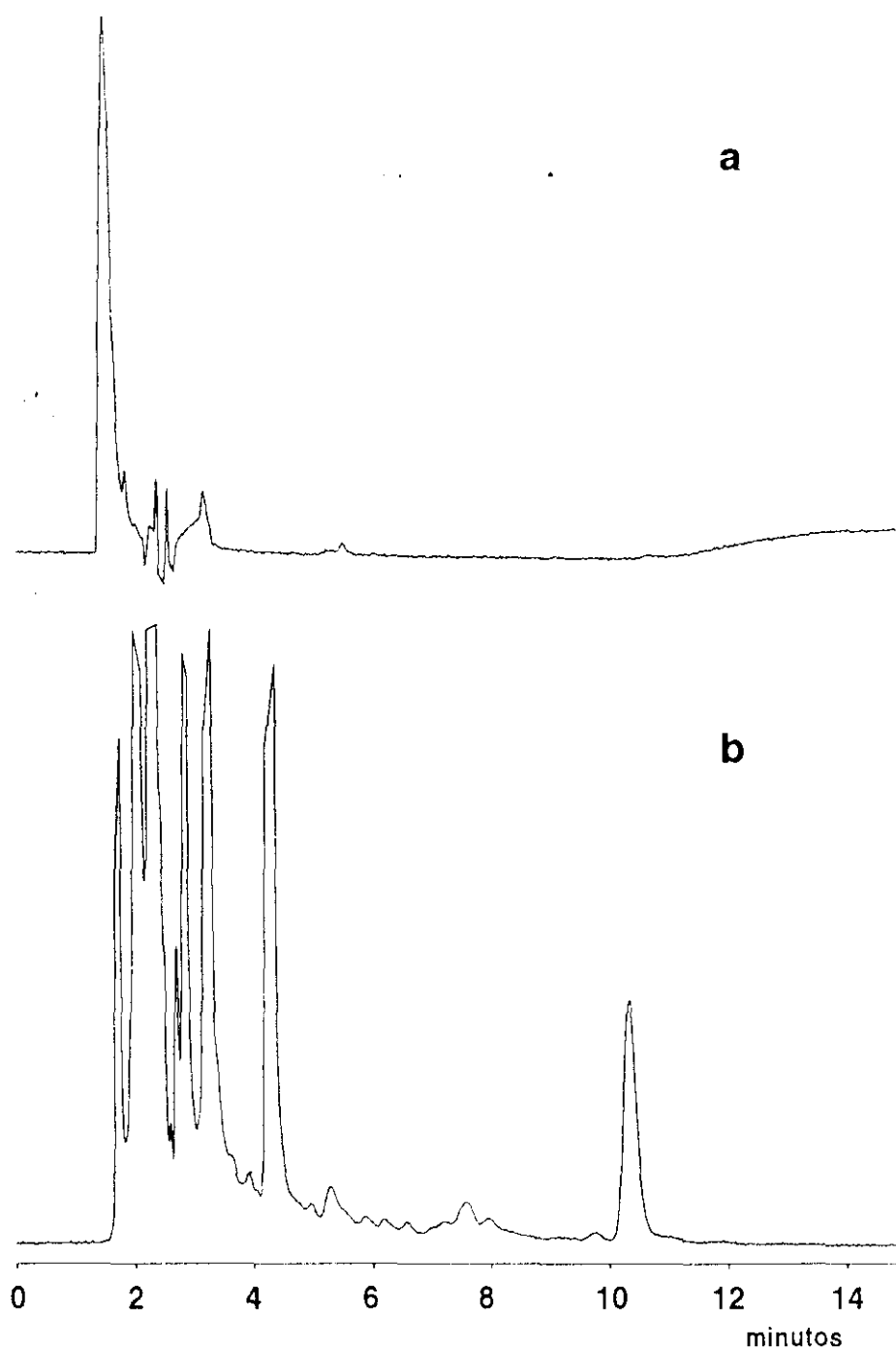


Figura 23. Cromatogramas obtenidos en el análisis de **a.** piridosina sintetizada. **b.** un hidrolizado de leche.

3.3.3. Cálculo del contenido en lactulosil-lisina, a partir de la determinación de furosina.

Con el objeto de calcular el rendimiento de furosina en la hidrólisis con HCl 6 N de la lactulosil-lisina presente en las muestras de leche, se realizaron varias hidrólisis de fructosil-lisina añadida a una leche cruda, así como del patrón sintetizado. Se utilizó fructosil-lisina en las hidrólisis ya que según los resultados de Finot y col. (1975) el rendimiento de furosina es igual para los dos compuestos de Amadori.

Dicho rendimiento resultó ser del 34,5% con un coeficiente de variación de 7,3% para doce hidrólisis realizadas en el rango 1-5 mg/100 ml de leche. Por tanto los moles de lactulosil-lisina presentes en leche corresponden a 2,9 moles de furosina determinada.

El factor de conversión encontrado en este estudio resultó estar comprendido entre los obtenidos por Finot y col. (1981) y Erbersdobler y col. (1989) que fueron de 3,1 y 2,5 respectivamente.

3.4. HPLC DE PROTEINAS DE SUERO NO DESNATURALIZADAS.

3.4.1. Análisis cuantitativo de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina.

El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón externo, calculando la ecuación de la recta correspondiente para cada proteína. En la figura 24 se muestra un cromatograma correspondiente al análisis por HPLC de una leche cruda.

La recta de regresión obtenida para la α -lactoalbúmina (figura 25) se ajusta a la ecuación $Y = 48,36 X + 1,5366$ con un coeficiente de correlación $r = 0,9997$.

La β -lactoglobulina se cuantificó como un solo componente, sumando las áreas correspondientes a la β -lactoglobulina A y B. La recta de regresión para esta proteína (figura 26) se ajusta a la ecuación $Y = 31,209 X + 2,0825$, con un coeficiente de correlación $r = 0,9993$.

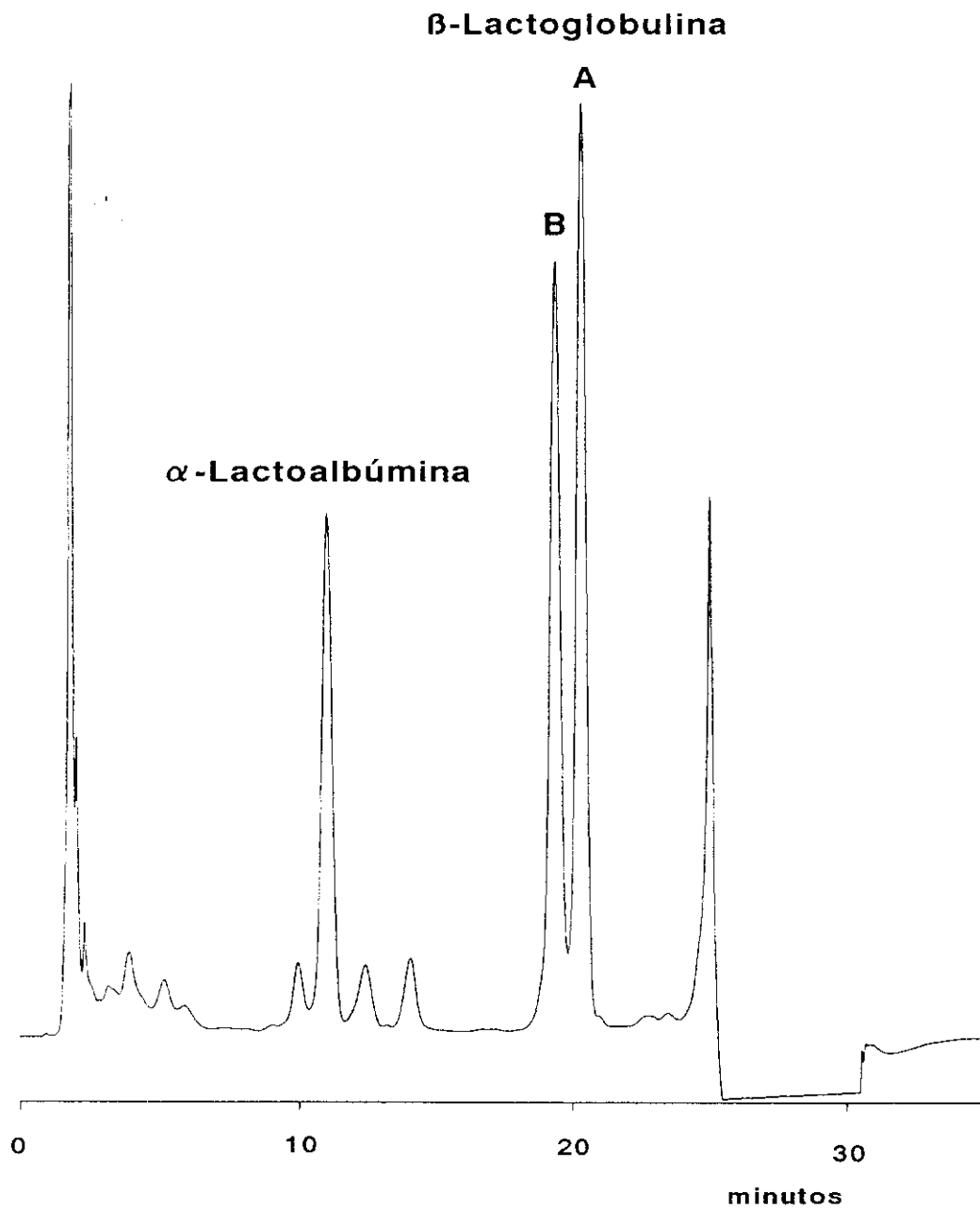


Figura 24. Cromatograma correspondiente al análisis por HPLC de seroproteínas de una muestra de leche cruda.

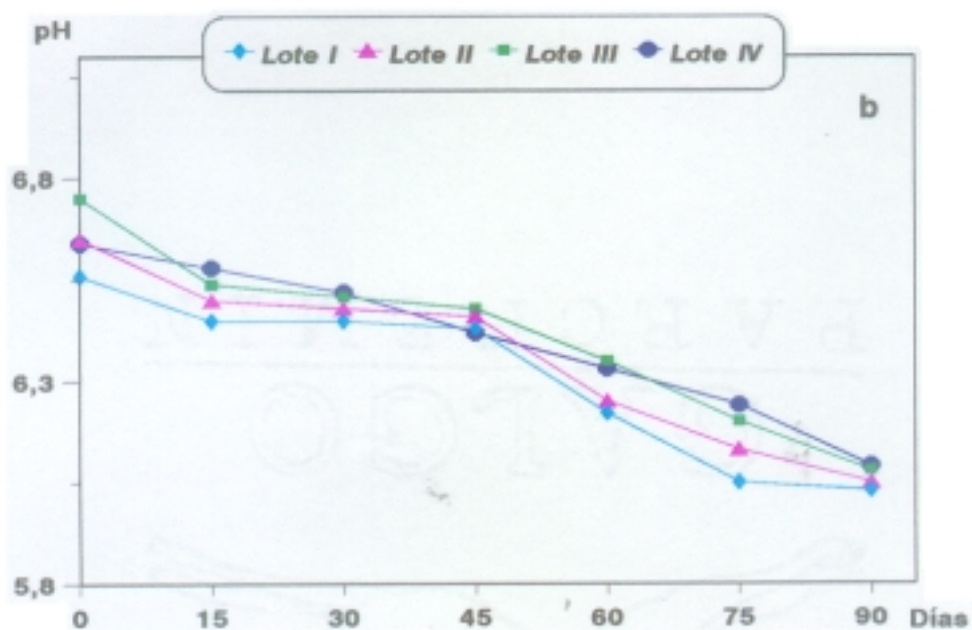
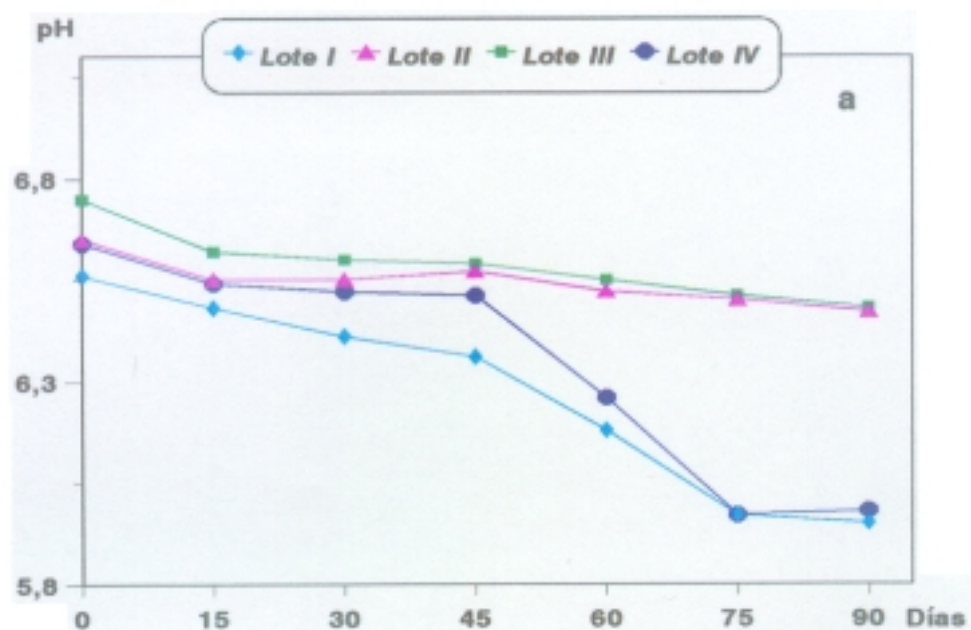


Figura 28. Variación del pH durante la conservación de leche UHT a las temperaturas de a. 40°C y b. 50°C.

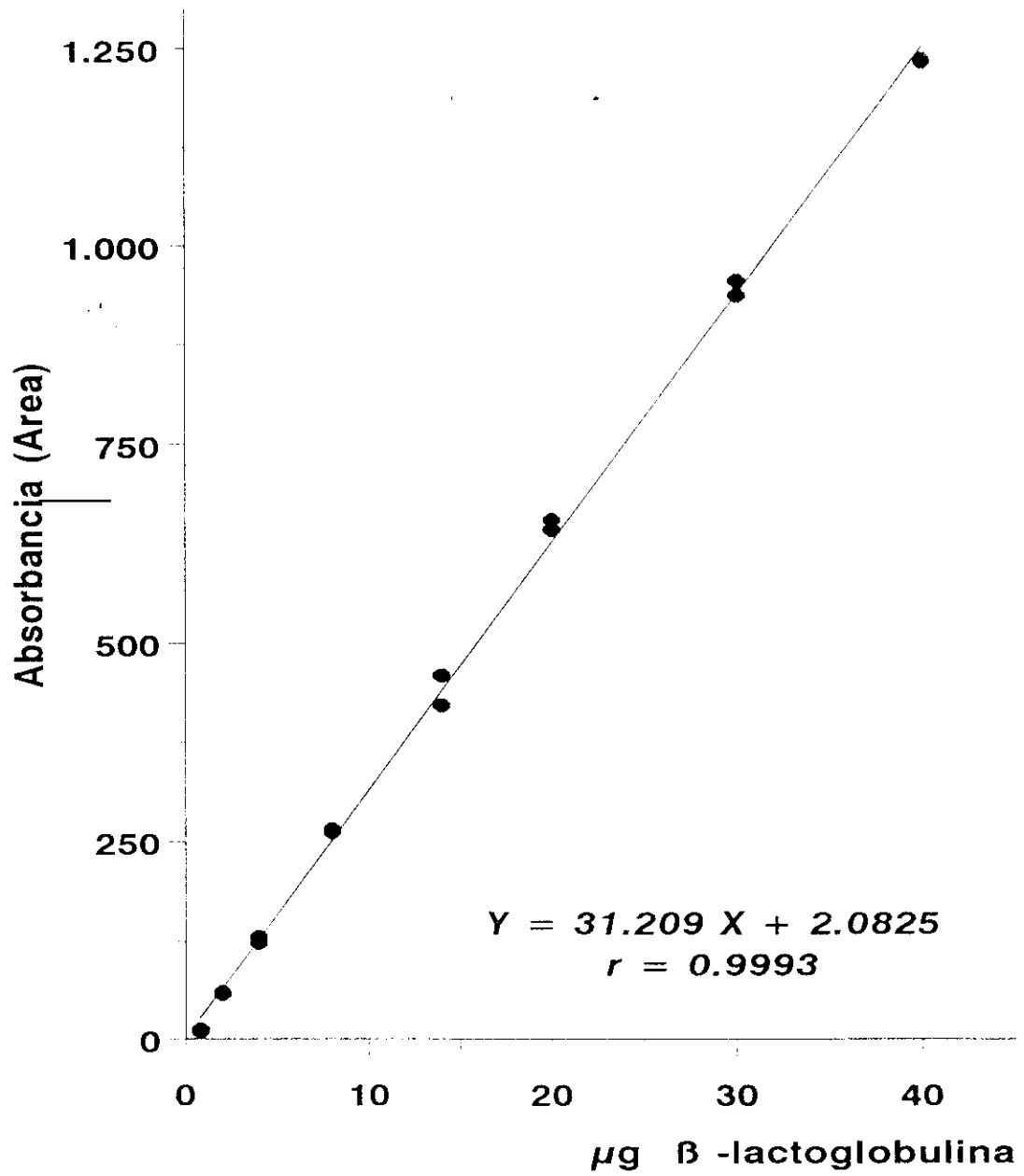


Figura 26. Ecuación de regresión de β -lactoglobulina.

3.5. MODIFICACIONES DURANTE EL ALMACENAMIENTO DE LECHEs UHT.

Los valores obtenidos de furosina, lactulosa, proteínas de suero no desnaturalizadas y pH durante la conservación de leches UHT, son los indicados en las tablas XI-XIV del apéndice de tablas, correspondiendo la representación gráfica de dichos parámetros a las figuras 27-35.

3.5.1. pH.

Durante el almacenamiento el pH disminuye fundamentalmente como consecuencia de la reacción de Maillard, así como por la degradación de los carbohidratos (figuras 27 y 28). El pH de los controles presenta valores de 6.56, 6.65, 6.75 y 6.64 para los lotes I, II, III y IV respectivamente, correspondiendo el pH más bajo a la leche con un mayor tratamiento térmico y viceversa.

El almacenamiento a 20°C no origina variaciones significativas del pH en ninguno de los lotes estudiados. A 30°C las variaciones del pH son mínimas, correspondiendo los descensos más acusados al almacenamiento a 40 y 50°C. Para los lotes I y IV la mayor caída del pH tiene lugar a 40°C y 75 días de almacenamiento con valores en ambos casos de 5,97, manteniéndose constante hasta los 90 días. A 50°C la disminución del pH correspondiente a los lotes I y IV es semejante a la producida a 40°C, sin embargo en los lotes II y III esta disminución es comparativamente superior, observándose los descensos más acusados a partir de los 45 días de almacenamiento.

3.5.2. Furosina.

Los contenidos iniciales de furosina en los cuatro lotes estudiados reflejan la severidad del tratamiento térmico aplicado. Así las leches I y II (UHT indirecto) presentaban unos valores de 53,49 y 39,05 mg/l, superiores a los obtenidos para las III y IV (UHT directo) que fueron de 15,69 y 17,81 mg/l respectivamente. Estas diferencias se deben fundamentalmente al

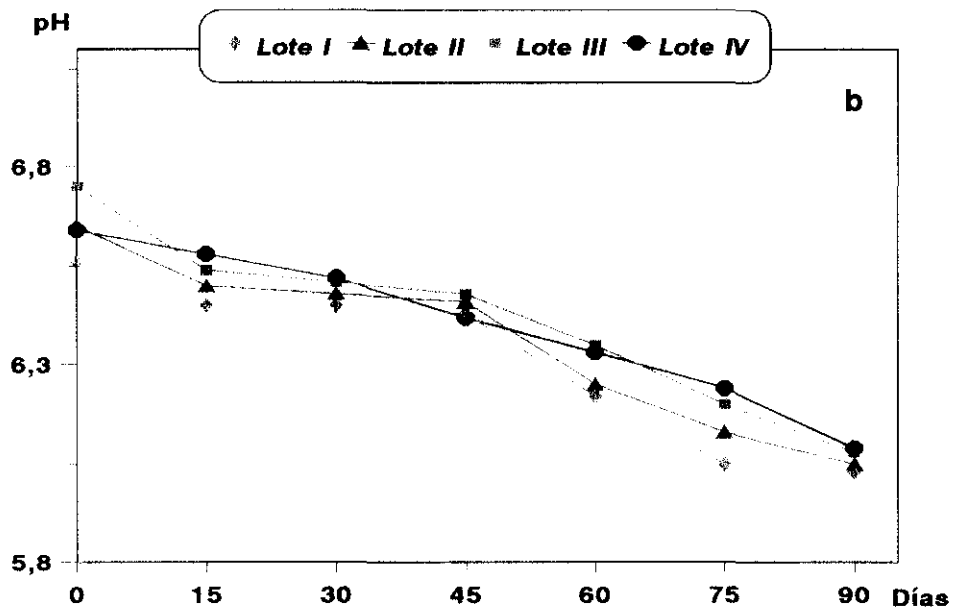
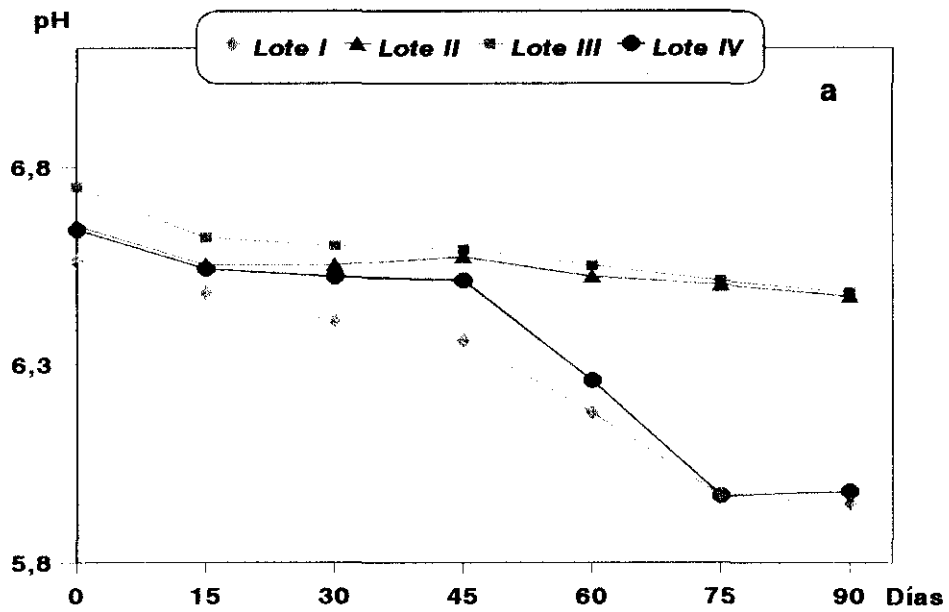


Figura 28. Variación del pH durante la conservación de leche UHT a las temperaturas de a. 40°C y b. 50°C.

tipo de equipo utilizado ya que en el caso del UHT indirecto, se necesita un mayor tiempo de tratamiento térmico hasta alcanzar la temperatura de proceso (ver apartado 1.2.3.2. de la introducción).

Para todos los lotes estudiados se observa un aumento de la furosina con la temperatura y el tiempo de almacenamiento (figuras 29-32). De los cuatro lotes estudiados, es el I el que presenta un comportamiento diferente del resto, para las cuatro temperaturas ensayadas, con unos aumentos de furosina inferiores a los experimentados por los demás. El hecho de que este lote sea el de pH más bajo (6,56) podría tener un efecto inhibitor de la reacción de Maillard, y en especial para las temperaturas de almacenamiento más bajas (20 y 30°C). En el lote I también se observa que las diferencias entre el almacenamiento a 40 y 50°C son muy pequeñas. Teniendo en cuenta que se trata del lote que había sido sometido a un tratamiento térmico más energético, los productos de degradación de lactosa derivados de la reacción de Lobry de Bruin-Alberda van Ekenstein están presentes en concentraciones mayores que en el resto de los lotes, y pueden competir con la lactosa en la reacción de Maillard debido a la alta reactividad de dichos productos frente a grupos amino libre.

Para los lotes II, III y IV el aumento de furosina tras un periodo de 90 días de almacenamiento a 20°C es semejante (12,32; 15,81 y 10 mg/l respectivamente). Sin embargo, y para este mismo tiempo de almacenamiento (90 días) a temperaturas superiores, los aumentos de furosina resultaron ser distintos para cada lote. La menor concentración de furosina encontrada en el lote IV a 30 y 40°C (50,69 y 102,08 mg/l respectivamente) comparada con la alcanzada en los lotes II (74,27 y 123,34 mg/l) y III (66,86 y 117,35 mg/l) podría deberse al mayor grado de proteólisis detectado en el lote IV para estas temperaturas (López-Fandiño, 1991). La intervención en la reacción de Maillard de otros aminoácidos originados durante la proteólisis competirían con la lisina, obteniéndose así unos niveles de furosina inferiores a los esperados. A 50°C de temperatura, los contenidos en furosina

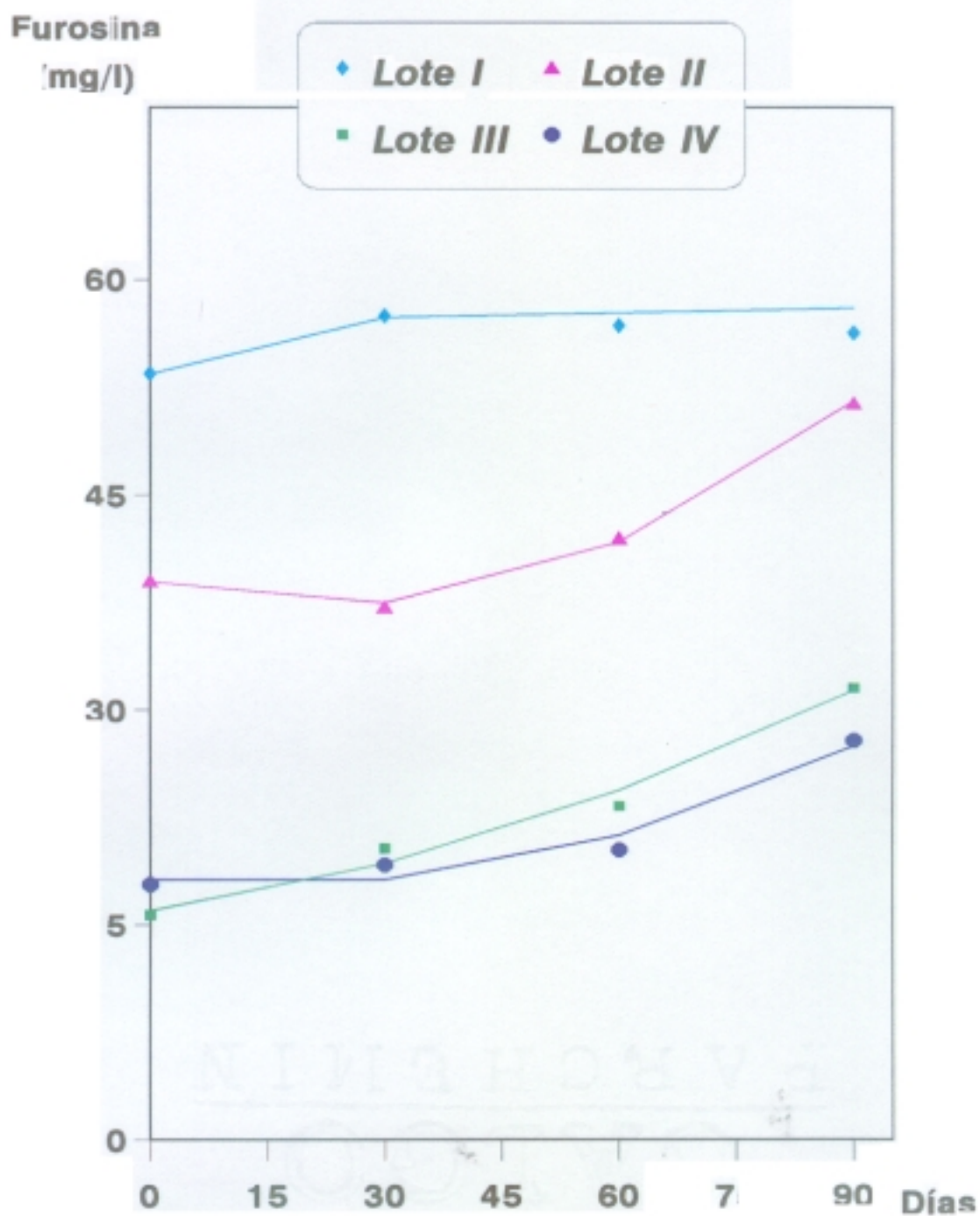


Figura 29. Formación de furosina en leche UHT durante la conservación a 20°C.

Furosina
(mg/l)

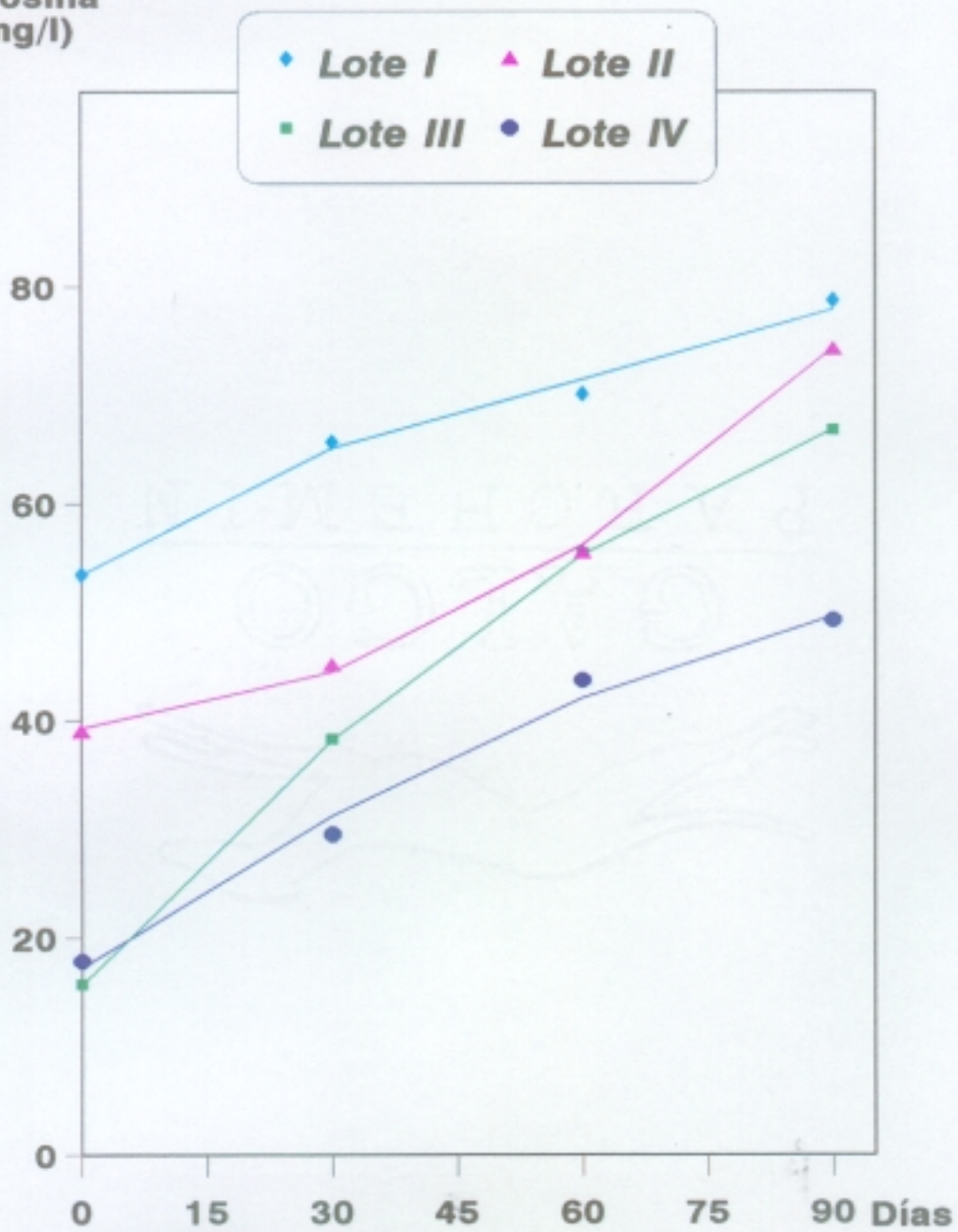


Figura 30. Formación de furosina en leche UHT durante la conservación a 30°C.

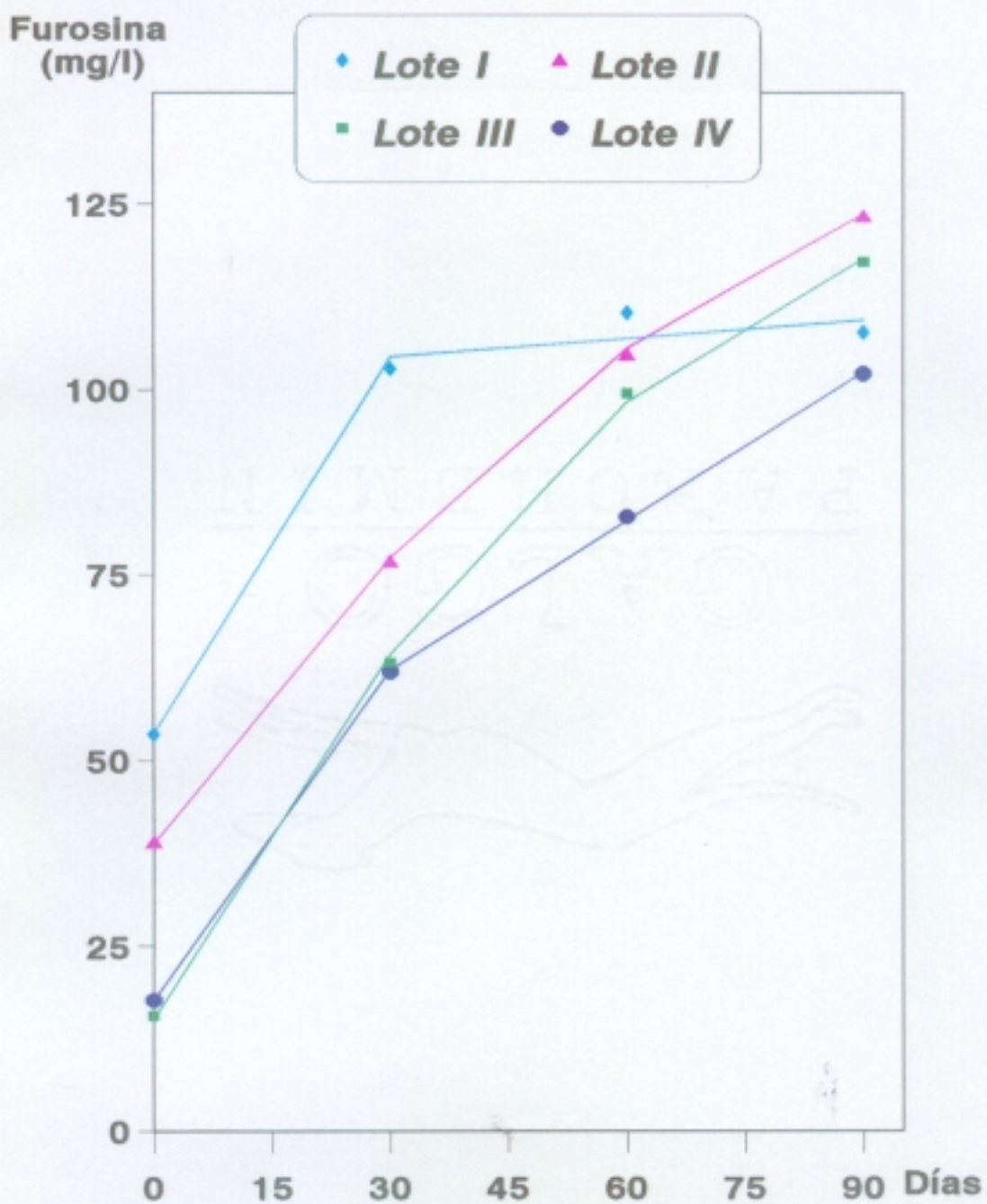


Figura 31. Formación de furosina en leche UHT durante la conservación a 40°C.

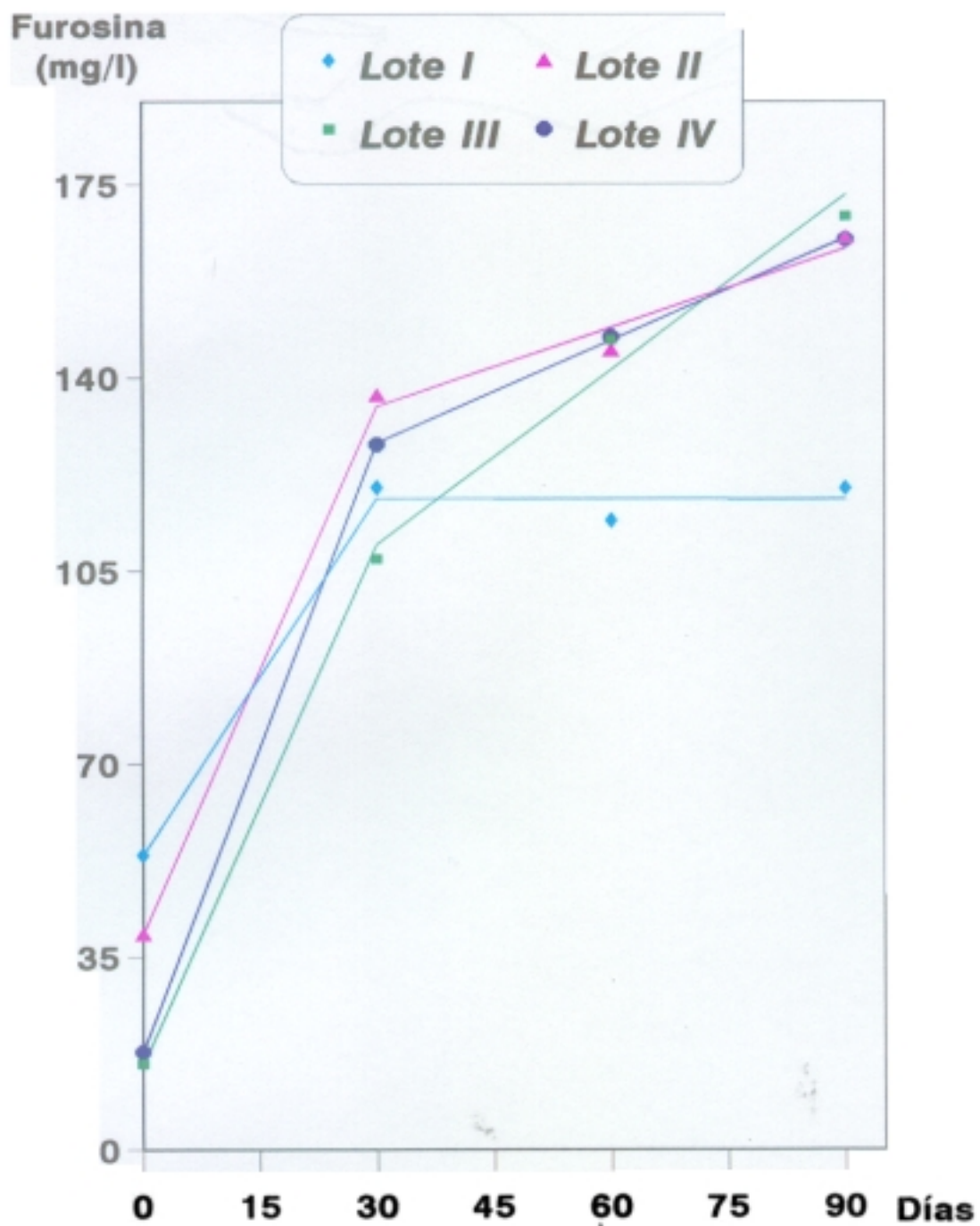


Figura 32. Formación de furosina en leche UHT durante la conservación a 50°C.

tienden a igualarse con el almacenamiento para los tres lotes antes mencionados con valores de 165,39 para el lote II, 169,23 para el III y 164,95 para el IV. A esta temperatura el lote IV se asemeja a los otros dos, ya que la actividad enzimática de las proteasas bacterianas pudiera estar inhibida a temperaturas tan elevadas (Kocak y Zadow, 1985; Manji y col., 1986).

Los resultados obtenidos muestran que la formación de furosina durante el almacenamiento depende de la calidad microbiológica de la leche de partida, así como de la severidad del tratamiento térmico aplicado. Estas observaciones no coinciden con la sugerencia de Nangpal y col. (1990) según los cuales la furosina formada durante el almacenamiento dependería exclusivamente de la temperatura y el tiempo de conservación. Los resultados encontrados por dichos autores se deben probablemente a que todos los lotes estudiados provienen de leche de igual calidad higiénica y con tratamientos térmicos más similares entre sí que los ensayados en el presente estudio.

3.5.3. Lactulosa.

Los contenidos iniciales de lactulosa son de 62,42 y 40,92 mg/100 ml para los lotes I y II (UHT indirecto), y de 19,44 y 16,96 mg/100 ml para los lotes III y IV (UHT directo), indicativos al igual que los de furosina de la severidad del tratamiento térmico.

En las figuras 33, 34 y 35 se representa la evolución de lactulosa durante el almacenamiento a 30, 40 y 50°C de temperatura. Los valores correspondientes al almacenamiento a 20°C resultaron ser semejantes a los de la leche recién procesada, confirmándose, según indican diferentes autores, que la lactulosa se mantiene prácticamente constante con el almacenamiento a temperatura ambiente (Andrews, 1984; Corzo y col. 1988).

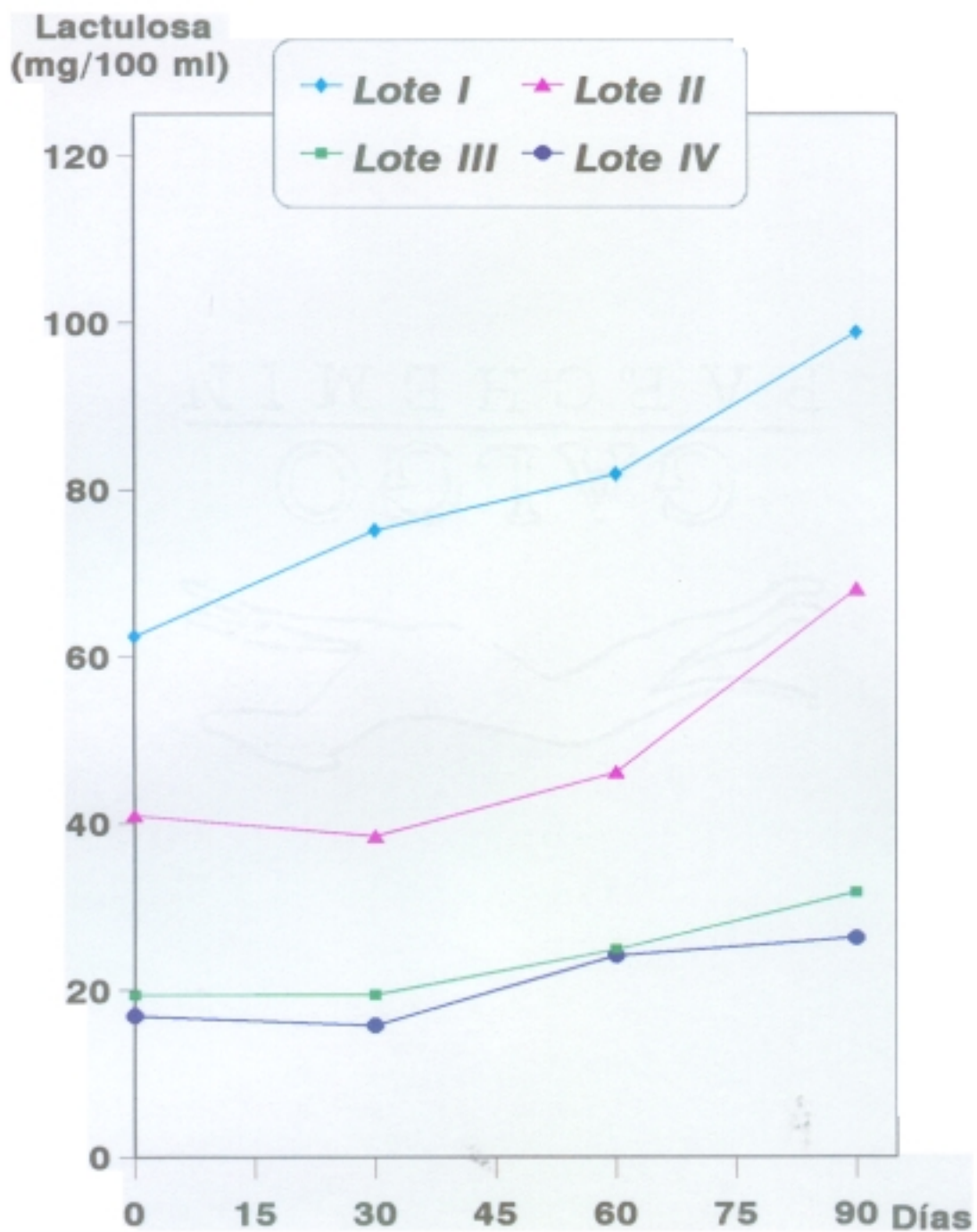


Figura 33. Formación de lactulosa en leche UHT durante la conservación a 30°C.

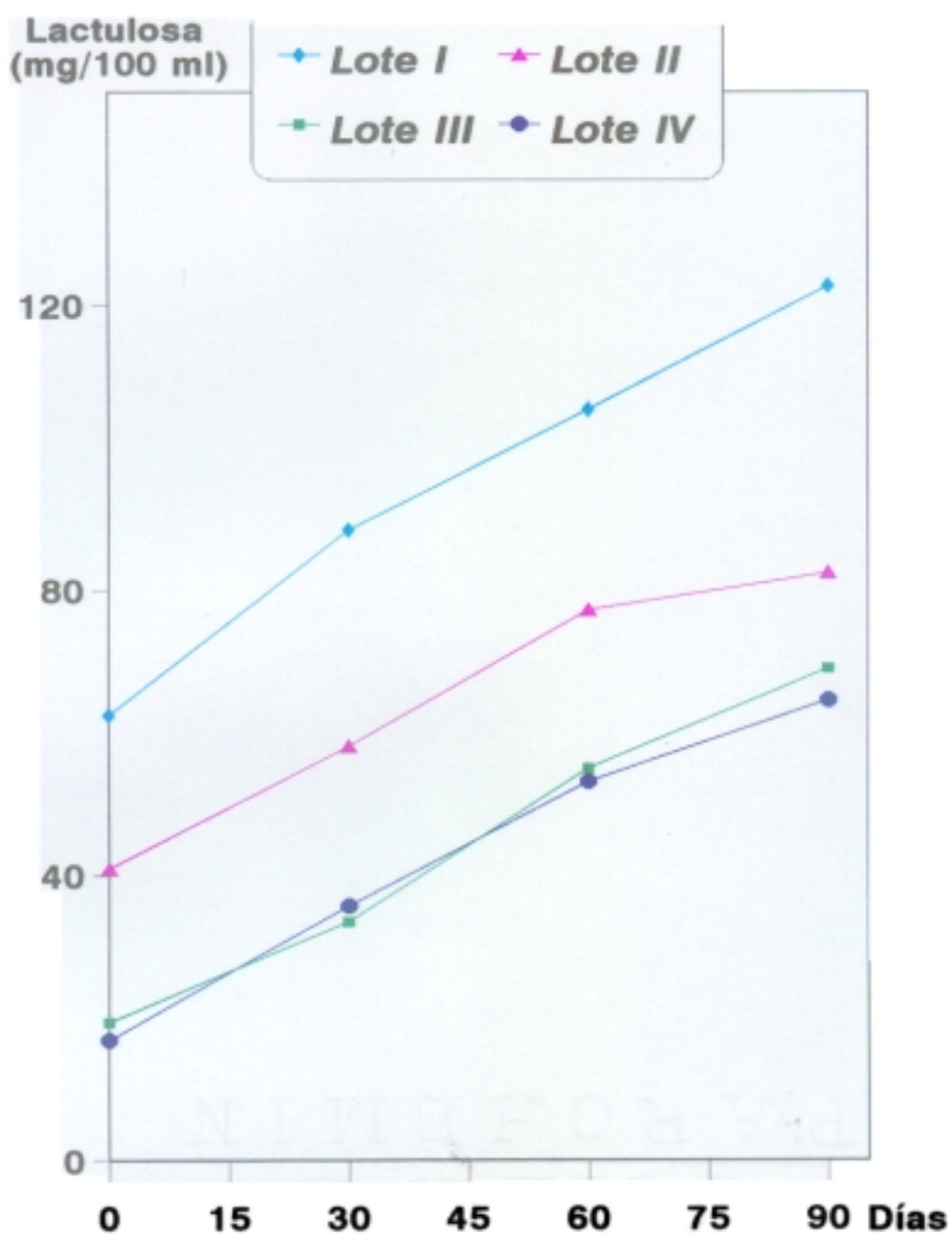


Figura 34. Formación de lactulosa en leche UHT durante la conservación a 40°C.

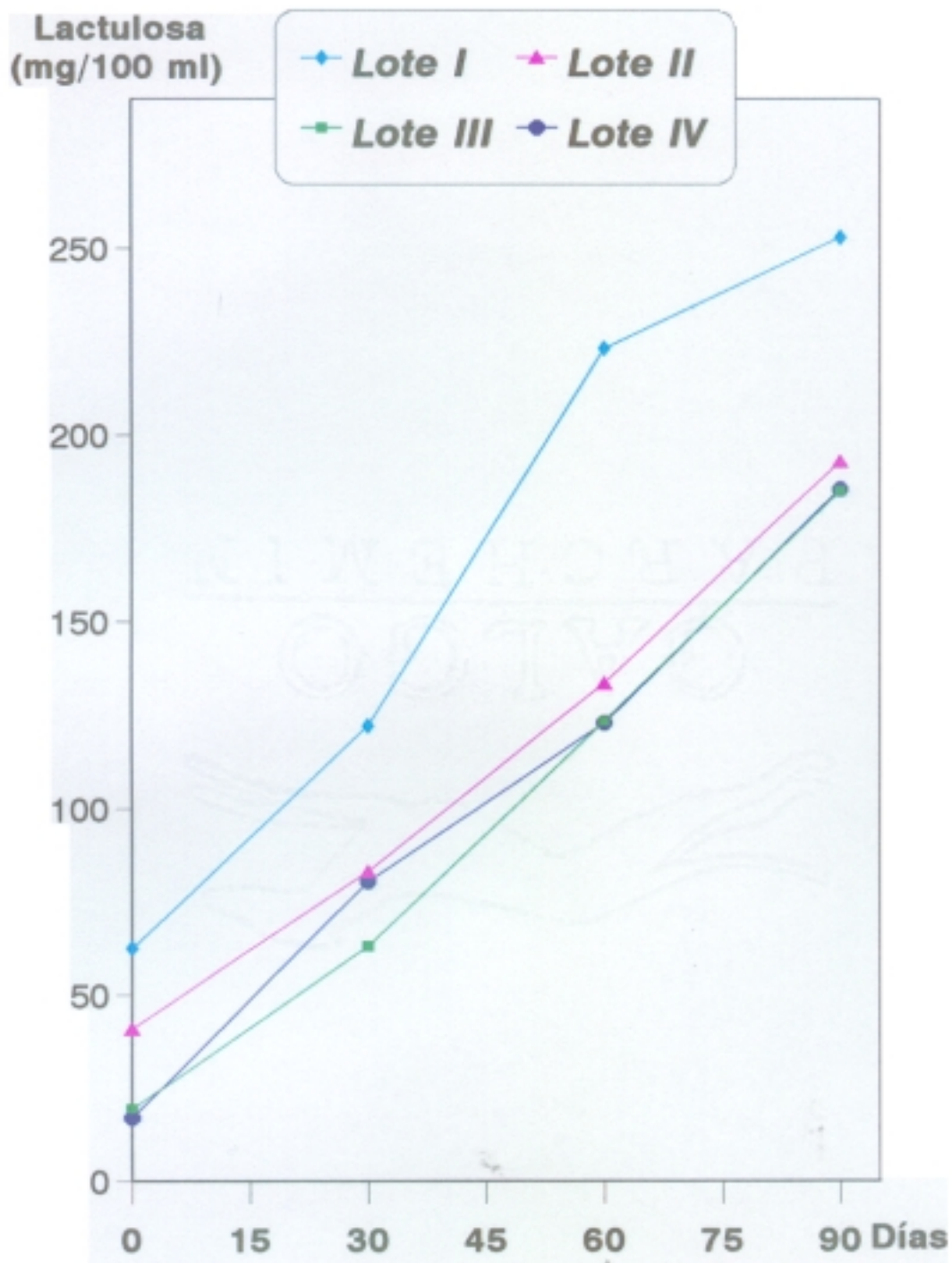


Figura 35. Formación de lactulosa en leche UHT durante la conservación a 50°C.

La formación de lactulosa durante el almacenamiento depende fundamentalmente de la temperatura, observándose que esta es máxima, y para todos los lotes estudiados, en el caso de los 50°C. De los cuatro lotes, es el I el que presenta un mayor aumento de lactulosa para las tres temperaturas ensayadas, mientras que en los lotes II, III y IV hay una mayor semejanza en la formación de lactulosa durante la conservación. En el lote II, la lactulosa formada durante el almacenamiento a 30°C (27,11 mg/100 ml) presenta valores semejantes al lote I (36,39 mg/100 ml), y en el lote IV (9,28 mg/100 ml) son prácticamente iguales a los obtenidos para el lote III (12,29 mg/100 ml). Estos resultados confirman los obtenidos por Andrews (1987) quién indica que a mayores contenidos iniciales de lactulosa se produce un mayor aumento durante la conservación.

En el almacenamiento a 40°C la lactulosa formada presenta valores parecidos para las cuatro muestras ensayadas, de 60,26; 41,48; 49,58 y 47,59 mg/100 ml para los lotes I, II, III y IV respectivamente, con unos valores ligeramente superiores para el lote I. A 50°C hay un comportamiento semejante correspondiendo el mayor aumento a la muestra I (190,06 mg/100ml) y el más bajo al lote II (151,94 mg/100 ml) con valores intermedios para los lotes III y IV (165,43 y 168,38 mg/100ml). Al igual que para la furosina, los contenidos finales de lactulosa durante la conservación a 40 y 50°C tienden a alcanzar valores semejantes para los lotes II, III y IV tras un periodo de 90 días. Las observaciones de Nangpal y col. (1990) indican que la formación de lactulosa durante la conservación solo depende del tiempo y la temperatura, y no del tipo de muestra. Sin embargo los resultados obtenidos en el presente trabajo parecen contradecir dicha sugerencia.

La evolución de lactulosa puede considerarse lineal con el tiempo de almacenamiento para todos los lotes estudiados, aunque la mayor formación se produce siempre a partir de los 30 días.

3.5.4. Seroproteínas no desnaturalizadas.

Se han determinado los contenidos en α -lactoalbúmina (α -Lac) y β -lactoglobulina (β -Lg) por HPLC de los cuatro lotes de leche. Los controles presentaron unas concentraciones para los lotes I, II, III y IV de 9,54, 25,28, 56,94 y 53,47 mg/100 ml de α -Lac, y 3,46, 11,15, 39,56 y 34,80 mg/100 ml de β -Lg. Como puede apreciarse el lote I presenta una mínima cantidad de seroproteínas no desnaturalizadas, indicando un fuerte calentamiento en el procesado de la muestra. En la figura 36 se representan los cromatogramas correspondientes al análisis de la muestra control de los lotes II y III.

Estos contenidos iniciales se mantienen durante el almacenamiento a 20, 30 y 40°C, disminuyendo solamente cuando la temperatura es de 50°C. Sin embargo a 20, 30 y 40°C se observa en los cromatogramas (figura 37) la aparición de nuevos compuestos que eluyen en la zona de la β -Lg y la α -Lac, y que aumentan con el tiempo y la temperatura de almacenamiento alterando la forma de los picos correspondientes a las dos seroproteínas mayoritarias. Estos compuestos podrían proceder de la interacción entre la lactosa y las proteínas de suero en estados avanzados de la reacción de Maillard. Esta hipótesis ya fué establecida por Andrews y Cheeseman (1972), en estudios basados en el análisis electroforético de proteínas. López-Fandiño (1991) en el estudio electroforético de estas mismas muestras. Se observó que las bandas correspondientes a α -Lac y β -Lg perdían resolución progresivamente con el almacenamiento a 30 y 40°C, debido probablemente a que la interacción originada durante el almacenamiento da lugar a compuestos con menor movilidad electroforética. Posiblemente dichos compuestos eluyen en HPLC con las seroproteínas, y por tanto la cuantificación de las áreas como medida del contenido de dichas proteínas se ve afectada por la presencia de los nuevos componentes. No obstante el análisis por HPLC permite detectar la alteración de las seroproteínas atendiendo a la forma de los picos cromatográficos.

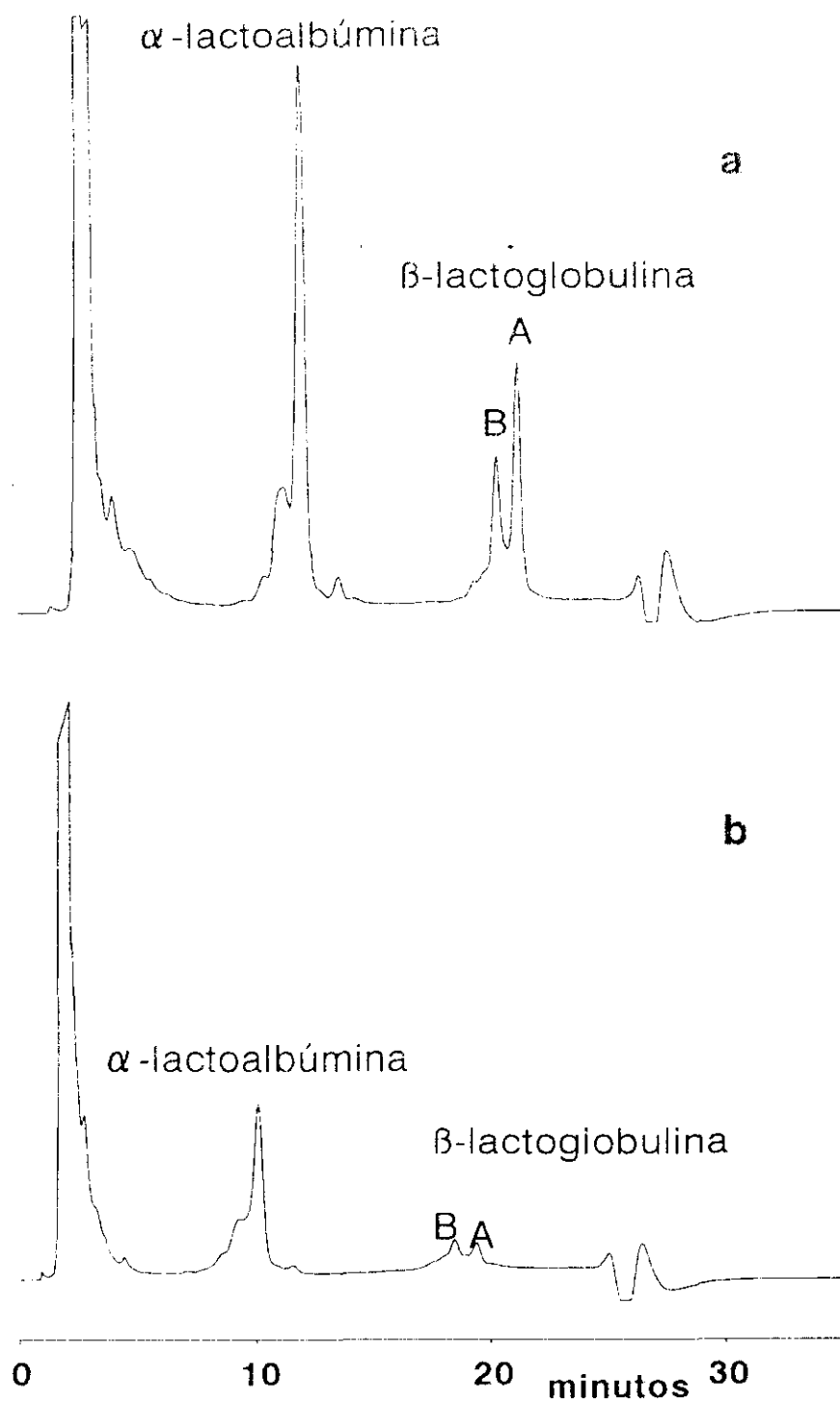


Figura 36. HPLC de seroproteinas de las muestras control de **a.** lote III (UHT directo) **b.** lote II (UHT indirecto).

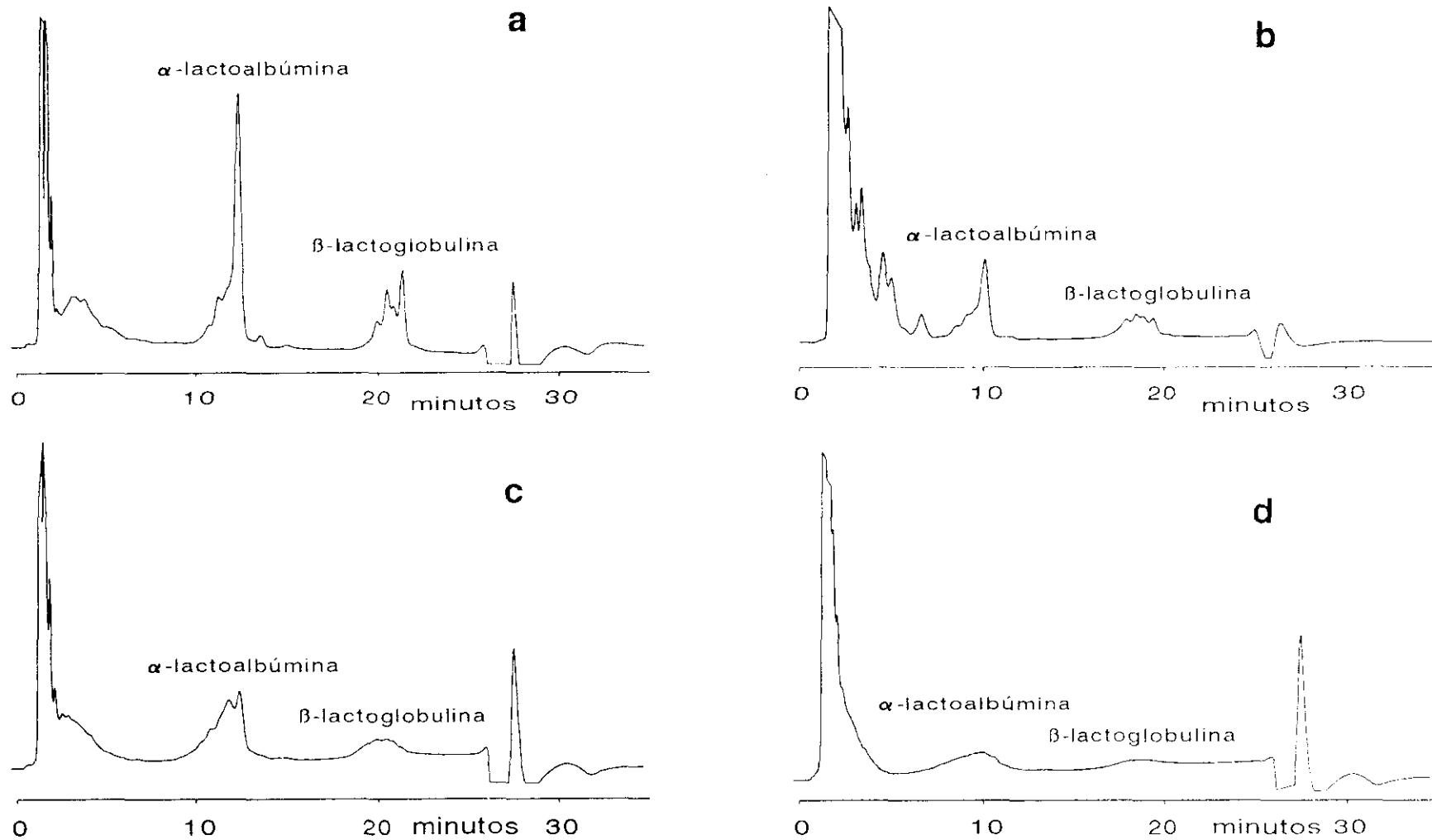


Figura 37. HPLC de seroproteínas de una leche UHT almacenada durante 60 días a distintas temperaturas a. 20°C b. 30°C c. 40°C d. 50°C.

3.6. CONSERVACION DE LOS SISTEMAS EN POLVO.

Se han determinado los contenidos en furosina, lactulosa, y proteínas de suero no desnaturalizadas así como la variación de pH durante la conservación de dos lotes de leche atomizadas en el laboratorio, una de ellas previamente tratada con CO₂, una muestra de un concentrado de proteínas de suero de quesería (WPC), y los sistemas modelo SMUF con lactosa y SMUF con lactosa y α -acetil-lisina. Los resultados obtenidos son los recogidos en las tablas de la XV a la XXVIII (ver apéndice).

La conservación a una actividad de agua de 0,33 y temperatura de 20°C se ha tomado como control, al tratarse de unas condiciones de almacenamiento similares a las habitualmente empleadas para leches en polvo.

3.6.1. Muestra de SMUF con lactosa y α -acetil-lisina.

El almacenamiento de un sistema modelo que simula un ultrafiltrado de leche al cual se le añadió lactosa en una concentración del 5%, y α -acetil-lisina al doble de la concentración correspondiente a la leche, se tomó como referencia. El valor inicial de furosina de 32,85 mg/l es el más bajo de todas las muestras analizadas, debido a que se parte de una solución que no ha sufrido ningún tipo de tratamiento térmico previo. Las variaciones del contenido en furosina durante el almacenamiento se representan en la figura 38. A una temperatura de 30°C se observa un elevado aumento de la furosina para una a_w de 0,33 hasta los 40 días, a partir de los cuales y hasta el final del almacenamiento crece pero de forma menos acusada. A una a_w de 0,44 el contenido en furosina aumenta hasta alcanzar un máximo a los 40 días, superior al obtenido para 0,33 a_w , estabilizándose posteriormente. En el caso de la mayor actividad de agua ensayada (0,65) hay una mínima formación de furosina que va aumentando de forma progresiva con el tiempo de almacenamiento hasta los 100 días, con unos valores semejantes o ligeramente superiores a los del control.

Para una temperatura de 50°C, la formación de furosina es superior a la del lote control para todas las actividades de agua ensayadas. Para 0,33 a_w aumenta hasta alcanzar un máximo (60 días) disminuyendo posteriormente. Una evolución semejante se observa para una a_w de 0,65, aunque las concentraciones de furosina presentan valores muy inferiores. A 0,44 de a_w la furosina alcanza un máximo a 20-40 días, y disminuye a continuación.

El aspecto de las muestras nos permitió establecer a simple vista, el mayor o menor grado de pardeamiento para las distintas temperaturas y actividades de agua ensayadas (figura 39). Desde los primeros días de conservación se observó la aparición de color en todas las muestras a 30°C. La mayor intensidad fué para 0,44 a_w que presentó una coloración marrón, mientras que a 0,33 y 0,65 a_w las muestras adquirieron una coloración pardo-amarillenta, similar en ambos casos. A 50°C el pardeamiento fué más intenso, siendo más acusado para 0,44 a_w , muestra que presentó un color negro al final del tiempo de conservación. Para 0,33 a_w se observó el menor grado de pardeamiento con una coloración marrón-oscura al final del periodo de conservación.

Estos resultados indican que a ambas temperaturas de conservación, la mayor degradación se alcanzó a 0,44 a_w . Los valores similares de furosina encontrados a 30°C para 0,33 y 0,44 a_w al final del periodo de almacenamiento, se deben a un mayor avance de la reacción de Maillard a 0,44 a_w , lo que origina una más rápida degradación de la lactulosil-lisina. En el caso de la conservación a 50°C, para 0,44 y 0,65 a_w la degradación de lactulosil-lisina es también más rápida, por lo que el contenido en furosina a 0,33 a_w resultó ser considerablemente más elevado aunque el pardeamiento fué menos intenso.

La formación de lactulosa durante la conservación resultó ser muy pequeña en todos los ensayos en ausencia de α -acetil-lisina, alcanzándose un valor máximo de transformación del 0,34%

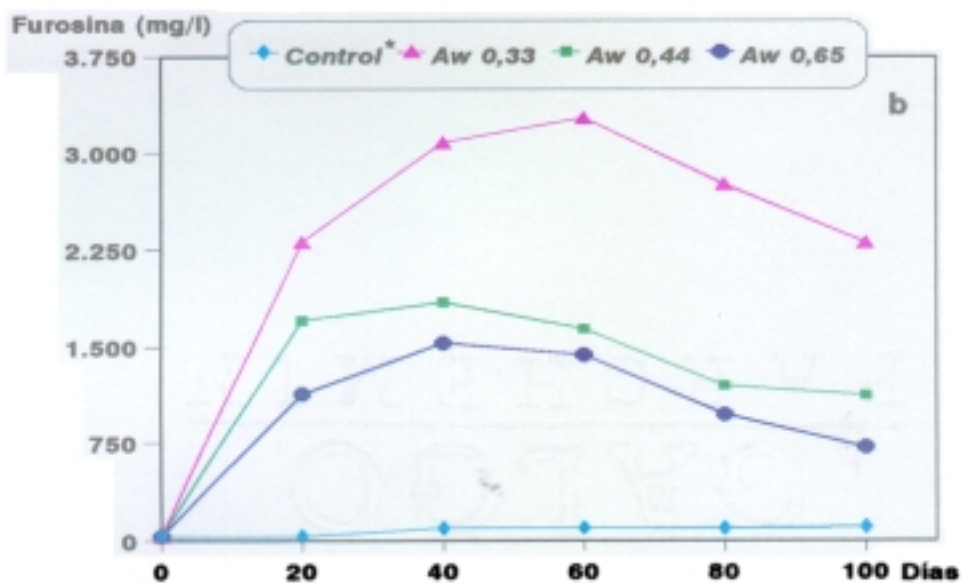
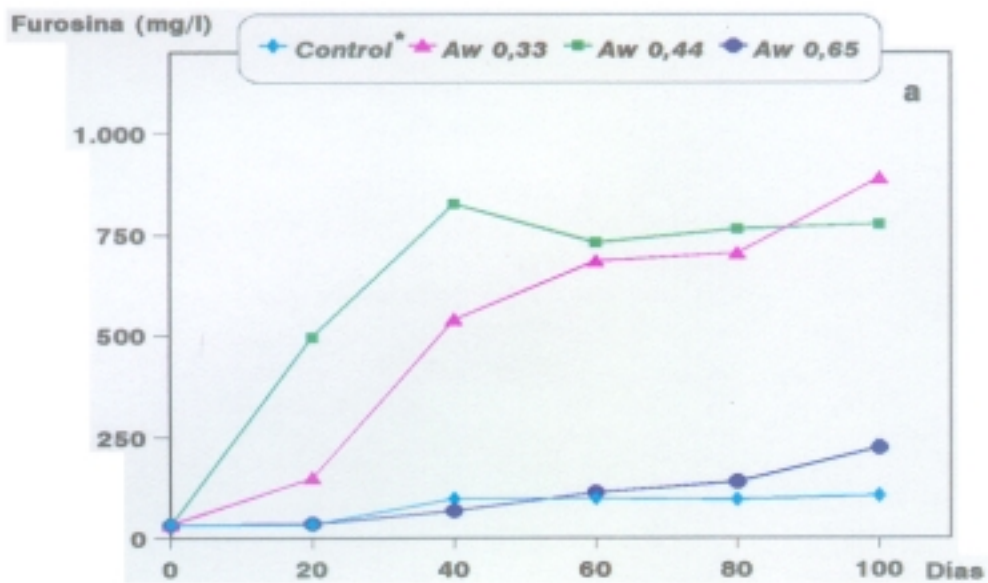


Figura 38. Evolución de furosina en SMUF con lactosa y α -acetil-lisina durante el almacenamiento a diferentes a_w y temperaturas: a. 30°C y b. 50°C.

* Control almacenado a 20°C y 0,33 a_w .

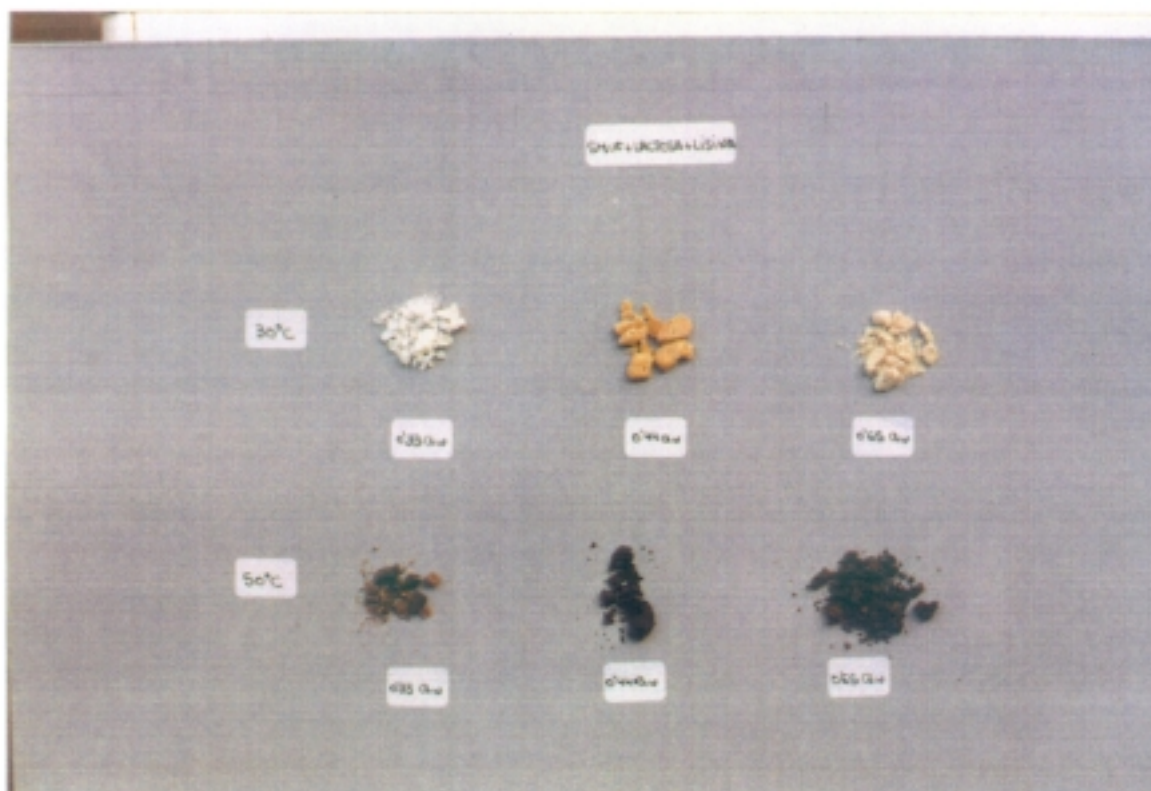


Figura 39. Influencia de las distintas temperaturas y a_w ensayadas, en el color del SMUF con lactosa y D-acetil-lisina, conservado durante 100 días.

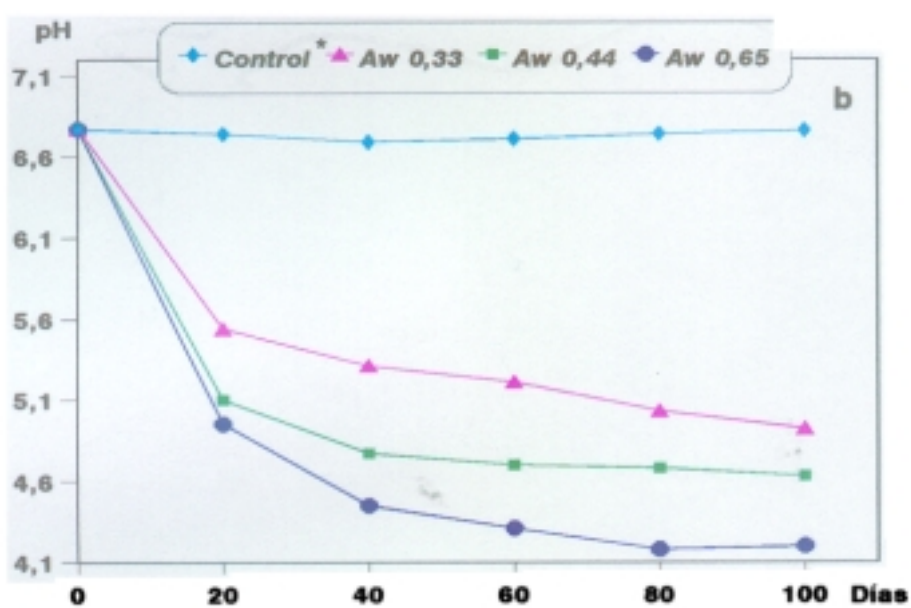
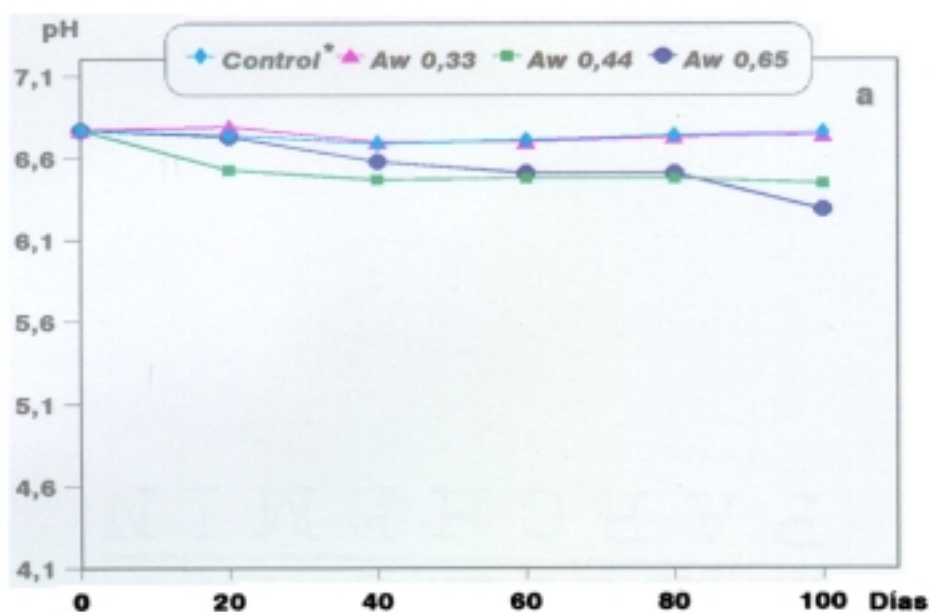


Figura 40. Evolución del pH en SMUF con lactosa y α -acetil-lisina durante el almacenamiento a diferentes a_w y temperaturas: a. 30°C y b. 50°C.

* Control almacenado a 20°C y 0,33 a_w .

respecto a la lactosa en el caso de la conservación a 50°C y 0,44 a_w (tabla XXII del apéndice). En presencia de α -acetil-lisina la formación de lactulosa, aún siendo muy baja, experimentó un aumento considerable llegando al 0,89% de la lactosa inicial en la conservación a 50°C y 0,33 a_w (tabla XXIII del apéndice). Dado el bajo contenido en lactulosa de las muestras, los valores determinados están sujetos a un error considerable y solamente pueden estimarse de un modo global.

La evolución del pH (figura 40) muestra que los mayores descensos, tanto a 30 como a 50°C, tienen lugar a la mayor actividad de agua (0,65). El estudio de la variación del pH en el smuf con lactosa muestra una caída de pH muy inferior a la observada cuando hay lisina en la muestra, y este descenso aumenta con la temperatura y la actividad de agua. La disminución del pH se debe a la degradación de la lactosa que da lugar a la formación de compuestos ácidos, y a la reacción de Maillard. Los resultados obtenidos muestran que la mayor contribución al descenso del pH durante la conservación se debe a la reacción de Maillard, mientras que la degradación de lactosa vía Lobry de Bruyn contribuye en menor medida.

3.6.2. Muestras de leche en polvo.

El contenido inicial de furosina se determinó recién atomizadas las muestras, y las concentraciones obtenidas fueron de 97,48 y 98,23 mg/l respectivamente para la leche con y sin tratamiento previo con CO₂. Como la cantidad de furosina de la leche en polvo utilizada en la preparación de estas muestras fué de 87,83 mg/l, el aumento en dicho aminoácido debido al proceso de atomización es muy bajo (aproximadamente 10 mg/l), incluso inferior al obtenido en el tratamiento UHT directo. Por lo tanto, las mayores concentraciones de furosina encontradas en la leche en polvo frente a la UHT se deben fundamentalmente a la formada durante el tratamiento térmico y la conservación.

Como se puede observar en la figura 41, los valores de

furosina aumentan con la actividad de agua, especialmente de 0,33 a 0,44, a la temperatura de almacenamiento de 30°C. Para 0,65 a_w la concentración de furosina a los 20 días es ligeramente superior a la formada a 0,44 a_w , aunque a esta última actividad de agua la tendencia es ascendente a partir de los 20 días, mientras que a 0,65 a_w se observa un incremento menor. No obstante las diferencias entre ambas a_w resultaron ser muy pequeñas. Durante el almacenamiento a 50°C la furosina crece de forma continuada hasta los 100 días cuando la actividad de agua es de 0,33, produciéndose los mayores incrementos en los primeros cuarenta días. Sin embargo a 0,44 y 0,65 a_w la furosina aumenta considerablemente hasta los 20 días, disminuyendo posteriormente con el almacenamiento.

La evolución del pH durante el almacenamiento (figura 42) muestra que no existe una variación significativa para una temperatura de 30°C cuando la a_w es de 0,33 ó 0,44, y que disminuye solo ligeramente a 0,65 a_w . A 50°C hay caídas bruscas del pH a 0,65 y a 0,44 de a_w , aunque menos acusadas en este último caso. Para una a_w de 0,33 sin embargo el descenso es muy pequeño. El acusado descenso de pH observado se debe al avance de la reacción de Maillard que da lugar a compuestos de carácter ácido.

Durante la conservación a 30°C el aspecto de las leches permanece inalterado, observándose solamente un ligero pardeamiento a 0,65 a_w . A 50°C todas las leches adquieren coloración amarillenta siendo máxima a 0,65 a_w y mínima a 0,33 a_w (figura 43).

A 30°C la concentración de furosina, incluso en las condiciones más favorables de actividad de agua, aumenta paulatinamente durante la conservación, y la posible degradación de lactulosil-lisina, si es que tiene lugar, no se da en un grado tal que origine un descenso en el contenido en furosina, ni la aparición de productos coloreados. A 50°C la concentración de furosina a las tres actividades de agua ensayadas pasa por un

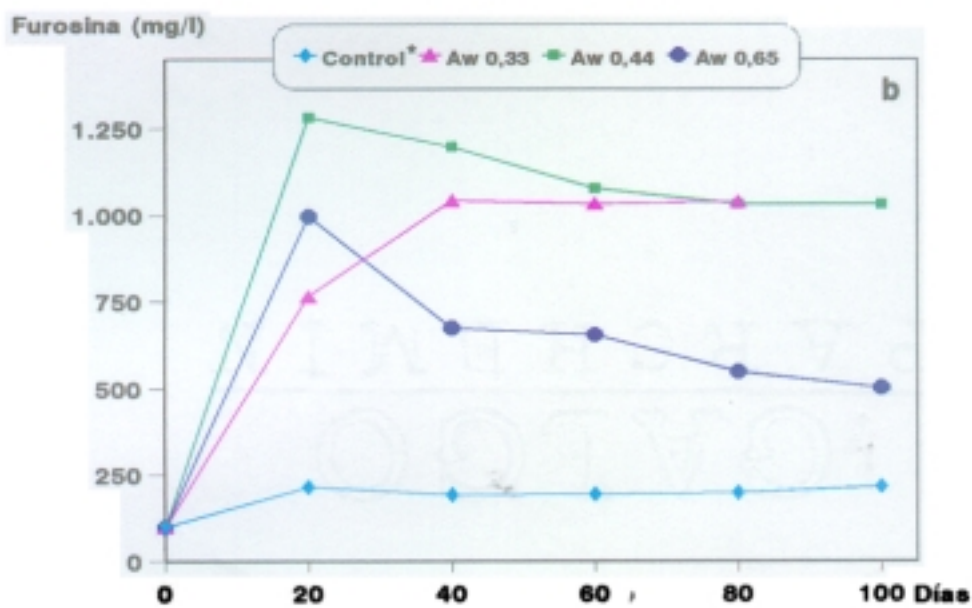
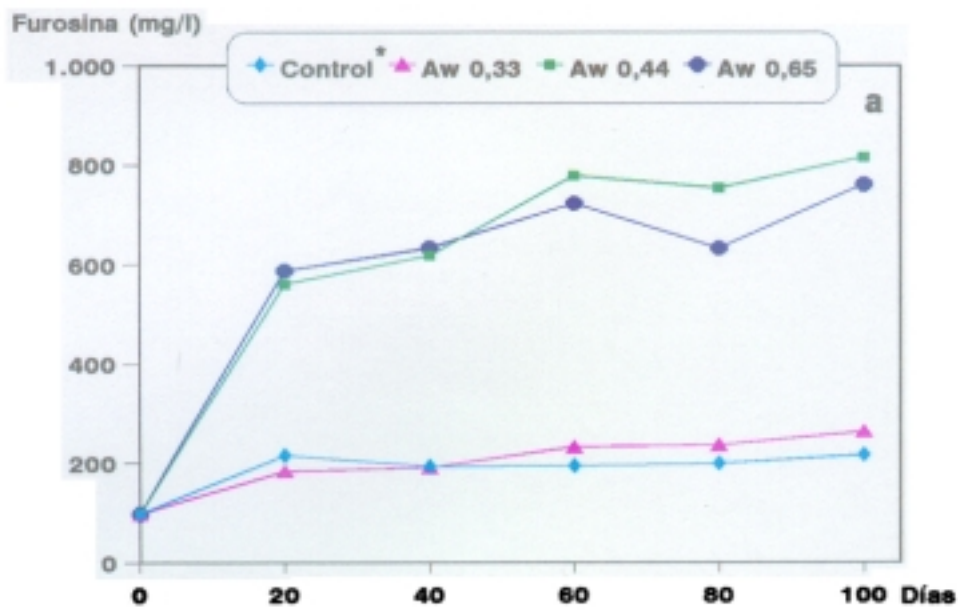


Figura 41. Evolución de furosina en leche en polvo desnatada durante el almacenamiento a diferentes a_w y temperaturas: **a.** 30°C y **b.** 50°C.

* Control almacenado a 20°C y 0,33 a_w .

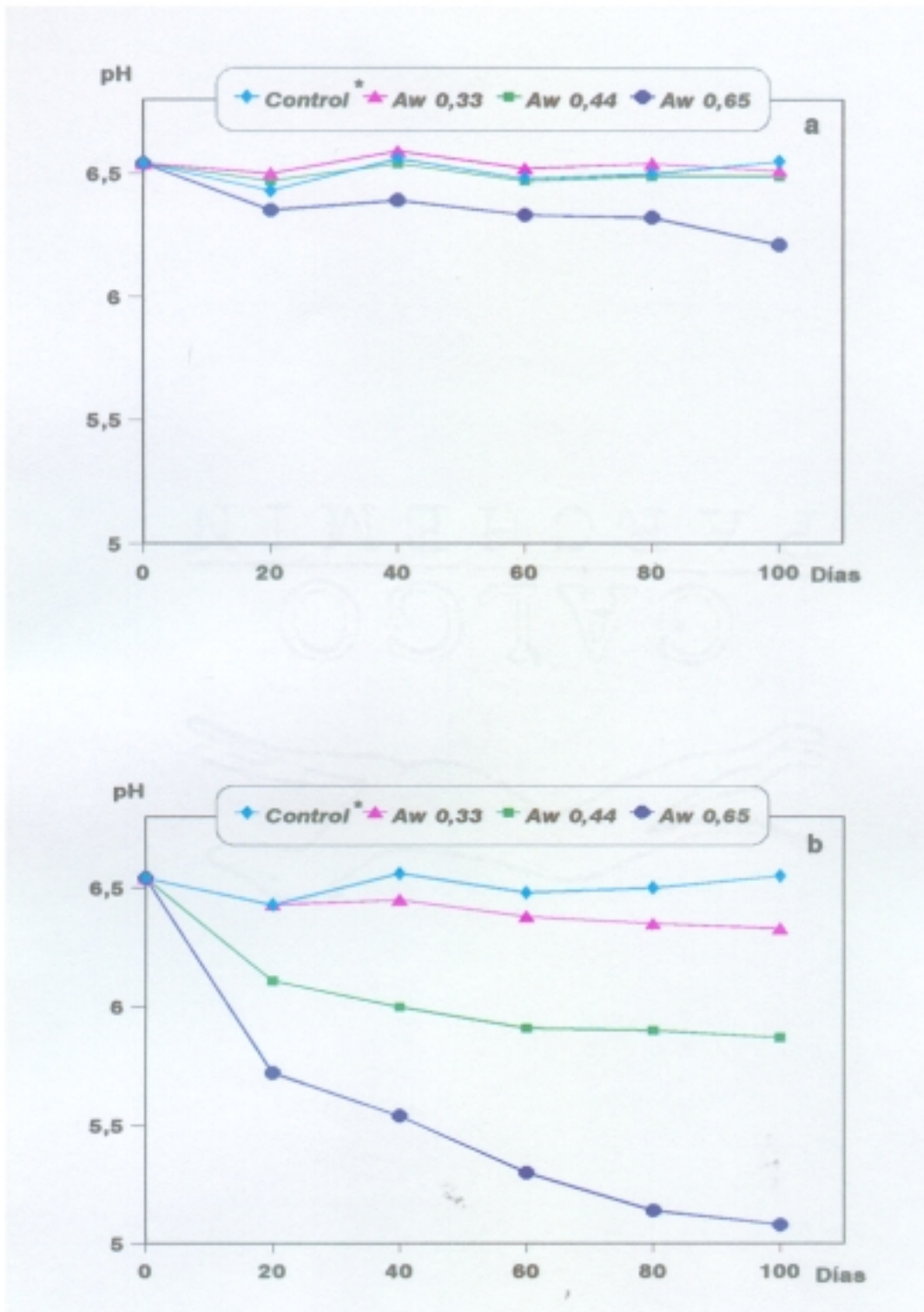


Figura 42. Evolución del pH en leche en polvo desnatada durante el almacenamiento a diferentes a_w y temperaturas: **a.** 30°C y **b.** 50°C.

* Control almacenado a 20°C y 0,33 a_w .

máximo para luego disminuir, lo que indica una degradación parcial de la furosina formada. El descenso más acusado se observa a 0,65 a_w y corresponde a la muestra que adquiere un pardeamiento más intenso. La degradación de furosina observada a 50°C confirma los resultados de Chiang (1988) que indican las limitaciones de la determinación de furosina como medida del deterioro de las proteínas debido a la reacción de Maillard en muestras almacenadas en condiciones drásticas.

En el caso de la leche tratada con CO₂ (figura 44), almacenada exclusivamente a una actividad de agua de 0,44, se observa que la furosina crece más lentamente al compararla con la muestra anterior, e incluso a 50°C el contenido es ligeramente inferior, no apreciándose variaciones considerables a partir de los 20 días de almacenamiento. Las mayores diferencias se observan en las variaciones del pH, que en el caso de las leches tratadas con CO₂ son mucho menores. Este hecho se debe probablemente a la presencia de carbonato cálcico que neutraliza la posible formación de ácidos originados por reacción de Maillard.

En cuanto a la lactulosa (figura 45 y 46) es de destacar la escasa formación de dicho azúcar en el almacenamiento de este tipo de leche, confirmando los resultados de Richards (1963). El contenido en lactulosa es semejante en las dos muestras de leche estudiadas, con unos valores iniciales de 6,36 y 7,41 mg/100 ml para la leche con y sin CO₂ respectivamente. Las mayores concentraciones se corresponden siempre con el almacenamiento a 50°C, y en especial para una actividad de agua de 0,33. La escasez de datos bibliográficos sobre el contenido en lactulosa en este tipo de leche podría deberse a los bajos niveles encontrados, que solo han sido detectados por técnicas cromatográficas (Olano y col., 1989b), y no por otro tipo de métodos como los espectrofotométricos o enzimáticos (Andrews, 1986).



Figura 43. Influencia de las distintas temperaturas y a_w ensayadas, en el color de la leche en polvo desnatada, conservada durante 100 días.

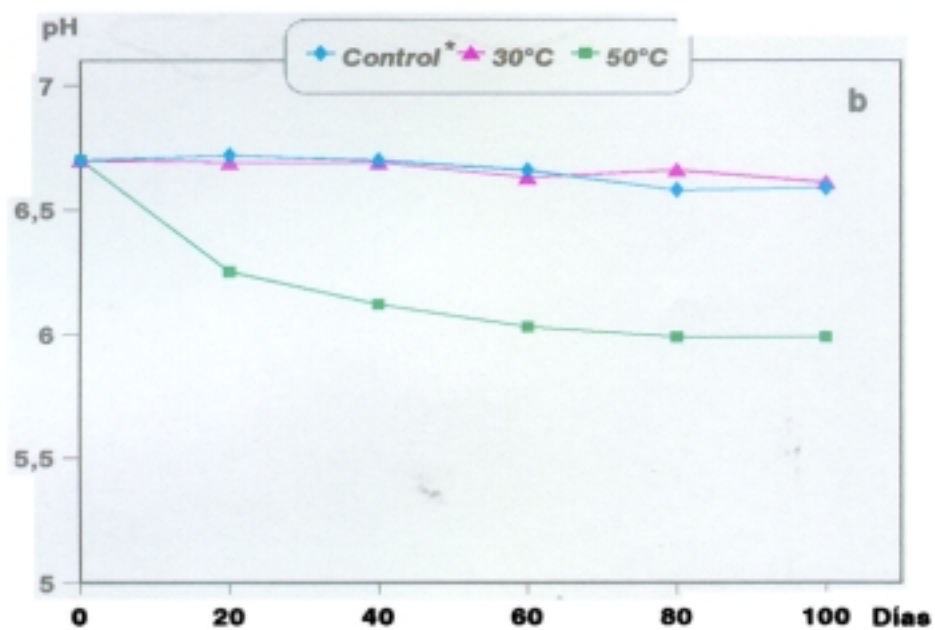
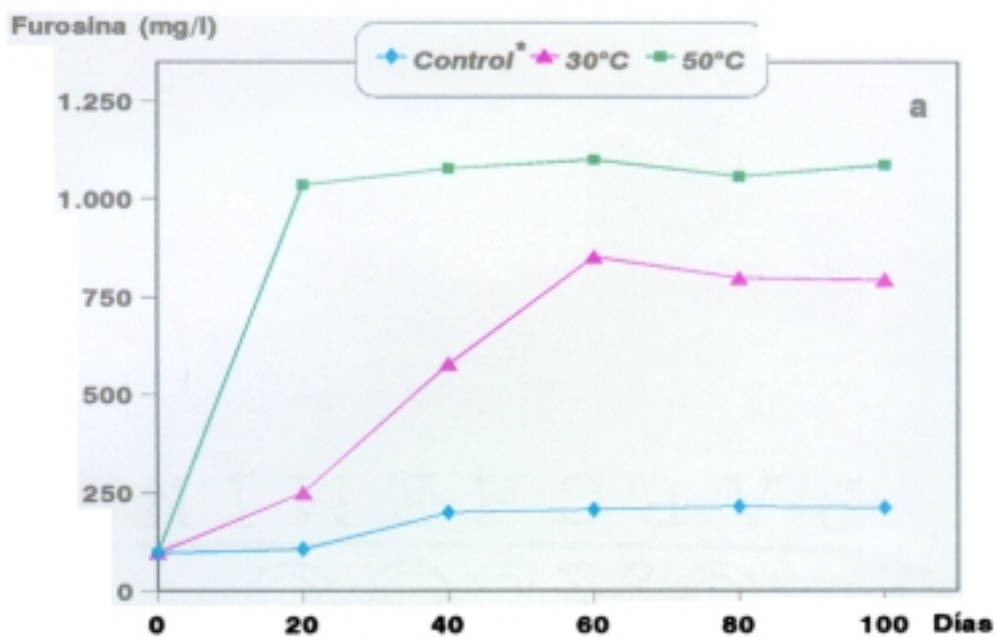


Figura 44. Evolución de a. furosina y b. pH, en leche en polvo desnatada previamente tratada con CO₂ durante el almacenamiento a diferentes temperaturas y 0,44 a_w.

* Control almacenado a 20°C y 0,33 a_w.

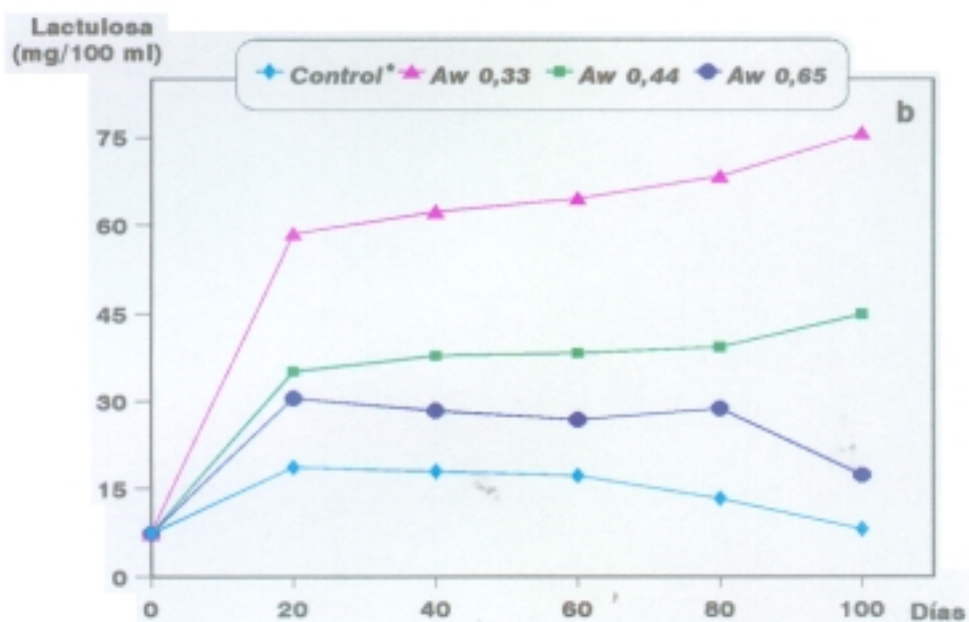
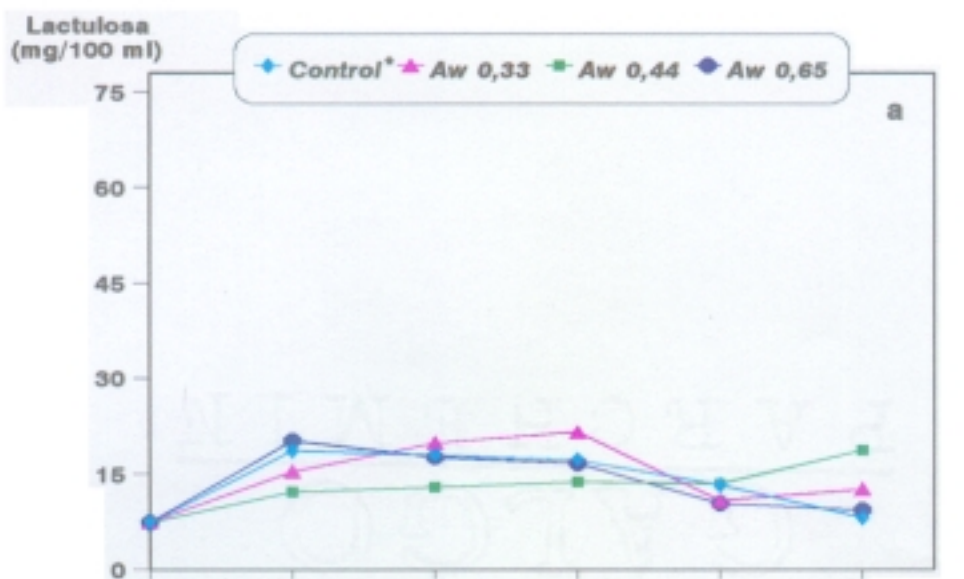


Figura 45. Evolución de lactulosa en leche en polvo desnatada durante el almacenamiento a diferentes a_w y temperaturas: a. 30°C y b. 50°C.

* Control almacenado a 20°C y 0,33 a_w .

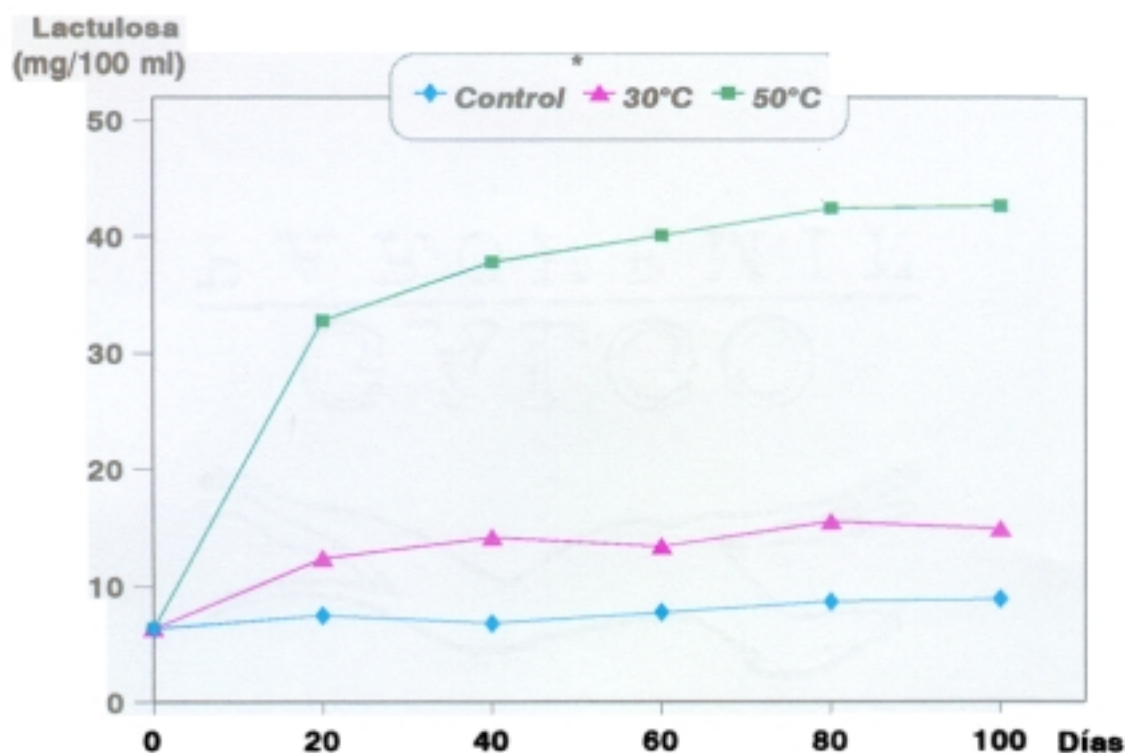


Figura 46. Evolución de lactulosa en leche en polvo desnatada previamente tratada con CO₂ durante el almacenamiento a diferentes temperaturas y 0,44 a_w.

* Control almacenado a 20°C y 0,33 a_w.

Tabla XXIX. Matriz de correlación de los distintos factores estudiados durante la conservación de leche en polvo desnatada.

	Tiempo	a _w	Fur	Lu	pH
Ta	-0,000	0,228	0,768	0,741	-0,657
Tiempo		-0,000	0,020	-0,042	-0,142
a _w			0,202	-0,276	-0,639
Fur				0,674	-0,291
Lu					-0,122

Fur. Furosina Lu. Lactulosa

La matriz de correlación muestra unos valores aceptables de la temperatura con la furosina y la lactulosa, mientras que los obtenidos para estos dos compuestos con la a_w son muy bajos. Esto podría deberse a que para las actividades de agua más altas la furosina disminuye con el almacenamiento cuando la temperatura utilizada es de 50°C. El pH muestra una correlación aceptable, -0,657 y -0,639 para la temperatura y la actividad de agua respectivamente, indicando que ambos factores contribuyen a un mayor grado de la reacción de Maillard, que se traduce en un descenso del pH.

Tabla XXX. Matriz de correlación de los distintos factores estudiados durante la conservación de leche en polvo previamente tratada con CO₂.

	Tiempo	a_w	Fur	Lu	pH
Ta	-0,000	0,756	0,916	0,976	-0,913
Tiempo		-0,000	0,199	0,121	-0,205
a_w			0,828	0,643	-0,477
Fur				0,879	-0,796
Lu					-0,974

Fur. Furosina Lu. Lactulosa

En el caso de la leche en polvo previamente tratada con CO₂, las altas correlaciones del pH con la furosina y la lactulosa se explicarían al no existir una degradación acusada ni del compuesto de Amadori, ni de la lactulosa, por lo que una disminución del pH siempre va acompañada de un aumento en ambos compuestos.

El tiempo de almacenamiento no presenta en ningún caso unos valores de correlación significativos, debido a que las mayores variaciones para los distintos parámetros estudiados se producen siempre en los primeros 20 días de almacenamiento.

3.6.3. Muestra de concentrado de proteínas de suero (WPC).

La muestra de suero presentó en general unas concentraciones de furosina superiores a las encontradas en las muestras de leche, con un valor inicial de 162,15 mg/l. Su evolución durante la conservación se muestra en la figura 47. A 30°C se aprecia un elevado aumento de furosina para unas a_w de 0,44 y 0,65 comparado con el incremento observado a 0,33 a_w . El contenido en furosina es mayor a los 20 días de almacenamiento a 0,65 a_w que a 0,44 a_w , no obstante, para periodos largos de conservación la concentración de furosina resultó ser superior a 0,44 a_w . A 50°C se observa un máximo de furosina en la primera etapa del almacenamiento, seguido de un descenso, más acusado a medida que aumenta la a_w . A 0,33 y 0,44 de a_w esta disminución tiene lugar a partir de los 40 días, mientras que a 0,65 a_w furosina disminuye a partir de los 20 días.

El valor inicial del pH es 6,05, inferior al de las muestras de leche, disminuyendo en general con la conservación (figura 48). Durante el almacenamiento a 30°C la variación fué muy pequeña cuando las actividades de agua utilizadas fueron de 0,33 y 0,44, mientras que a 0,65 a_w se obtuvo una disminución de pH más acusada. A 50°C el descenso del pH resultó ser mayor, aumentando a su vez con la actividad de agua de la muestra.

La lactulosa presenta unas bajas concentraciones, al igual que en el caso de las muestras de leche, con un valor inicial de 6,19 mg/100 ml. Durante el almacenamiento, (figura 49), este azúcar solo aumenta de forma significativa a 50°C siendo estos incrementos más acusados a 0,44 a_w que a 0,33 a_w , y estos a su vez mayores que los correspondientes a 0,65 a_w .

Respecto al pardeamiento (figura 50), la conservación a 30°C y 0,33 a_w no origina cambios de color apreciables en las muestras, mientras que a 0,44 a_w adquiere una ligera coloración amarillenta y a 0,65 a_w este color es pardo. A 50°C la coloración adquirida por las muestras fué amarillo, marrón claro y marrón

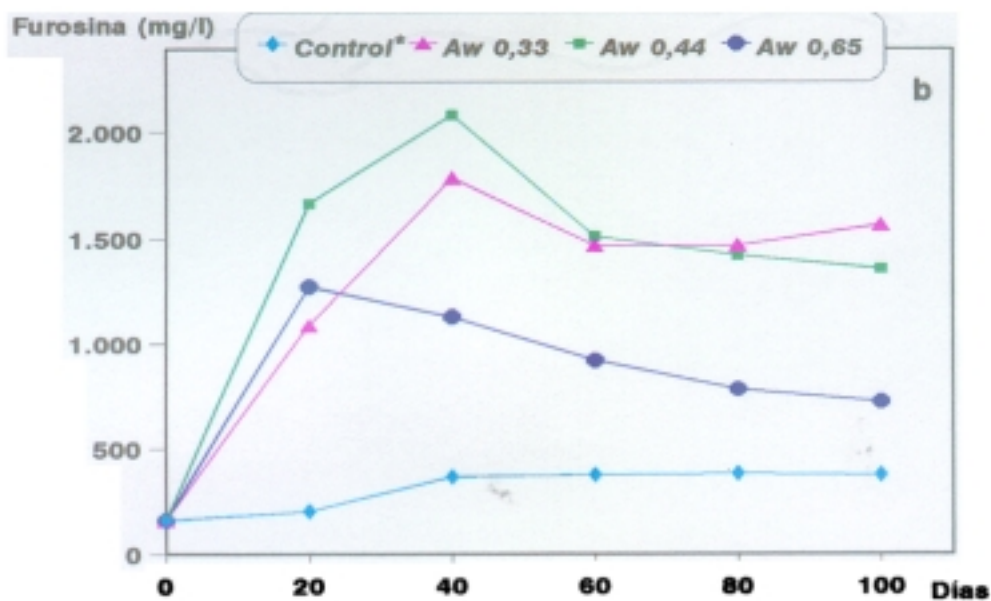
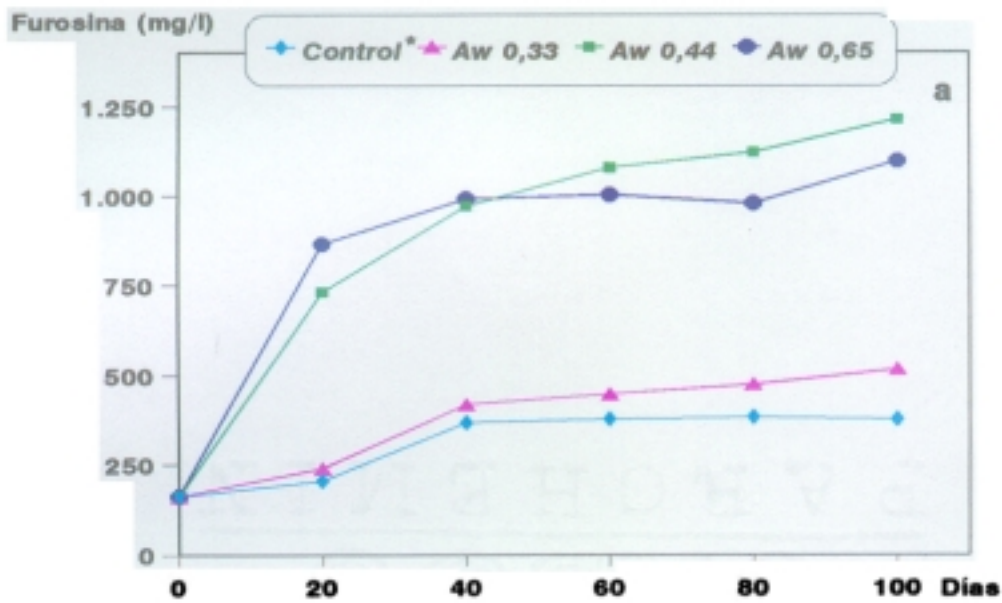


Figura 47. Evolución de furosina en el concentrado de proteínas de suero (WPC) durante el almacenamiento a diferentes a_w y temperaturas: a. 30°C y b. 50°C.

* Control almacenado a 20°C y 0,33 a_w .

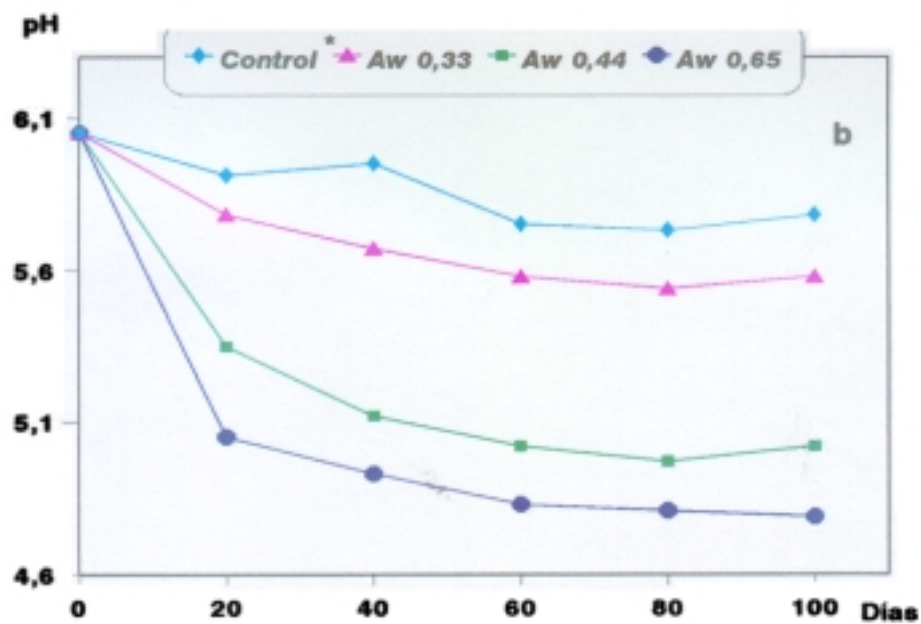
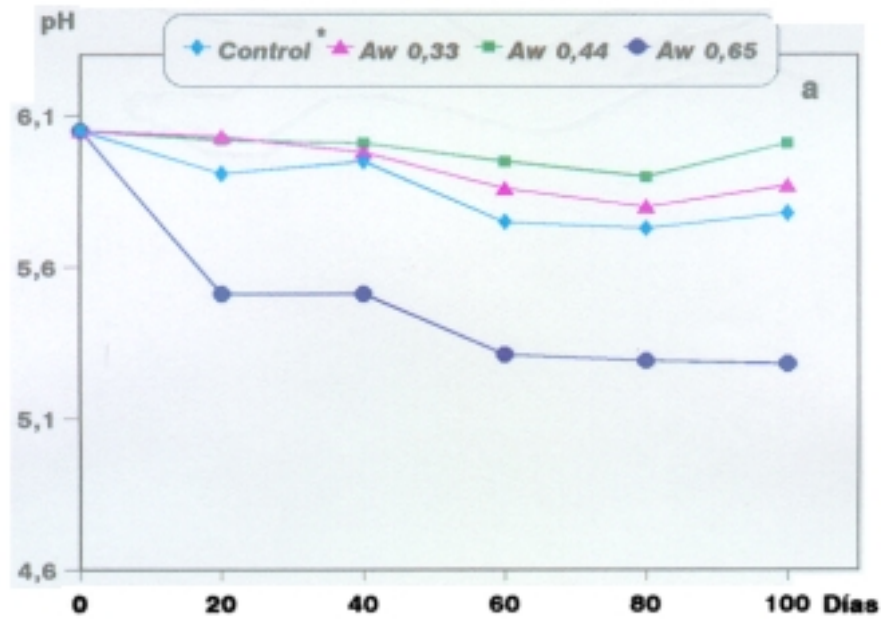


Figura 48. Evolución del pH en el concentrado de proteínas de suero (WPC) durante el almacenamiento a diferentes a_w y temperaturas: **a.** 30°C y **b.** 50°C.

* Control almacenado a 20°C y 0,33 a_w .

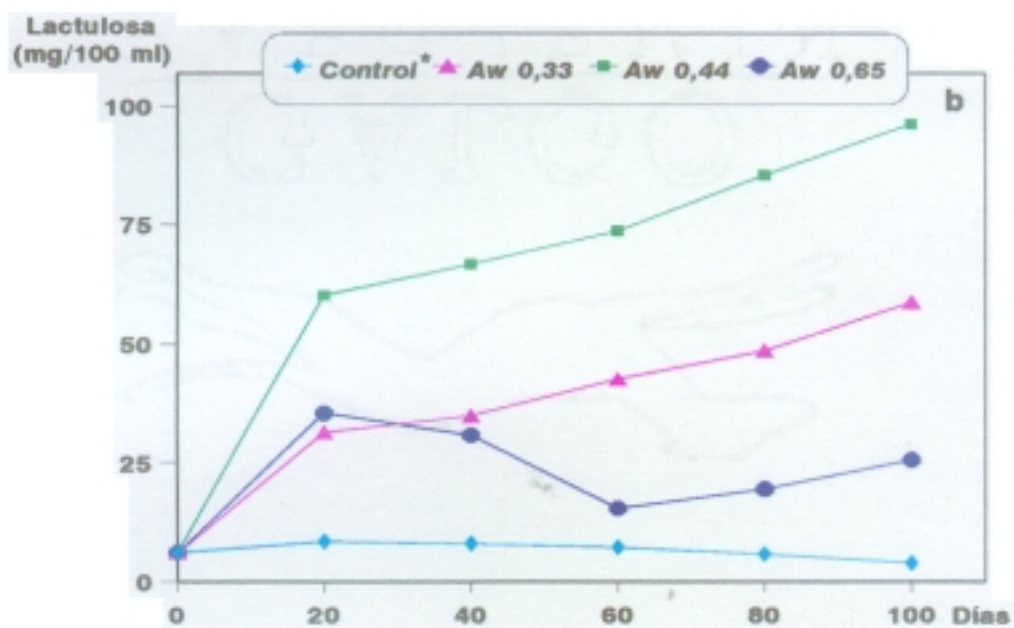
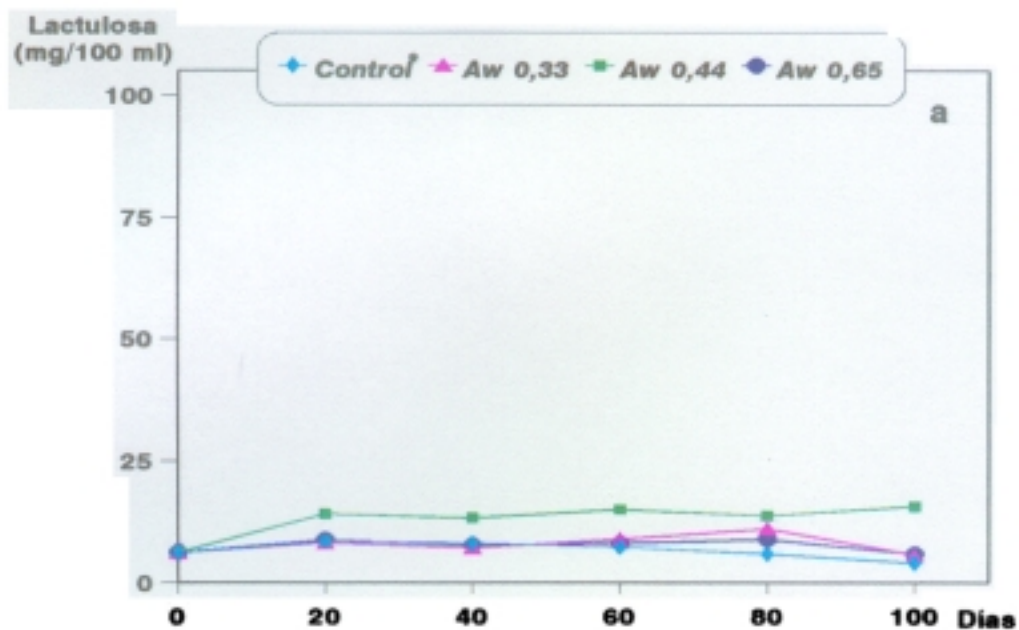


Figura 49. Evolución de lactulosa en el concentrado de proteínas de suero (WPC) durante el almacenamiento a diferentes a_w y temperaturas: a. 30°C y b. 50°C.

* Control almacenado a 20°C y 0,33 a_w .



Figura 50. Influencia de las distintas temperaturas y a_w ensayadas, en el color del concentrado de proteínas de suero (WPC), conservado durante 100 días.

oscuro para 0,33, 0,44 y 0,65 a_w respectivamente.

En términos generales, el efecto de la actividad de agua y la temperatura en la formación de furosina resultó ser similar al observado en leche en polvo, si bien en el caso del WPC, los niveles de furosina alcanzados fueron superiores en todos los ensayos. Las diferencias observadas pueden atribuirse principalmente a la mayor concentración de proteínas en el WPC, lo que facilita la formación de compuestos de Amadori. Por otra parte, la presencia de grupos amino libres en mayor concentración que en la leche en polvo contribuye a catalizar más activamente la reacción de isomerización de la lactosa, dando lugar por tanto a una mayor formación de lactulosa. La activación de ambas reacciones causan un descenso del pH más acusado que en el caso de la leche en polvo.

Tabla XXXI. Matriz de correlación de los distintos factores estudiados durante la conservación de un concentrado de proteínas de suero (WPC).

	Tiempo	a_w	Fur	Lu	pH
Ta	-0.000	0.228	0.749	0.758	-0.660
Tiempo		-0.000	0.020	0.093	-0.217
a_w			0.174	-0.077	-0.659
Fur				0.743	-0.416
Lu					-0.499

Fu. Furosina Lu. Lactulosa

La matriz de correlación de los distintos factores estudiados, temperatura, a_w y tiempo de almacenamiento con los parámetros analizados furosina, lactulosa y pH se indica en la tabla XXXI.

Como puede apreciarse, la temperatura presenta una buena correlación con todos los parámetros estudiados, indicando que los aumentos en el contenido de furosina y lactulosa, así como la disminución del pH se producen al aumentar la temperatura de almacenamiento.

El tiempo de almacenamiento no tiene apenas influencia en la evolución de furosina, lactulosa y pH, aunque con este último la correlación es ligeramente superior, y la a_w presenta un valor de correlación aceptable y negativo con el pH, es decir, un aumento en la actividad de agua se traduce en un descenso en el pH.

Según Lindemann-Schneider y Fennema (1989) la influencia de la temperatura es mayor que la de la actividad de agua en la pérdida de lisina disponible. Esta hipótesis es corroborada en el presente estudio ya que existe una mayor correlación de la furosina con la temperatura que con la a_w , indicando que la determinación de furosina es un índice válido de la medida de la pérdida de lisina disponible durante el almacenamiento. De hecho, las conclusiones sobre la influencia de las variables ensayadas (tiempo, temperatura y actividad de agua) en la reacción de Maillard, basadas en la determinación de furosina, coinciden con los antecedentes sobre la medida de la lisina disponible (Labuza y Saltmarch, 1981). No obstante para estados avanzados de la reacción de Maillard en los que la furosina alcanza valores superiores a 1000 mg/l, la degradación de furosina puede ser muy acusada y su concentración puede no ser válida como parámetro indicador de la intensidad de la reacción.

3.7. ANALISIS DE LECHES COMERCIALES.

La determinación de compuestos indicadores de la calidad de la leche procesada, es un tema de reciente interés y existen pocos datos en la bibliografía, concretamente en España, donde no se ha abordado con anterioridad el estudio simultáneo de furosina, lactulosa y proteínas de suero.

3.7.1. Leches UHT.

Con relación a la furosina observamos que los niveles de este compuesto en las leches UHT directo se encuentran en el intervalo de 10-30 mg/l para un 74% de las muestras analizadas, mientras que en las leches UHT indirecto el 78% de las muestras presenta una concentración de furosina superior a 40 mg/l (figura 51). En el rango de 30-40 mg/l hay una superposición de ambos tipos de tratamiento UHT en el cual se incluyen las directas más calentadas y las indirectas sometidas a tratamientos menos intensos. Los valores encontrados son comparables a los obtenidos por otros autores en las leches UHT. Así Erbersdobler y col. (1987), Nangpal y Reuter (1990) y Dehn-Müller y col. (1991) hallan unas concentraciones de furosina en leches UHT en el rango de 8-53 mg/l. Según estos datos, 6 de las muestras UHT indirecto presentan unos contenidos en furosina superiores a 53 mg/l, de las cuales dos tienen unas concentraciones muy altas mayores de 80 mg/l, semejantes a las correspondientes a leches esterilizadas.

El contenido en lactulosa no permite establecer una clara diferenciación entre ambos tipos de tratamiento UHT (figura 52), ya que en el rango de 15-40 mg/100 ml de lactulosa encontramos un 69% de las leches UHT directo junto con un 47% de UHT indirecto, y en el rango de 40-60 mg/100 ml se encuentran el 27% de las leches UHT directo y el 21% de las UHT indirecto. Según la Federación Internacional de Lechería (FIL) el límite máximo admisible para el contenido de la lactulosa en leches UHT es de 60 mg/100 ml, por lo tanto, el 5% de las leches UHT directo (1

de 19 muestras) y el 32% de las UHT indirecto (6 de 21 muestras) se considerarían sobreprocesadas.

En la actualidad la FIL se propone también como índice del tratamiento UHT un contenido mínimo en β -lactoglobulina no desnaturalizada de 20 mg/l. Según esta propuesta, el 38% de las leches UHT indirecto (8 de 21 muestras), en las cuales esta seroproteína se encuentra en cantidades traza o incluso ausente en alguna de las leches, se considerarían sobreprocesadas. Por otra parte, la concentración tanto de α -lactoalbúmina como de β -lactoglobulina permite una buena diferenciación entre ambos tipos de tratamiento UHT (figura 53). Así, el 79% de las leches UHT directo presenta unos contenidos en β -lactoglobulina superiores a 30 mg/100 ml, mientras que solo se encuentran estas concentraciones en un 5% de las leches UHT indirecto. Igualmente el 90% de las UHT directo presentan unas concentraciones de α -lactoalbúmina superiores a 40 mg/100 ml, mientras que en el 81% de las UHT indirecto el rango va desde 15 a 40 mg/100 ml.

De las 8 muestras sobreprocesadas en función del contenido en β -lactoglobulina, solo seis pueden ser consideradas como tal según la cantidad de lactulosa presente, junto con una muestra correspondiente a una leche UHT directo. Los niveles de furosina en estas muestras varían entre 37,6 y 89,1 mg/l, mientras que en las muestras clasificadas correctamente como UHT el rango es de 14,6 a 58,3 mg/l. Estos resultados indican una mala correlación entre los distintos índices de tratamiento térmico estudiados, hecho que podría ser atribuido a una variación de los parámetros analizados en el período de conservación de las muestras desde el procesado de las mismas hasta el momento de su análisis. Esta correlación es mayor en el caso de β -lactoglobulina y furosina que en el de dicha proteína y lactulosa.

Número muestras

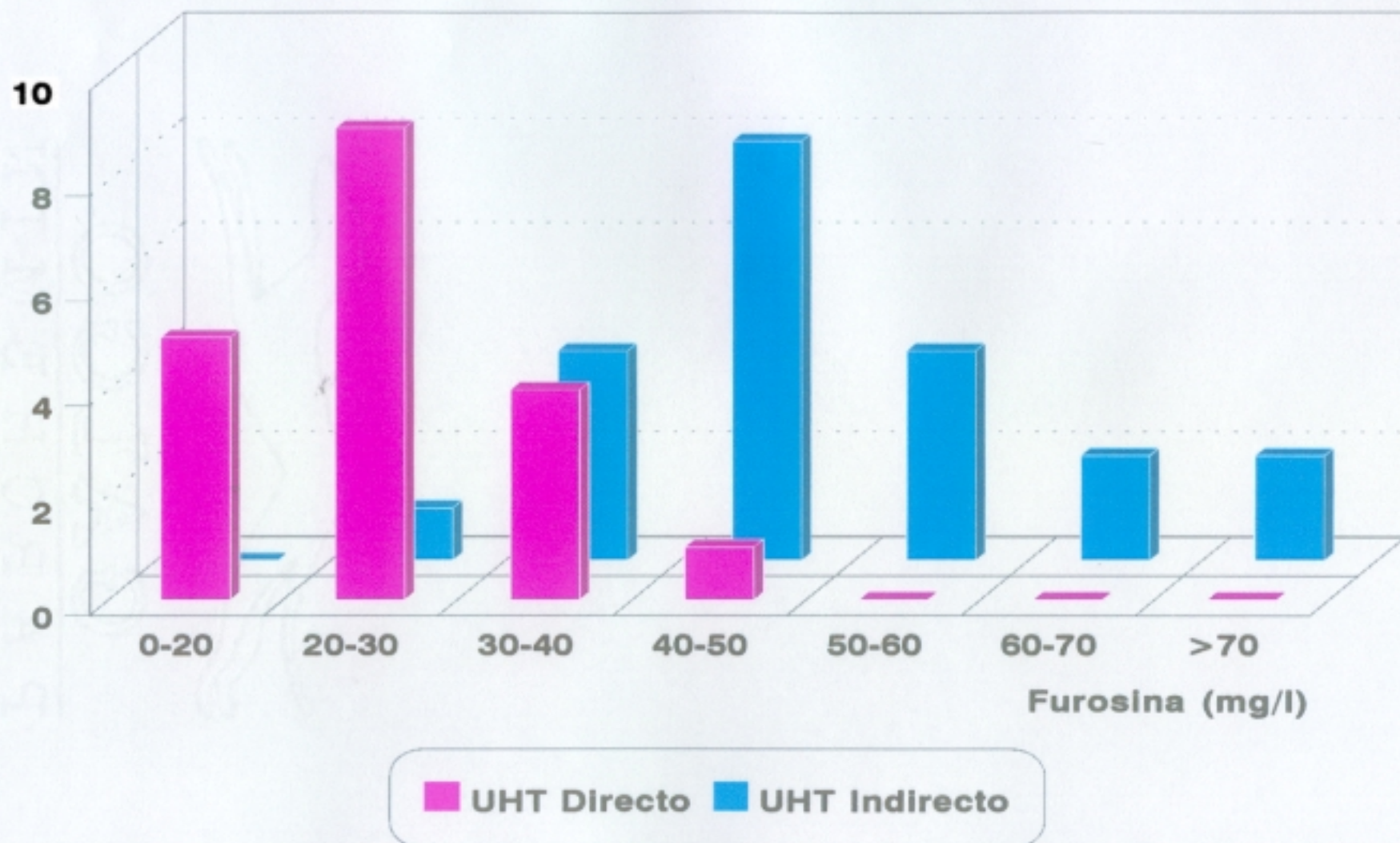


Figura 51. Contenido en furosina de leches UHT comerciales

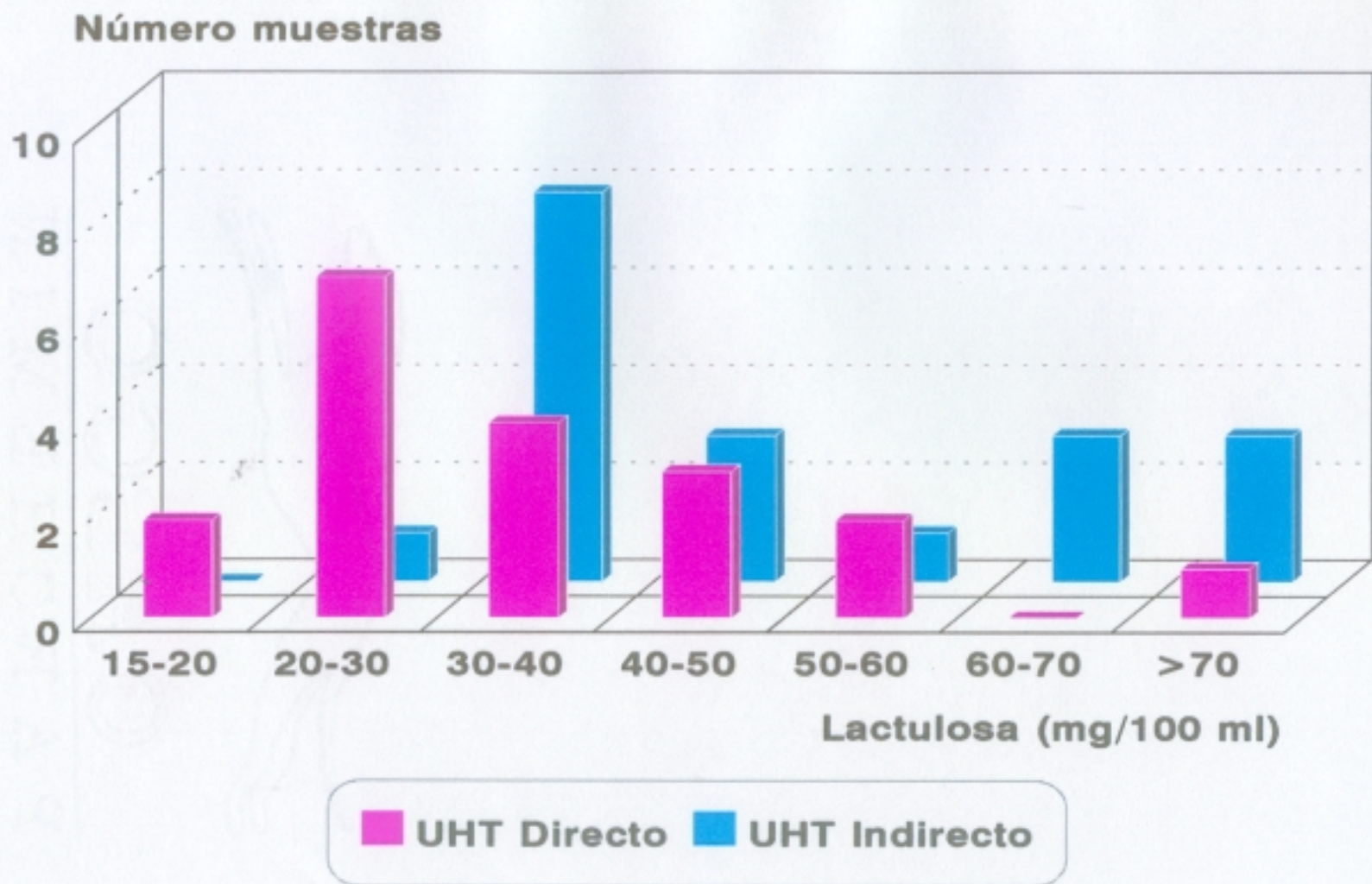


Figura 52. Contenido en lactulosa de leches UHT comerciales.

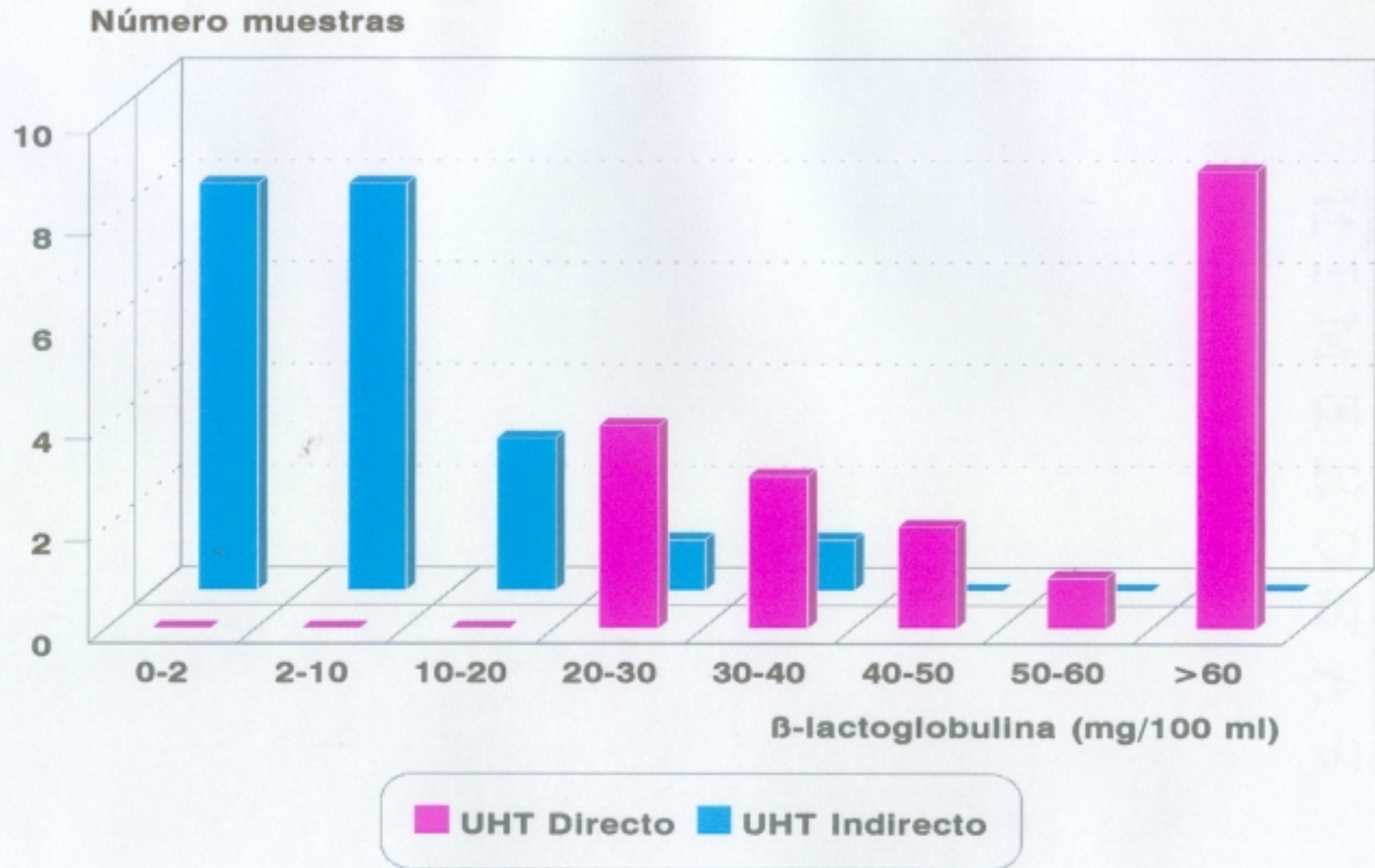


Figura 53. Contenido en β-lactoglobulina de leches UHT comerciales

3.7.2. Leches en polvo.

Los valores de furosina obtenidos en el análisis de leches en polvo son superiores en general a los encontrados en leches UHT (figura 54), debido fundamentalmente a la formación de furosina durante el almacenamiento. En alguna de las muestras se observa como contenidos en furosina muy altos (>80 mg/l) presentan unos cromatogramas de proteínas de suero bastante deformados debido a un alto grado de reacción de Maillard, indicando una inadecuada conservación.

En general los valores de seroproteínas no desnaturalizadas son muy elevados, aunque en algunas de las muestras se observa una deformación muy acusada de los picos cromatográficos (figura 55).

Por otra parte, se obtienen unas concentraciones mínimas de lactulosa, en un rango comprendido entre 3 y 8 mg/100 ml, corroborándose la escasa isomerización de la lactosa en la obtención de leches en polvo y durante su posterior conservación, tal y como se observó en los resultados obtenidos en el estudio de conservación de los sistemas en polvo.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la posibilidad de diferenciar leche en polvo reconstituida de leche líquida, práctica habitual en países deficientes en leche e importadores de leche en polvo. Cuando una leche en polvo se reconstituye y se procesa térmicamente para su comercialización como leche líquida, dado su elevado contenido inicial en furosina, este alcanzaría unos niveles excesivamente altos en la leche procesada debido al aumento durante el tratamiento térmico.

Por otra parte, los bajos niveles de lactulosa encontrados en leche en polvo comparados con las leches líquidas, facilitaría la detección de la adulteración con leche en polvo reconstituida. En leches UHT la relación Furosina/Lactulosa (Fu/Lu) encontrada está comprendida en el rango de 0,40-1,57, y en leches en polvo

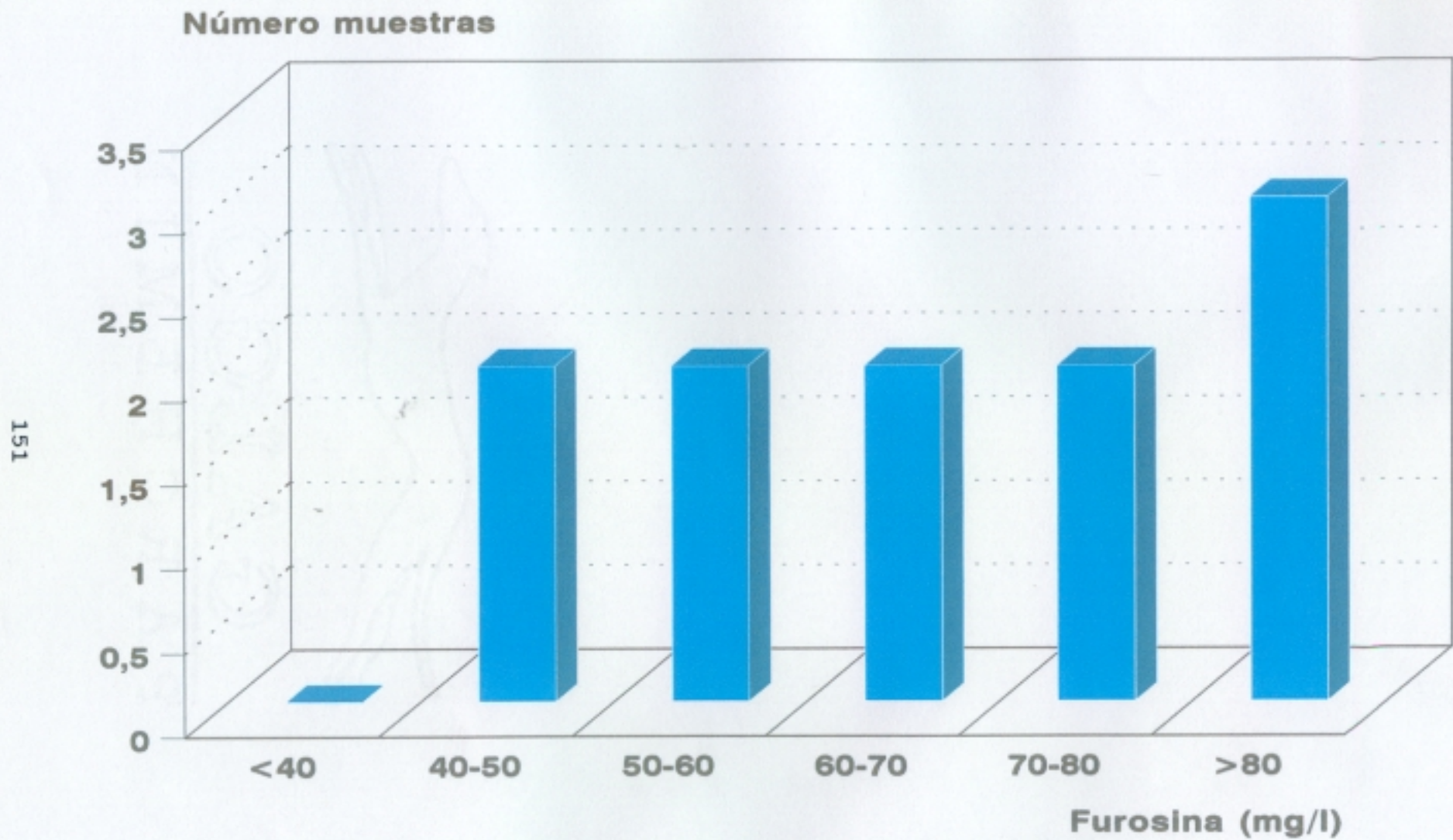


Figura 54. Contenido en furosina de leches en polvo comerciales

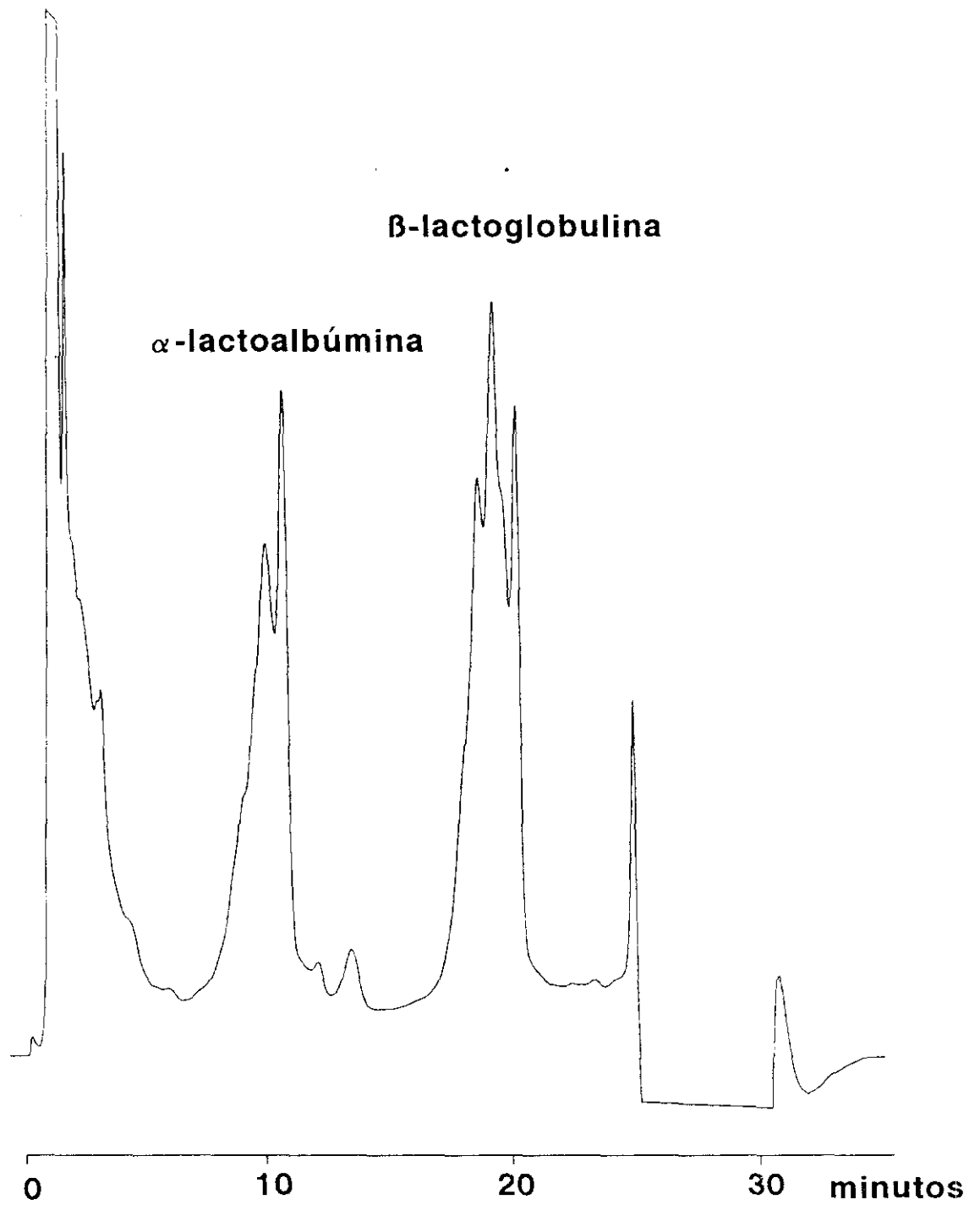


Figura 55. HPLC de seroproteínas de una muestra de leche en polvo.

entre 9,05 y 27,62, es decir, las diferencias entre los distintos tipos de leche son más acusadas cuando se utiliza la relación Fu/Lu que ambos parámetros independientemente, lo que permitiría la detección de bajos porcentajes de adulteración.

Con los datos obtenidos en el presente estudio, parece posible detectar adiciones de leche en polvo reconstituida a leche UHT inferiores al 10%. No obstante, sería necesario un estudio más amplio con el objeto de delimitar el rango de variación del parámetro Fu/Lu en los distintos tipos de leches procesadas y poder establecer de modo inequívoco el límite de detección de leche en polvo.

Dado que la reacción Fu/Lu en leche en polvo aumenta con el tiempo de almacenamiento, podría servir como índice de calidad de leche en polvo y establecerse unos límites máximos para su vida comercial, evitándose de este modo la comercialización de leche en polvo previamente almacenada por períodos de tiempo excesivos.

3.8. APENDICE DE TABLAS

Tabla XI. Valores de pH durante la conservación de los cuatro lotes de leche estudiados.*

Lote	Almacenamiento (Días)	Temperatura (°C)			
		20	30	40	50
I	15	6.50	6.56	6.48	6.45
	30	6.51	6.55	6.41	6.45
	45	6.53	6.53	6.36	6.43
	60	6.58	6.54	6.18	6.22
	75	6.61	6.55	5.97	6.05
	90	6.62	6.55	5.95	6.03
II	15	6.68	6.70	6.55	6.50
	30	6.70	6.68	6.55	6.48
	45	6.72	6.66	6.57	6.46
	60	6.72	6.64	6.52	6.25
	75	6.72	6.63	6.50	6.13
	90	6.71	6.60	6.47	6.05
III	15	6.71	6.74	6.62	6.54
	30	6.73	6.73	6.60	6.51
	45	6.77	6.71	6.59	6.48
	60	6.76	6.70	6.55	6.35
	75	6.77	6.69	6.51	6.20
	90	6.77	6.69	6.48	6.08
IV	15	6.72	6.65	6.54	6.58
	30	6.72	6.66	6.52	6.52
	45	6.73	6.68	6.51	6.42
	60	6.69	6.65	6.26	6.33
	75	6.66	6.63	5.97	6.24
	90	6.64	6.62	5.98	6.09

*
pH inicial:

Lote I: 6.56 Lote II: 6.65 Lote III: 6.75 Lote IV: 6.64

Tabla XII. Concentración de furosina expresada en mg/l durante la conservación de los cuatro lotes de leche estudiados.*

Lote	Almacenamiento (Días)	Temperatura (°C)			
		20	30	40	50
I	30	57.46	65.74	102.78	120.03
	60	56.76	70.18	110.29	114.06
	90	56.24	78.74	107.65	119.87
II	30	37.19	45.17	89.65	136.86
	60	41.96	55.52	104.71	144.91
	90	51.37	74.27	123.34	165.39
III	30	20.35	38.30	63.13	107.19
	60	23.31	55.43	99.49	146.94
	90	31.50	66.86	117.14	169.23
IV	30	19.19	29.56	61.91	127.90
	60	20.22	43.73	82.73	147.35
	90	27.81	50.70	102.09	164.95

* *Contenido inicial (mg/l):*

Lote I: 53.49 Lote II: 39.05 Lote III: 15.69 Lote IV: 17.81

Tabla XIII. Concentración de lactulosa expresada en mg/100 ml durante el almacenamiento de los cuatro lotes de leche estudiados*.

Lote	Almacenamiento (Días)	Temperatura (°C)		
		30	40	50
I	30	75.09	88.40	122.06
	60	81.89	105.41	223.03
	90	98.81	122.68	253.02
II	30	38.45	58.05	83.04
	60	46.07	77.21	133.48
	90	68.03	82.40	192.86
III	30	19.46	33.51	63.02
	60	24.83	54.98	123.18
	90	31.73	69.02	184.87
IV	30	15.84	35.70	80.41
	60	24.08	53.13	122.80
	90	26.24	64.55	185.34

* Contenido inicial (mg/100 ml):

Lote I: 62.42 Lote II: 40.92 Lote III: 19.44 Lote IV: 16.96

Tabla XIV. Concentración de β -lactoglobulina expresada en (mg/100ml) durante el almacenamiento de los cuatro lotes de leche estudiados*.

Lote	Almacenamiento (Días)	Temperatura (°C)			
		20	30	40	50
I	30	4.18	7.9	4.04	2.90
	60	2.09	6.23	3.76	--
	90	2.83	4.12	4.36	--
II	30	10.11	8.30	6.97	6.24
	60	11.55	10.17	13.69	--
	90	10.0	15.73	12.15	--
III	30	32.14	26.93	33.70	31.13
	60	34.68	24.25	35.26	12.83
	90	41.40	27.14	37.83	9.37
IV	30	35.02	48.82	36.78	31.74
	60	37.26	47.19	31.0	12.32
	90	46.25	42.78	39.18	--

*Contenido inicial (mg/100 ml):

Lote I: 3.46 Lote II: 11.15 Lote III: 39.56 Lote IV: 34.80

Tabla XV. Contenido en furosina expresada en mg/l del SMUF con lactosa y α -acetil-lisina durante el almacenamiento*.

a_w	Almacenamiento (Días)	Temperatura (°C)		
		20	30	50
0.33	20	34.3	149.4	2309.2
	40	98.6	538.4	3081.3
	60	99.0	684.7	3276.2
	80	96.0	704.5	2755.3
	100	106.3	891.4	2304.2
0.44	20	-	495.2	1708.6
	40	-	827.8	1849.3
	60	-	731.3	1644.4
	80	-	765.7	1202.0
	100	-	777.5	1126.2
0.65	20	-	35.9	1134.4
	40	-	68.0	1534.4
	60	-	113.5	1440.0
	80	-	140.0	974.9
	100	-	224.2	717.2

*Contenido inicial de furosina: 32.85 mg/l

Tabla XVI. Contenido en lactulosa (Lu) expresada como mg Lu/100 mg lactosa en el SMUF con lactosa y α -acetil-lisina durante el almacenamiento*.

a_w	Almacenamiento (Días)	Temperatura (°C)		
		20	30	50
0.33	20	0.06	0.16	0.48
	40	0.05	0.20	0.62
	60	0.08	0.12	0.69
	80	0.14	0.14	0.89
	100	0.22	0.23	0.71
0.44	20	-	0.35	0.26
	40	-	0.36	0.31
	60	-	0.22	0.27
	80	-	0.07	0.28
	100	-	0.14	0.31
0.65	20	-	0.06	0.41
	40	-	0.07	0.46
	60	-	0.09	0.19
	80	-	0.11	0.23
	100	-	0.09	0.16

*Contenido inicial de lactulosa: 0.02 mg/100 mg lactosa

Tabla XVII. Valores de pH en el SMUF con lactosa y α -acetil-lisina durante el almacenamiento*.

a _w	Almacenamiento (Días)	Temperatura (°C)		
		20	30	50
0.33	20	6.74	6.79	5.54
	40	6.69	6.70	5.31
	60	6.71	6.70	5.21
	80	6.74	6.73	5.03
	100	6.76	6.74	4.92
0.44	20	-	6.53	5.10
	40	-	6.47	4.77
	60	-	6.48	4.70
	80	-	6.48	4.68
	100	-	6.45	4.63
0.65	20	-	6.73	4.95
	40	-	6.58	4.45
	60	-	6.51	4.31
	80	-	6.51	4.18
	100	-	6.29	4.20

*pH inicial: 6.77

Tabla XVIII. Contenido en lactulosa (Lu) expresada como mg Lu/100 mg lactosa en el SMUF con lactosa durante el almacenamiento*.

a _w	Almacenamiento (Días)	Temperatura (°C)		
		20	30	50
0.33	20	0.13	0.21	0.17
	40	0.14	0.26	0.18
	60	0.09	0.13	0.26
	80	0.13	0.15	0.15
	100	0.06	0.06	0.21
0.44	20	-	0.12	0.21
	40	-	0.14	0.23
	60	-	0.13	0.34
	80	-	0.07	0.16
	100	-	0.14	0.22
0.65	20	-	0.04	0.15
	40	-	0.05	0.19
	60	-	0.16	0.16
	80	-	0.06	0.11
	100	-	0.03	0.09

*Contenido inicial de lactulosa : 0.03 mg/100 mg de lactosa

Tabla XIX. Valores de pH en el SMUF con lactosa durante el almacenamiento*.

a _w	Almacenamiento (Días)	Temperatura (°C)		
		20	30	50
0.33	20	6.74	6.79	5.54
	40	6.69	6.70	5.31
	60	6.71	6.70	5.21
	80	6.74	6.73	5.03
	100	6.76	6.74	4.92
0.44	20	-	6.53	5.10
	40	-	6.47	4.77
	60	-	6.48	4.70
	80	-	6.48	4.68
	100	-	6.45	4.63
0.65	20	-	6.73	4.95
	40	-	6.58	4.45
	60	-	6.51	4.31
	80	-	6.51	4.18
	100	-	6.29	4.20

*pH inicial: 6.67

Tabla XX. Contenido en furosina, expresado en mg/l, de la leche en polvo desnatada durante el almacenamiento*.

a _w	Almacenamiento (Días)	Temperatura (°C)		
		20	30	50
0.33	20	215.1	183.2	764.4
	40	192.6	190.2	1042.6
	60	194.1	231.7	1033.9
	80	198.5	235.2	1039.6
	100	216.1	262.3	-
0.44	20	-	561.1	1282.2
	40	-	618.2	1198.1
	60	-	778.5	1079.3
	80	-	753.4	1033.3
	100	-	815.7	1033.7
0.65	20	-	587.8	997.6
	40	-	633.2	673.5
	60	-	722.3	654.4
	80	-	632.3	548.7
	100	-	760.3	502.8

*Contenido inicial de furosina: 98.3 mg/l

Tabla XXI. Variación del contenido en lactulosa (mg/100ml) durante el almacenamiento de leche en polvo desnatada a diferentes a_w y temperaturas*.

a_w	Almacenamiento (Días)	Temperatura (°C)		
		20	30	50
0.33	20	18.65	21.42	58.47
	40	17.94	20.84	62.24
	60	17.18	21.51	64.53
	80	13.31	10.83	68.31
	100	8.15	12.59	75.71
0.44	20	-	14.16	35.14
	40	-	13.88	37.82
	60	-	13.78	38.29
	80	-	13.51	39.33
	100	-	18.68	44.90
0.65	20	-	20.18	30.48
	40	-	17.63	28.35
	60	-	16.66	26.79
	80	-	10.40	28.74
	100	-	9.33	17.26

*Contenido inicial de lactulosa: 7.41 mg/100 ml

Tabla XXII. Valores de pH en la leche en polvo desnatada durante el almacenamiento*.

a _w	Almacenamiento (Días)	Temperatura (°C)		
		20	30	50
0.33	20	6.43	6.50	6.43
	40	6.56	6.59	6.45
	60	6.48	6.52	6.38
	80	6.49	6.54	6.35
	100	6.50	6.51	6.33
0.44	20	-	6.47	6.11
	40	-	6.54	6.00
	60	-	6.47	5.91
	80	-	6.49	5.90
	100	-	6.49	5.87
0.65	20	-	6.35	5.72
	40	-	6.39	5.54
	60	-	6.33	5.30
	80	-	6.32	5.14
	100	-	6.21	5.08

*pH inicial: 6.54

Tabla XXIII. Contenido en furosina, expresado en mg/l, de la leche en polvo desnatada tratada previamente con CO₂ durante el almacenamiento*.

a _w	Almacenamiento (Días)	Temperatura (°C)		
		20	30	50
0.33	20	107.2	-	-
	40	200.4	-	-
	60	208.4	-	-
	80	215.6	-	-
	100	212.3	-	-
0.44	20	-	250.1	1035.1
	40	-	576.6	1076.6
	60	-	853.1	1099.6
	80	-	798.3	1057.0
	100	-	793.2	1086.1
0.65	20	-	-	-
	40	-	-	-
	60	-	-	-
	80	-	-	-
	100	-	-	-

*Contenido inicial de furosina: 97.48 mg/l

Tabla XXIV. Contenido en lactulosa, expresado en mg/100 ml de la leche en polvo tratada previamente con CO₂, durante el almacenamiento*.

a _w	Almacenamiento (Días)	Temperatura (°C)		
		20	30	50
0.33	20	7.52	-	-
	40	6.84	-	-
	60	7.76	-	-
	80	8.70	-	-
	100	8.89	-	-
0.44	20	-	12.41	32.82
	40	-	14.16	37.82
	60	-	13.39	40.11
	80	-	15.50	42.46
	100	-	14.87	42.65
0.65	20	-	-	-
	40	-	-	-
	60	-	-	-
	80	-	-	-
	100	-	-	-

*Contenido inicial de lactulosa: 6.36 mg/100 ml

Tabla XXV. Valores de pH en la leche en polvo desnatada tratada previamente con CO₂ durante el almacenamiento*.

a _w	Almacenamiento (Días)	Temperatura (°C)		
		20	30	50
0.33	20	6.72	-	-
	40	6.70	-	-
	60	6.66	-	-
	80	6.58	-	-
	100	6.59	-	-
0.44	20	-	6.69	6.25
	40	-	6.69	6.12
	60	-	6.63	6.03
	80	-	6.66	5.99
	100	-	6.61	5.99
0.65	20	-	-	-
	40	-	-	-
	60	-	-	-
	80	-	-	-
	100	-	-	-

*pH inicial: 6.70

Tabla XXVI. Contenido en furosina, expresado en mg/l, del concentrado de proteínas de suero (WPC) durante el almacenamiento*.

a _w	Almacenamiento (Días)	Temperatura (°C)		
		20	30	50
0.33	20	205.4	239.8	1085.7
	40	369.2	418.4	1784.4
	60	378.4	448.0	1466.8
	80	384.1	475.0	1466.9
	100	378.2	517.2	1564.7
0.44	20	-	731.8	1666.1
	40	-	971.9	2083.2
	60	-	1079.8	1511.1
	80	-	1122.6	1422.4
	100	-	1214.8	1357.9
0.65	20	-	864.9	1273.2
	40	-	992.1	1128.2
	60	-	1003.4	919.8
	80	-	980.0	782.5
	100	-	1097.9	723.0

*Contenido inicial de furosina: 162.15 mg/l

Tabla XXVII. Contenido en lactulosa, expresado en mg/100 ml del concentrado de proteínas de suero (WPC) durante el almacenamiento*.

a_w	Almacenamiento (Días)	Temperatura (°C)		
		20	30	50
0.33	20	8.51	8.16	31.28
	40	8.10	7.13	34.75
	60	7.28	8.84	42.52
	80	5.87	11.00	48.61
	100	4.04	5.61	58.81
0.44	20	-	14.18	60.31
	40	-	13.31	66.90
	60	-	15.02	73.72
	80	-	13.77	85.47
	100	-	15.68	96.17
0.65	20	-	8.75	35.37
	40	-	7.70	30.72
	60	-	8.02	15.44
	80	-	8.87	19.47
	100	-	5.81	25.52

*Contenido inicial de lactulosa: 6.19 mg/100 ml

Tabla XXVIII. Valores de pH del concentrado de proteínas de suero (WPC) durante el almacenamiento*.

a _w	Almacenamiento (Días)	Temperatura (°C)		
		20	30	50
0.33	20	5.91	6.03	5.78
	40	5.95	5.98	5.67
	60	5.75	5.86	5.58
	80	5.60	5.80	5.54
	100	5.59	5.87	5.58
0.44	20	-	6.02	5.35
	40	-	6.01	5.12
	60	-	5.95	5.02
	80	-	5.90	4.97
	100	-	6.01	5.02
0.65	20	-	5.51	5.05
	40	-	5.51	4.93
	60	-	5.31	4.83
	80	-	5.29	4.81
	100	-	5.28	4.79

* pH inicial: 6.05

IV. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

1ª. La diferenciación entre leches UHT directo e indirecto en base a los contenidos en lactulosa, furosina y β -lactoglobulina, no puede establecerse sin conocer las condiciones de conservación desde la fecha de fabricación.

2ª. La actividad enzimática residual de la leche UHT, puede ocasionar una disminución en la formación de lactulosil-lisina, precursor de la furosina.

3ª. El proceso de atomización origina cantidades de furosina del orden de 10 mg/l. Las elevadas concentraciones de furosina encontradas en leche en polvo comerciales se originan fundamentalmente durante la conservación.

4ª. El contenido de lactulosa en leches en polvo es inferior al de las leches UHT, y se mantiene prácticamente constante en condiciones de conservación adecuadas.

5ª. El descenso del pH durante la conservación de leche en polvo se debe fundamentalmente al progreso de la reacción de Maillard, y en menor medida, a la degradación de la lactosa vía Lobry de Bruin-Alberda van Eikenstein.

6ª. La adición de CO_2 antes del proceso de atomización disminuye la formación de furosina y lactulosa durante la conservación de la leche en polvo.

7ª. La determinación de furosina puede servir como indicador del progreso de las etapas iniciales de la reacción de Maillard, sin embargo para estados avanzados de dicha reacción, gran parte del precursor de furosina, lactulosil-lisina, se degrada, disminuyendo considerablemente el contenido en furosina.

8ª. La formación de furosina y lactulosa durante la conservación es más rápida en el concentrado de proteínas de suero en polvo que en leche en polvo.

9ª. De los parámetros estudiados, la relación Furosina/Lactulosa es la más adecuada para detectar la presencia de leche en polvo reconstituida en leche UHT.

V. BIBLIOGRAFIA

REFERENCIAS CITADAS

- Adachi, S. (1957). *Tohoku J. Agr. Research.* 8: 79.
- Adachi, S. (1958). *Nature* 181: 840.
- Adachi, S. (1959). 15th International Dairy Congress. London. 3: 1686.
- Adachi, S., y S. Patton (1961). *J. Dairy Sci.* 44: 1375.
- Adachi, S. (1965). *Anal. Chem.* 37:896.
- Adhikari, A.K., D. Sahai, y O.N. Mathur (1991). *Le Lait.* 71: 555.
- Aeschbacher, H.U. (1986) In *Proceedings of Euro Food Tox II.* p. 112. Zurich.
- Ahmed, M.U., S.R. Thorpe, y J.W. Baynes (1985) *Fed. Proc.* 44: 1621.
- Ahmed, M.U. S.R. Thorpe y J.W. Baynes (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 4889.
- Baynes, J.W., M.U. Ahmed, C.I. Fisher, C.J. Hull, Th.A. Lehman, N.G. Watkins y S.R. Thorpe (1986) In *Amino-Carbonyl reactions in food and biological systems (Proc. 3rd Int. Symp. on the Maillard Reaction, Fuji, Japan, 1985)* Ed. M. Fujimaki, M. Namiki y H. Kato. Elsevier. Amsterdam. p. 421.
- American Dry Milk Institute (1971) *Determination of undenatured whey protein nitrogen in nonfat dry milk. Standard for grades of dry milks. Bulletin 916.*
- Andreini, R., G. Chiodi, I. De Noni, P. Resmini, G. Batelli, L. Cecchi, R. Todesco, y T.M.P. Cattaneo (1990). *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* 41: 472.

- Andrews, A.T. (1975). J. Dairy Sci. 42: 89.
- Andrews, A.T., y G.C. Cheeseman (1972). J. Dairy Res. 39: 395.
- Andrews, G.R. (1984). J. Society Dairy Technol. 37: 92.
- Andrews, G.R. (1986). J. Dairy Res. 53: 665.
- Andrews, G.R. (1987). J. Society Dairy Technol. 40: 8.
- Andrews, G.R., y S.V. Morant (1987). J. Dairy Res. 54: 493.
- Andrews, G.R., y S.K. Prasad (1987). J. Dairy Res. 54: 207.
- Andrews, A.T., M.D. Taylor y A.J. Owen (1985) J. Chromatogr. 348: 177.
- Aoki, T., H. Suzuki, y T. Imamura (1975). Milchwissenschaft. 30: 30.
- Aschaffenburg, R., y J. Drewry (1959). XV Int. Dairy Congress. (London). 3: 1631.
- Ashoor, S.H., y J.B. Zent (1984). J. Food Sci. 49: 1206.
- Baldwin, A.J. y J.D. Ackland (1991). Neth. Milk Dairy J. 45: 169.
- Ben-Gara, I. y G. Zimmerman (1972). J. Food Sci. Technol. 9: 113.
- Bernal, V. y P. Jelen (1984) J. Dairy Sci. 67: 2452.
- Bernal, V. y P. Jelen (1985) J. Dairy Sci. 68: 2847.
- Bican, P. (1985) Experientia. 41: 958.
- Bilik, V., L. Petrus y L. Kuniat (1979) Chem. Zvesti. 33: 110.

- Brons, C., y C. Olieman (1983). J. Chromatog. 259: 79.
- Bruggeman, J. y H. Erbersdobler (1967). Z. Lebensmittel unters. u.-Forsch. 137: 137.
- Burton, H. (1984). J. Dairy Res. 51: 341.
- Burton, H.S. y D.J. McWeeney (1963). Nature. 197: 266.
- Burvall, A., N.-G. Asp, A. Bosson, C. San Jose, y A. Dahlqvist (1978). J. Dairy Res. 45: 381.
- Büser, W., y H.F. Erbersdobler (1985). J. Chromatog. 346: 363.
- Büser, W., y H.F. Erbersdobler (1986). Milchwissenschaft. 41: 785.
- Caric, M, D. Gavaric y S. Milanovic (1984). Proceedings of the seminar "Challenges to Contemporary Dairy Analytical Techniques". Reading.
- Carpenter, K.J. (1960). Biochem. J. 77: 604.
- Carroll, R.J., M.P. Thompson y P. Melnychyn (1971). J. Dairy Sci. 54: 1245.
- Carubelli, R. (1966) Carbohydr. Res. 2: 480.
- Cefalu, W.T, A. Bell-Farrow, Z.Q. Wang y S. Ralapati (1991) Carbohydrate Research. 215: 117.
- Chang, K.-S., y D.B. Min (1986). J. Korean Agricultural Chemical Society 29: 190.
- Chang, S., J.W. Ayres, y W.E. Sandine (1985). J. Dairy Sci. 68: 2840.

- Chiang, G.H. (1983). J. Agric. Food Chem. 31: 1373.
- Chiang, G.H. (1988). J. Agric. Food Chem. 36: 506.
- Choi, R.P., A.F. Koncus, C.M. O'Malley, y B.W. Fairbanks (1949). J. Dairy Sci. 32: 580.
- Corbett, W.M., y J. Kenner (1953). Journal of Chemical Society. 2245.
- Corzo, N., M. Ramos, A. Olano, M. Calvo, L. Amigo y I. Martínez-Castro (1988). Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 11: 175.
- Creamer, L.K., y A.R. Matheson (1980). New Zealand J. Dairy Sci. Technol. 15: 37.
- Dalgleish, D.G. (1990). J. Agric. Food Chem. 38: 1995.
- Dannenbergh, F., y H.G. Kessler (1988). Milchwissenschaft. 43: 3.
- De Groot, A.P., P. Slump, V.J. Feron y L. Van Beeck (1976) J. Nutr. 106: 1527.
- De Koning, P.J. y P.J. van Rooijen (1982) J. Dairy Res. 49: 725.
- De Koning, P.J., P.J. van Rooijen y J.T.M. Draaisma (1976) Milchwissenschaft. 31: 261.
- De Vilder, J., R. Van Renterghem, y R. Moermans (1988). Belgian J. Food Chem. Biotechnol. 43: 3.
- De Wit, J.N. (1981). Neth. Milk Dairy J. 35: 47.
- De Wit, J.N., y G. Klarenbeek (1984). J. Dairy Sci. 67: 2701.
- De Wit, J.N., G. Klarenbeek, y M. Adamse (1986). Neth. Milk Dairy J. 40: 41.

Dehn-Muller, B., B. Muller, y H.F. Erbersdobler (1991).
Milchwissenschaft 46: 431.

Demaimay, M. y C. Baron (1978) Lait, 575-576: 234.

Desrosiers, T., y L. Savoie (1991). J. Dairy Res. 58: 431.

Desrosiers, T., L. Savoie, G. Bergeron, y G. Parent (1989). J.
Agric. Food Chem. 37: 1385.

Dimmena, G.P. y H.J. Segall (1981) J. Liq. Chromatogr. 4: 639.

Diosady, LL., I. Bergen y V.R. Harwalkar (1980)
Milchwissenschaft. 35: 671.

Doi, H., S. Ideno, F. Ibuki, y M. Kanamori (1983). Biol. Chem.
47: 407.

Drexel, H., H. Klocker, J.R. Patsch, C. Breier, y H. Braunsteiner
(1987). Clinical Chemistry 33: 1656.

Driessen, F.M. (1983) Lipases and proteinases in milk.
Occurrence, heat inactivation and their importance for the
keeping quality in milk products. (Tesis, Netherlands Institut
voor Zwivelonderzoek).

Eichner, K., y M. Ciner-Doruk (1981). Prog. Food Nutr. Sci. 5:
115.

Eichner, K., y M. Karel (1972). J. Agric. Food Chem. 20: 218.

Eie, A.T., G. Rysstad y H.B. Castberg (1987) Nordeuropaeisk
Mejeritidsskrift. 3-4: 87.

Elfagm, A.A., y J.V. Wheelock (1977). J. Dairy Res. 44: 367.

Erbersdobler, H.F. (1970). Milchwissenschaft. 25: 280.

Erbersdobler, H.F. (1977). In Protein Crosslinking. Nutritional and medical consequences. Ed. M. Friedman. Plenum Press, New York. p.367.

Erbersdobler, H.F. (1979). Milchwissenschaft. 34: 325.

Erbersdobler, H.F. (1986) Twenty years of furosine- better knowledge about the biological significance of the Maillard reaction in food and nutrition. In Amino carbonyl reactions in food and biological systems. pag. 481. ed. M. Fujimaki, M. Namiki y H. Kato. Elsevier. Amsterdam.

Erbersdobler, H., y H. Zucker (1966). Milchwissenschaft. 21: 564.

Erbersdobler, H.F., B. Dehn, A. Nangpal, y H. Reuter (1987). J. Dairy Res. 54: 147.

Erbersdobler, H.F., B. Holstein, y E. Lainer (1979). Z. Lebensm. Unters. Forsch. 168: 6.

Ersser, R.S., y J.D. Mitchell (1984). J. Chromatog. 307: 393.

Fairbairn, D.J. y B.A. Law (1986). J Dairy Res. 53: 457.

Federación Internacional de Lechería (1972) Norma FIL nº 17A.

Ferretti, A., V.P. Flanagan, y J.M. Ruth (1970). J. Agric. Food Chem. 18: 13.

Fink, R., y H.G. Kessler (1986). Milchwissenschaft 41: 638.

Fink, R., y H.G. Kessler (1988). Milchwissenschaft 43: 275.

Finot, P.A. (1973) Non-enzymic browning. In Proteins in human nutrition. Ed. Porter, J.W.G y B.A. Rolls, Academic Press. London. p. 501.

Finot, P.A. (1983). Symposium on role of milk proteins in human nutrition. (Kiel). 357.

Finot, P.A., J. Bricout, R. Viani, y J. Mauron (1968). *Experientia*. 24: 1097.

Finot, P.A., E. Bujard, F. Mottu y J. Mauron (1977) In *Protein Crosslinking. Nutritional and medical consequences*. Ed. M. Friedman. Plenum Press, New York. p. 343.

Finot, P.A., R. Deutsch, y E. Bujard (1981). *Prog. Fd. Nutr. Sci.* 5: 345.

Finot, P.A., y D.E. Furniss (1986) Nephrocytomegaly in rats induced by Maillard reaction products: the involvement of metal ions. In *Amino-carbonyl reactions in food and biological systems*. Ed. M. Fujimaki, M. Namiki, and H. Kato. Amsterdam: Elsevier, p. 493.

Finot, P.A., y E. Magnenat (1981). *Prog. Food Nutr. Sci.* 5: 193.

Finot, P.A., y J. Mauron (1969). *Helvetica Chimica Acta*. 52: 1488.

Finot, P.A., y J. Mauron (1972). *Helvetica Chimica Acta* 55: 1153.

Finot, P.A., R. Viani, J. Bricout, y J. Mauron (1969). *Experientia*. 25: 134.

Ford, J.E., y C. Shorrock (1971). *Br. J. Nutr.* 26: 311.

Fritsch, R.J. y H. Klostermeyer (1981) *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 172: 440.

Gaafar, A.M. (1991). *Milchwissenschaft* 46 (4): 233.

- Garret, J.M., R.A. Stairs, y R.G. Annett (1988). *J. Dairy Sci.* 71: 10.
- Geier, H., y H. Klostermeyer (1980). *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung.* 171: 443.
- Geier, H., y H. Klostermeyer (1983). *Milchwissenschaft.* 38: 475.
- González-LLano, D., C. Polo y M. Ramos (1990). *Lait.* 70: 255.
- Greig, B.D., y G.A. Payne (1985). *J. Dairy Res.* 52: 409.
- Gupta, B.B. (1983) *J. Chromatogr.* 282: 463.
- Haque, Z., y J.E. Kinsella (1988). *J. Dairy Res.* 55: 67.
- Harwalkar, V.R. (1982) Age gelation of sterilized milks. In *Developments in dairy Chemistry.* Ed. I.P.F. Fox London, U.K.: *Appl. Sci.*, p. 229.
- Hashiba, H. (1982). *Agric. Biol. Chem.* 46: 547.
- Haverkamp, J., J.P. Kamerling y J.F.G. Vliegenthart (1971) *J. Chromatogr.* 59: 281.
- Henle, T., H. Walter, y H. Klostermeyer (1991a). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 119.
- Henle, T., H. Walter, I. Krause, y H. Klostermeyer (1991b). *Int. Dairy Journal* 1: 125.
- Heyns, K., J. Heukeshoven, y K.H. Brose (1968). *reactions.* 7: 628.
- Hill, A.R., B. Manji, Y. Kakuda, C. Myers y D.M. Irvine (1987). *Milchwissenschaft.* 42: 693.
- Hillier, R.M. (1976). *J. Dairy Res.* 43: 259.

- Hillier, R.M., y R.L.J. Lyster (1979). *J. Dairy Res.* 46: 95.
- Hiraoka, Y., T. Segawa, K. Kuwajima, S. Sugai y N. Murai (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95: 1095.
- Hodge, J.E. (1953). *J. Agric. Food Chem.* 1: 928.
- Hodge, J.E. (1955) The Amadori rearrangement. *Advances in Carbohydrate Chem.* 10: 169.
- Horak, F.P. y H.G. Kessler (1981). *Milchwissenschaft.* 36: 547.
- Hostettler, H., K. Imhof y J. Stein (1965). *Milchwissenschaft.* 20: 189.
- Hsu, K.-H., y O. Fennema (1989). *J. Dairy Sci.* 72: 829.
- Humphrey, R.S. y L.J. Newsome (1984) *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.* 19: 197.
- Hunziker, H.G., y N.P. Tarassuk (1965). *J. Dairy Sci.* 48: 733.
- Hurrell, R.F., y K.J. Carpenter (1975). *Brit. J. Nutr.* 33: 101.
- Hurrell, R.F., P.A. Finot, y J.E. Ford (1983). *Br. J. Nutr.* 49: 343.
- Jagerstad, M., A. Laser Reutersward, R. Olsson, S. Grivas, T. Nyhammar, K. Olsson, y A. Dahlqvist (1983). *Food Chem.* 12: 255.
- Jenness, R., y J. Koops (1962). *Neth. Milk Dairy J.* 16: 153.
- Jimenez-Perez, S., N. Corzo, F.J. Morales, T. Delgado, y A. Olano (1992). *Journal of Food Protection.* 55: 304.

Johnson, P.E., G. Lykken, J. Mahalko, D. Milne, L. Inman, H.H. Sandstead, W.J. Garcia, y G.E. Inglett (1983) The effect of browned and unbrowned corn products on absorption of zinc, iron and copper in humans. In *The Maillard reaction in foods and nutrition*. Ed. G.R. Waller and M.S. Feather. Washington, D.C.: American Chemical Society, p. 349.

Kakade, M.L., y I.E. Liener (1969). *Anal. Biochem.* 27: 273.

Kato, Y., T. Matsuda, N. Kato, y R. Nakamura (1988). *J Agric. Food Chem.* 36: 806.

Kato, Y., T. Matsuda, N. Kato, K. Watanabe, y R. Nakamura (1986). *J. Agric. Food Chem.* 34: 351.

Kato, Y., K. Watanabe, y Y. Sato (1981). *J. Agric. Food Chem.* 29: 540.

Keeney, M., y R. Bassette (1959). *J. Dairy Sci.* 42: 945.

Kessler, H.G., y R. Fink (1986). *J. Food Sci.* 51: 1105.

Kiesecker, F.G., y P.T. Clarke (1984). *Aust. J. Dairy Technol.* 39: 74.

Klostermeyer, H., E. Herlitz, R.H. Jürgens, E.H. Reimerdes y J. Thomasow (1978) *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte.* 30: 295.

Kneifel, W. y F. Ulberth (1985). *Milchwissenschaft.* 40: 265.

Konietzko, M. (1981) *Abtötung von Bacillus stearothermophilus und Bildung von Gesamt-HMF während des Ultrahocherhitzens von Vollmilch.* (Ph. D. thesis, Univ. Kiel).

Kuhlmann, B., H. Klostermeyer, y A. Fries (1991). *Milchwissenschaft.* 46: 555.

- Labuza, T.P. (1980). *Food Technol.* 34: 36.
- Labuza, T.P., y M. Saltmarch (1981). *J. Food Sci.* 47: 92.
- Labuza, T.P., S.R. Tannenbaum, y M. Karel (1970). *Food Technol.* 24: 543.
- Laker, M.F. (1979) *J. Chromatogr.* 163: 9.
- Larson, B.L., y G.D. Roller (1955). *J. Dairy Sci.* 38: 351.
- Law, B.A. (1979). *J. Dairy Res.* 46: 573.
- Lea, C.H. (1948). *J. Dairy Res.* 15: 369.
- Lea, C.H., y R.S. Hannan (1949). *Biochim. Biophys. Acta.* 3: 313.
- Lerici, C.R., D. Barbanti, M. Manzano, y S. Cherubin (1990). *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 23: 289.
- Lewis, V.M., y C.H. Lea (1950). *Biochim. Biophys. Acta* 4: 532.
- Liardon, R., D. de Weck-Gaudard, G. Philipposian y P.A. Finot (1987) *J. Agric. Food Chem.* 35: 427.
- Li-Chan, E. (1983a). *J. Food Sci.* 48: 47.
- Li-Chan, E. (1983b). *J. Dairy Sci.* 66: 1843.
- Lindemann-Schneider, U., y O. Fennema (1989). *J. Dairy Sci.* 72: 1740.
- Loncin, M., J.J. Bimbenet, y J. Lengès (1968). *J. Food Technol.* 3: 131.

López-Fandiño, R. (1991) Proteolisis de las caseínas y su incidencia en la tecnología de productos lácteos. (Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia.)

Lyster, R.L.J. (1970) The denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in heated milk. J. Dairy Res. 37: 233.

Maillard, L.C. (1912). C.R. Acad. Sci. 154: 66.

Malatje, S.M. (1986) Tesis Doctoral. Univ. Giessen.

Manji, B., y Y. Kakuda (1986). Can. Inst. Food Sci. Technol. 19: 163.

Manji, B., Y. Kakuda, y D.R. Arnott (1986). J. Dairy Sci. 69: 2994.

Martinez-Castro, I., M.M. Calvo, y A. Olano (1987). Chromatographia. 23: 132.

Martinez-Castro, I., y A. Olano (1978). Revista Espanola de Lecheria. 110: 213.

Martinez-Castro, I., y A. Olano (1980). Milchwissenschaft. 35: 5.

Martinez-Castro, I., A. Olano, y N. Corzo (1986). Food Chem. 21: 211.

Mauron, J. y E. Bujard (1964) In Proceedings 6th Int. Cong. Nutr. Edinburgh.

Melo, T.S. y A.P. Hansen (1978). J. Dairy Res. 61: 710.

Mendez, A., y A. Olano (1979). Dairy Science Abstracts. 41: 531.

- Mittal, S.B., J.A. Hourigan, y J.G. Zadow (1989). Aust. J. Dairy Technol. 43: 88.
- Moller, A.B. (1981). Prog. Food Nutr. Sci. 5: 357.
- Moller, A.B., A.T. Andrews, y G.C. Cheesemann (1977). J. Dairy Res. 44: 267.
- Molnar-Perl, I., M. Pinter-Szakacs, R. Wittmann, M. Reutter, y K. Eichner (1986). J. Chromatog. 361: 311.
- Montgomery, E.M., y C.S. Hudson (1930). J. Am. Chem. Soc. 52: 2101.
- Morr, C.V. (1974). J. Dairy Sci. 58: 977.
- Mottar, J. (1981). Le Lait 61: 503.
- Mottar, J., y M. Naudts (1979). Le lait 588: 476.
- Mrowetz, G. y H. Klostermeyer (1977) Milchwissenschaft. 32: 9.
- Muir, D.D., J. Abbot, y A.W.M. Sweetsur (1978). J. Food Technol. 13: 45.
- Müller, M., J. Walker-Smith, D.J. Smerling, H.Ch. Curtius y A. Prader (1969) Clin. Chim. Acta. 24: 45.
- Murphy, B.F. y D.M. Mulvihill (1988) J. Soc. Dairy Technol. 41: 22.
- Nakayama, T., F. Hayase, y H. Kato (1980). Agric. Biol. Chem. 44: 1201.
- Nangpal, A., y H. Reuter (1987). Milchwissenschaft 42: 289.

- Nangpal, A., y H. Reuter (1990). Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 42: 65.
- Narayan, K.A. y M.E. Cross (1992). J. Food Sci. 57: 206.
- Nikolov, Z.L., M.M. Meagher, y P.J. Reilly (1985). J. Chromatog. 319: 51.
- Nikolov, Z.L. y P.J. Reilly (1983) J. Chromatogr. 254: 157.
- Noh, B., T. Richardson, and L.K. Creamer (1989). J. Food Sci. 54: 889.
- Nursten, H.E. (1980). Food Chem. 6: 263.
- O'Brien, J., y P.A. Morrissey (1989) Bull. Intern. Dairy Fed. 8: 53.
- Okamoto, M. y R. Hayashi (1985) Agric. Biol. Chem. 49: 1683.
- Olano, A., y M.M. Calvo (1989). Food Chem. 34: 239.
- Olano, A., G. Santa-Maria, N. Corzo, M.M. Calvo, I. Martinez-Castro, y M.L. Jimeno (1992). Food Chem. 43: 351.
- Parris, N., y M.A. Baginski (1991). J. Dairy Sci. 74: 58.
- Parris, N., R.A. Barford, A.E. White y S.M. Mozersky (1989). J. Food Sci. 54: 1218.
- Parrish, F.W., K. Hicks, y L. Doner (1980). J. Dairy Sci. 63: 1809.
- Patton, S. (1955). J. Dairy Sci. 38: 457.
- Pearce, R.J. (1983). Aust. J. Dairy Technol. 9: 114.

Pearce, R.J. (1989). Bulletin of the International Dairy Federation. 238: 17.

Petriella, C., S.L. Resnik, R.D. Lozano, y J. Chirife (1985). J. Food Sci. 50: 622.

Pham, C.B., y J.C. Cheftel (1990). Food Chem. 37: 251.

Pokorny, J., L. Pilkova, J. Davidek, y H. Valentova (1988). Die Nahrung 32: 767.

Pol, G., y E.H. Groot (1960). Neth. Milk Dairy J. 14: 158.

Pomeranz, Y., J.A. Johnson y J.A. Schllenberger (1962). J. Food Sci. 27: 350.

Potman, R.P., y A.T.H. Van Wijk (1989) Thermal generation of aromas. Ed. Parlimen, T.H; McGorrin, R y ChiT, p. 182.

Powell, R.C.T., y A.A. Spark (1971). J. Sci. Food Agric. 22: 596.

Powrie, W.D., C.H. Wu, M.P. Rosin, y H.F. Stich (1981). J. Food Sci. 46: 1433.

Rawson, N., y R.R. Mahoney (1983). Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. 16: 313.

Reineccius, G.A., T.E. Kavanagh y P.G. Keeney (1970) J. Dairy Sci. 53: 1018.

Renner, E. (1988). J. Dairy Res. 55: 125.

Renner, E. y H. Dorguth (1980). Deutsche Milchwirtschaft. 31: 505.

Resmini, P., L. Pellegrino, R. Andreini, y F. Prati (1989). Sci. Tecn. Latt.-Cas. 40: 7.

Resmini, P., L. Pellegrino, y G. Battelli (1990). Ital. J. Food Sci. 3: 173.

Resmini, P., L. Pellegrino, J.A. Hogenboom, y R. Andreini (1989). Ital. J. Food Sci. 3: 51.

Resmini, P., L. Pellegrino, F. Masotti, A. Tirelli, y F. Prati (1992). Sci. Tecn. Latt.-Cas. 43: 169.

Richards, E.L. (1963). J. Dairy Res. 30: 223.

Richards, E.L., y M.R. Chandrasekhara (1960). J. Dairy Res. 27: 59.

Ringe, M.L. y M.H. Love (1988). J. Food Sci. 53: 584.

Rowland, S.J. (1938). J. Dairy Res. 9: 42.

Ruegg, M., U. Moor, y B. Blanc (1977). J. Dairy Res. 44: 509.

Schleicher, E., y O.H. Wieland (1981). J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19: 81.

Schmidt, R. y E. Renner (1978) Lebensm. Wissens. Technol. 11: 244.

Schubler, U., y F. Ledl (1989). Z. Lebensm. Unters. Forsch. 189: 32.

Sekizawa, J., y T. Shibamoto (1986). Food Chem. Toxicol. 24: 987.

Sherr, B., C.M. Lee, y C. Jelesciewicz (1989). J. Agric. Food Chem. 37: 119.

Shinohara, K., N. Jahan, M. Tanaka, K. Yamamoto, R.T. Wu, H. Murakami, y H. Omura (1983). Mutat. Res. 122: 279.

- Singh, H. y L.K. Creamer (1991). J. Food Sci. 56: 238.
- Singh, H., y P.F. Fox (1985). J. Dairy Res. 52: 529.
- Singh, H y P.F. Fox (1986). J. Dairy Res. 53: 237.
- Singh, H., y P.F. Fox (1987). J. Dairy Res. 54: 509.
- Singh, R.R.B. y G.R. Patil (1990). Milchwissenschaft. 45: 367.
- Smits, P. y J.H. Van Brouwershaven (1980). J. Dairy Res. 47: 313.
- Steinig, J. y A. Montag (1982) Z. Lebensm. Unters. Forsch. 174: 453.
- Szolgyenyi, G.P., K.J.B. Winsauer, y E. Deutsch (1989). Monatshefte fur Chemie. 120: 1147.
- Tomarelli, R.M., R.J. Yuhas, A. Fisher, y J.R. Weaber (1985). J. Agric. Food Chem. 33: 316.
- Töter, D. (1979) Einfluss technologischer Varianten auf die Qualität der UHT-Milch. (Ph. D. thesis. Univ. of Giessen).
- Turner, L.G., H.E. Swaisgood, y A.P. Hansen (1978). J. Dairy Res. 61: 384.
- Valdicelli, L., E. Neviani y G.C. Emaldi (1986) Il Latte. 11: 953.
- Van den Bedem, J.W., y J. Leenheer (1988). Neth. Milk Dairy J. 42: 345.
- Van Boekel, M.A.J.S., y A.P. Arentsen-Stasse (1987). J. Chromatog. 389: 267.

Van Boekei, M.A.J.S., y Z. Rehman (1987). Neth. Milk Dairy J. 41: 297.

Van Mil, P.J.J.M. y J.A. Jans (1991). Neth. Milk Dairy J. 45: 145.

Verhaar, L.A.T.H., M.J.M. Van der Aalst, J.A.W.M. Beenackers, y B.F.M. Kuster (1979). J. Chromatog. 170: 363.

Visser, S., K.J. Slangen y H.S. Rollema (1986) Milchwissenschaft. 41: 559.

Walstra, P., y R. Jenness (1987) Química y física lactológica. Ed. Acribia. Zaragoza.

Warmbier, H.C., R.A. Schnickels, y T.P. Labuza (1976). J. Food Sci. 41: 981.

Zadow, J.G. (1970). Aust. J. Dairy Technol. 25: 123.

Zagrodzki, S., A. Kaulagowska y B.W. Krol (1968) Qual. Plantarum Matter. Veget. 16: 102