

APLICACIÓN DE TRES MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETECCIÓN DE SUERO DE QUESERÍA EN LECHE UHT COMERCIALIZADA EN LA CIUDAD DE MÉXICO

ACACIA RAMÍREZ AYALA, SALVADOR VEGA Y LEÓN, GUADALUPE PRADO FLORES y REY GUTIÉRREZ TOLENTINO

RESUMEN

Se determinó la presencia de suero de quesería en leches ultrapasteurizadas (UHT) comercializadas en la Ciudad de México mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cuarta derivada del espectro de absorción (UV-4^{DS}). Se analizaron un total de 30 muestras de leche UHT descremada durante los meses de septiembre, octubre y noviembre a razón de 10 muestras por mes, contrastando los valores encontrados por los tres métodos con los

de leche cruda auténtica adicionada con suero de quesería en diferentes niveles. El porcentaje de muestras positivas a suero de quesería analizadas por electroforesis, HPLC y UV-4^{DS} fue de 70, 50 y 90% respectivamente. Las técnicas utilizadas relacionadas con la detección y estimación del glicomacropéptido (GMP) por electroforesis o por HPLC y los resultados obtenidos indicaron que la cuantificación de la relación proteínas de suero/proteína total (PS/PT) por UV-4^{DS} fue un indicador más sensible a adiciones de suero de quesería.

En el campo de la calidad de los alimentos son de particular interés la leche y sus derivados, dada su importancia social y económica. La leche sigue siendo uno de los alimentos más importantes para el humano desde el punto de vista nutricional, por lo cual es necesario producir leche de alta calidad. Existe una demanda creciente en los elevados estándares de calidad requeridos por las autoridades sanitarias y por el público consumidor; sin embargo, el riesgo de adulteración con suero de quesería es alto en la región. Por esta razón, en diversos países se ha puesto especial atención en la reglamentación para uso en la elaboración de productos lácteos.

Las tecnologías desarrolladas en la industria láctea, tanto de concentración por membranas como de ultrafil-

tración, han hecho posible la elaboración de nuevos productos como los concentrados de proteínas de suero (lactosuero), que pueden ser utilizados como adulterantes en la leche (Bordin *et al.*, 2001). En México la importación de estos lactosueros ha ido en aumento en los últimos años; en 1997 se importaron 53 237ton con un valor de USD 40 591 000, cifra que en el 2006 subió a 72 427ton y un costo de USD 126 203 000. Este producto ha sido importado principalmente de los EEUU y de la UE (SIC, 2006) siendo una de las causas la tendencia de utilizar este producto como un medio para bajar costos y aumentar la rentabilidad en la elaboración de productos lácteos de menor calidad y bajos precios (FIRA, 2001).

La leche, como producto procesado, puede llegar al consumidor en

diferentes presentaciones y en cualquiera de ellas puede existir adulteración con diversos propósitos, entre otros obtener mayor rendimiento en el producto final. Por ello se ha dado especial atención a la detección de lactosueros adicionados de forma fraudulenta a la leche fluida, en especial a la leche ultrapasteurizada (UHT), cuyo consumo ha aumentado en México y otros países (Wolfshoon-Pombo, 1989; Sorensen, 1992; Recio *et al.*, 2000; SIAP, 2006).

La incorporación de sólidos procedentes de suero constituye una clara violación a la reglamentación vigente nacional (DOF, 2003) e internacional. Tanto en países de la UE como en América Latina, la adulteración de leche fluida con suero de quesería va en aumento, por lo cual conti-

PALABRAS CLAVE / Absorción UV / Adulteración / Electroforesis / Cromatografía / Leche UHT / Suero /

Recibido: 05/06/2008. Modificado: 11/06/2009. Aceptado: 12/06/2009.

Acacia Ramírez Ayala. Ingeniera en Alimentos y Maestra en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de México (UAM). Profesora Investigadora, UAM, México. Dirección: Departamento de Producción Agrícola y Animal, UAM, Unidad Xochimilco. 04960. Calzada del Hueso 1100. Coyoacán, DF, México. e-mail: acaram@correo.xoc.uam.mx

Salvador Vega y León. Químico Farmacéutico Biológico, UAM, México. Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad Iberoamericana, México. Doctor en Ciencias Veterinarias, Centro Nacional de Sanidad Animal, La Habana, Cuba. Profesor Investigador, UAM, México. e-mail: svega@correo.xoc.uam.mx.

Guadalupe Prado Flores. Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Maestra en Bioquímica, CIVESTAV-IPN, México. Doctora en Ciencias Biológicas, UAM, México. Profesora Investigadora, UAM, México. e-mail: gua.pra@gmail.com.

Rey Gutiérrez Tolentino. Licenciado en Producción Animal y Doctor en Ciencias Biológicas, UAM, México. Profesor Investigador, UAM, México. e-mail: reygut@correo.xoc.uam.mx.

núan las investigaciones en este sentido (Urbán *et al.*, 2002). En México, la adulteración con proteínas de suero en leche fluida es causa de pérdidas económicas tanto para productores nacionales como para industriales que elaboran sus productos a partir de leche fresca.

Por lo anterior, se han desarrollado varios métodos para detectar y estimar la presencia de suero en leche, diferenciándose por la sensibilidad y complejidad de los equipos utilizados. Algunos métodos propuestos se basan en la determinación del caseinocromopéptido liberado de la κ -caseína por acción del cuajo, mediante la separación por electroforesis en gel de poliacrilamida (Pinto *et al.*, 1991; Sharma *et al.*, 1992; Urbán *et al.*, 1998) y por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC; Benitez *et al.*, 2001). Una de las funciones de la κ -caseína es estabilizar la dispersión de las micelas de caseínas en la leche. Durante la primera fase de la acción enzimática de la quimosina sobre la κ -caseína se produce una proteólisis, rompiéndose el enlace peptídico fenilalanina¹⁰⁵-metionina¹⁰⁶, generando dos macromoléculas (Wheelock y Knight, 1969), la para- κ -caseína unida a la caseína (1-105) y un macropéptido soluble en el suero (106-169). La acción enzimática sobre la κ -caseína puede ser evaluada estimando la liberación del caseinocromopéptido soluble, también conocido como glicomacropéptido o caseinoglicopéptido (Herrera y Verdalet, 2005) ya sea por electroforesis (PAGE-SDS) o por (HPLC) aplicada a la fracción soluble en ácido tricloroacético (TCA) al 8% de concentración final.

En la actualidad, los métodos químicos están siendo reemplazados por métodos espectroscópicos que pueden detectar cualquier tipo de lactosuero mediante la determinación de la relación proteína del suero/proteína total de la leche (De Koning y Van Rooijen, 1971; Lechner y Klostermeyer, 1981). Por ello se ha propuesto el empleo de la cuarta derivada del espectro de absorbancia para la determinación rápida de proteína de suero y caseína en la proteína total de la leche (Meisel, 1995; Miralles *et al.*, 2000).

La leche contiene sustancias orgánicas como los aminoácidos aromáticos tirosina (Tyr) y triptófano (Trp) que son la causa de las bandas de absorción características por debajo de 380nm de la región UV del espectro. Esta propiedad permite valorar las proteínas por espectrofotometría en la zona UV, por lo que se ha propuesto la determinación de la relación proteínas de suero/caseínas que se encuentra de forma natural en la leche y basada en la absorción de Trp y Tyr, los cuales tienen máximos y mínimos característicos y diferenciados en la 4ª derivada del espectro (Meisel, 1995). La relación proteína de suero/proteína total (PS/PT) es importante como control en tecnología de

leche y productos lácteos, pudiendo demostrar adiciones fraudulentas de proteína (Miralles *et al.*, 2003).

Materiales y Métodos

Muestras

Se analizaron tres muestras procedentes de 10 marcas de leche ultrapasteurizada (UHT) descremada, las cuales fueron seleccionadas por su amplia distribución y demanda de los consumidores en la Ciudad de México. Las muestras se obtuvieron aleatoriamente en supermercados con una frecuencia mensual y por razones prácticas y de conveniencia durante tres meses (septiembre, octubre y noviembre), fueron analizadas por tres métodos analíticos, siendo el número total de muestras analizadas de 30. En cada análisis de las 10 marcas en estudio se incluyó una muestra testigo de leche auténtica. Como control positivo se utilizó suero de quesería en polvo WPC-34 (James Farrel, México) y leche entera fresca y auténtica como control negativo.

Se prepararon mezclas de suero en polvo con leche entera fresca, con niveles de adición de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 y 3,0% con el propósito de generar una curva de calibración y evaluar si la adulteración de la leche con suero de quesería podría detectarse con la determinación del glicomacropéptido (GMP) mediante las técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS) y por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Los N-acetil ésteres de triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe) de Aldrich (857726) y Sigma (A-6751 y A-4251), respectivamente, fueron utilizados como compuestos modelo para conocer el espectro de absorción UV de los respectivos aminoácidos aromáticos.

Para establecer la relación PS/PT se prepararon mezclas de calibración de proteína de suero en proteína total al 5, 10, 15, 20, 25 y 30%, mezclando una solución de caseína estándar (Sigma C-5890) en hidróxido de sodio 0,1M, pH 6,12 y una solución 12:5:1 de seroalbúmina bovina (SA), α -lactoalbúmina (α -La) y β -lactoglobulina (β -Lg).

Para estimar la exactitud de la 4ª derivada espectral (4ª DS) de la absorción UV en la relación PS/PT se utilizaron muestras de referencia (mezclas de proteínas de suero y caseína en polvo) NISE-CAS 0, 15, 20, 25 y 100, (NIZO Food Research, Holanda) con relación PS/PT de 0, 15, 20, 25 y 100%, respectivamente.

Análisis del glicomacropéptido (GMP) por electroforesis (PAGE-SDS)

Este análisis se realizó de acuerdo a la metodología recomendada por

Olieman y Van den Bedem (1983). A volúmenes de 25ml de leche UHT, control positivo y control negativo se les agregaron lentamente 12,5ml de una solución de TCA 24% bajo agitación constante; la incorporación se realizó en ~1min. Después de permanecer en reposo durante 90min a temperatura ambiente (25°C), el precipitado de caseína fue removido por filtración en papel filtro. Una alícuota de 15ml del filtrado (TCA 8%) fue transferida a un tubo de centrifuga de 30ml y se trató con 3ml de una solución de TCA 50%, permaneciendo en reposo a 4-6°C por un mínimo de 120min y posteriormente fue centrifugada a 7000g durante 10min. El material precipitado fue lavado con una solución 1:1 de etanol-éter, seguido de una centrifugación en iguales condiciones. El precipitado fue recuperado por resuspensión en solución amortiguadora 0,05M TRIS-HCL + 1mM EDTA-Na₂, pH 7,2.

Las muestras preparadas mediante el procedimiento anterior se transfirieron a tubos de microensayo, a los cuales se les agregó una solución de sacarosa al 50% conteniendo 0,002% de azul de bromofenol.

Se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE según la metodología desarrollada por Laemmli (1970), con modificaciones validadas. Para la obtención del gel se utilizó una solución al 15% (p/v) de concentración de acrilamida y N-N' metileno-bis-acrilamida en una relación 37,5:1 sobre un amortiguador TRIS-HCL 1,5M pH 8,8, a la cual se le agregó dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%. La mezcla fue polimerizada con la adición de persulfato de amonio 0,6% y un porcentaje igual de N-N'N'N' tretametil-etileno diamino (TE-MED).

La electroforesis continua se realizó en un equipo BIORAD Mini Protean II Slab Cell, con una fuente de poder LKB 2197. Las placas de corrimiento se elaboraron con separadores de 1,5mm, utilizando peinetas de 10 pozos. Las muestras se cargaron en húmedo depositando 50µl de cada una. La corrida se efectuó a 200V y 85-100mA. Se usó como amortiguador TRIS-Glicina pH 8,3. Se corrió la electroforesis por 40min.

Después de terminada la electroforesis, se trataron los geles durante 24h en solución fijadora de 2 propanol (250ml) y ácido acético glacial (100ml) aforada a 1l con agua. El tinte se efectuó con una solución de azul de Coomassie (0,3g), metanol (50ml), ácido acético glacial (10ml) y agua (100ml). La tinción se realizó durante 90min a temperatura ambiente. A continuación los geles fueron lavados con agua destilada y se trataron con la solución de destiñido (metanol:ácido acético glacial:agua 6:1:14) hasta obtener un contraste nítido. Los geles fueron conservados en ácido acético al 7%.

La concentración del glicopéptido (GMP) se midió con un transiluminador SYNGENE Gel Vue GVM20. La exactitud obtenida se calculó mediante la curva de calibración de las mezclas de suero y leche entera fresca con el propósito de evaluar si la adición de suero de quesería a la leche pudiese detectarse mediante la determinación del GMP por el método de electroforesis en gel de poli(acrilamida) (PAGE-SDS). La recta de calibrado se determinó con muestras de leche auténtica con suero al 1; 1,5; 2 y 3% (controles positivos) y de leche genuina (control negativo) con cuatro repeticiones.

Análisis del GMP por HPLC

Este método de análisis se basó en la precipitación de la caseína con TCA y una precipitación selectiva del GMP siguiendo el mismo procedimiento realizado para la electroforesis. Todas las muestras precipitadas se resuspendieron en 1ml de amortiguador, se filtraron por membrana Millipore y se inyectaron 50 μ l al equipo de HPLC Merck-Hitachi con bomba isocrática, utilizando un inyector con un circuito en espiral de hasta 200 μ l y detector UV a 210nm.

Para la cromatografía se utilizó un programa isocrático con la composición correspondiente a la fase móvil: fosfato de K monobásico 90mM + fosfato de K dibásico 10mM + sulfato de Na 150mM, preparada con agua grado HPLC. Una columna TSK-GEL G2000SW de filtración por gel de 7,5mm \times 30cm, con tamaño de partícula de 10 μ m con guarda-columna de: 7,5mm (DI) \times 7,5cm; flujo de fase móvil de 0,5ml \cdot min⁻¹ y longitud de onda de detección de 210nm. Se aplicaron primero las muestras controles para comprobar los tiempos de retención y ajustar la sensibilidad del equipo.

La presencia de un pico en el cromatograma de la muestra con tiempo de retención $t_r = 20$ min correspondiente al GMP es indicativo de su positividad a la adición de suero de quesería. La concentración de los residuos se calculó por el método de estándar externo utilizando la curva estándar de calibración.

Análisis de la relación PS/PT utilizando la UV-4^a-DS

La cuarta derivada del espectro de absorción (4^a-DS) en el UV fue utilizada para obtener la relación PS/PT. Para ello las muestras de leche descremada UHT, muestras de referencia y mezclas de calibración (30 μ l) fueron diluidas con HCl-guanidina 6M e hidróxido de Na 0,1M, pH 6,12 en un matraz volumétrico de 5ml. Los viales de 5ml fueron colocados en baño de ultrasonido por 20min e inmediatamente se midió su es-

pectro de absorción. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. Se calculó la cuarta derivada de los espectros de absorción empleando el software del espectrofotómetro. Se registraron los valores absolutos de $\delta^4 A / \delta \lambda^4$ a las longitudes de onda (λ) correspondientes a los diferentes máximos y mínimos.

Para las condiciones de medición de la derivada del espectro de absorbancia en el UV y la preparación de las muestras se tomaron como referencia los estudios de Meisel (1995) y Miralles (2001) con diferencias menores de respuesta en las absorbancias. Los espectros de absorción de las muestras de referencia y de leche UHT se registraron y se determinó la cuarta derivada entre 250 y 310nm, a velocidad de 1200nm \cdot min⁻¹, empleando un espectrofotómetro BECKMAN DU-600[®]. Se registraron los valores absolutos $\delta^4 A / \delta \lambda^4$ a las λ correspondientes a los diferentes máximos y mínimos. El cociente $(\delta^4 A / \delta \lambda^4_{294}) / (\delta^4 A / \delta \lambda^4_{283}) \times 100$ fue correlacionado con la relación de PS/PT utilizando una recta de calibración obtenida mediante las muestras de referencia NISE-CAS.

Previamente a la aplicación de la UV-4^a DS para la determinación de la relación PS/PT en las muestras de leche UHT se llevó a cabo la estandarización del método. Se estimó la linealidad de respuesta por análisis de regresión lineal, la repetibilidad y la reproducibilidad mediante la desviación estándar relativa.

Análisis estadístico

Se usó el método de mínimos cuadrados para obtener la ecuación de la recta de la curva estándar de calibración tanto para los valores entre los niveles de suero agregado y la concentración de la banda del GMP como entre el suero agregado y el área del pico del cromatograma, en los métodos de electroforesis y HPLC, respectivamente. Asimismo, para obtener la ecuación de la recta de la curva estándar de calibración entre los valores absolutos de la cuarta derivada de los espectros de absorción a diferentes longitudes de onda ($\delta^4 A / \delta \lambda^4$), contra la relación de proteínas del suero/proteína total (PS/PT) de las mezclas de calibración (5-30%). Se seleccionó como variable dependiente al valor $\delta^4 A / \delta \lambda^4$ y como variable independiente a PS/PT.

Los resultados obtenidos de las muestras de leche cruda y UHT se sometieron a un análisis de varianza de un factor, seguida de la prueba de Tukey para comparación de medias de la relación PS/PT en cada tipo de leche. Para comparar las medias del cociente PS/PT con la variación de los diferentes porcentajes de incorporación de suero entre los dos tipos de leche, se utilizó la prueba t de Student. Se usó el programa SPSS, versión 8.5 para Windows.

Resultados y Discusión

Electroforesis

El resultado del análisis de regresión lineal entre los niveles de suero agregado y la concentración de la banda del GMP dio una respuesta lineal en el intervalo de concentraciones entre 1 y 3% (p/v), obteniéndose un coeficiente de correlación $r = 0,9897$, lo cual demuestra una alta asociación entre las dos variables.

En el electroforetograma (no mostrado) obtenido de las mezclas de leche auténtica con suero en polvo se pudo apreciar que para cada nivel de suero agregado a la leche, las bandas revelaron la aparición del GMP indicador de la presencia de suero. En la primera serie de bandas la apreciación visual reveló una difusa secuencia de intensidad con excepción de un carril (2% de suero adicionado), mientras, que en la segunda serie la excepción correspondió a dos carriles (2 y 2,5%).

En los resultados obtenidos de las 10 marcas de leche UHT analizadas se pudo apreciar que la metodología empleada fue sensible para detectar niveles de suero en polvo incorporado en niveles menores al 1% (m/m). Las muestras de leche UHT donde se detectó la banda típica del GMP permitieron definir las marcas de leche adulteradas con suero de quesería que presentaron valores $>1\%$. Se observó la banda característica de esta sustancia en leche auténtica adicionada con 3% de suero de quesería en polvo, y la muestra de leche que se utilizó como control negativo no presentó esta banda.

Se detectó la presencia de suero de quesería en siete marcas de leche UHT analizadas con el método de electroforesis, por lo que solo el 30% de las marcas de leche UHT analizadas no mostraron adicionado. En las marcas de leche UHT 1, 3, 4, 6 y 7 se encontraron tenores $>1\%$ de adiciones de suero de quesería.

En un estudio realizado en México por Alcázar *et al.* (2000) empleando la técnica de electroforesis y la presencia del GMP como indicador de adulteración, encontraron que el 14,81% de las muestras de leche en polvo comercial ($n = 108$) analizadas estaban adicionadas con suero de quesería, mientras que en este estudio para leche UHT el porcentaje de pruebas positivas fue de 70% ($n = 30$). Urbán *et al.*, (2002) usando la misma técnica (PAGE-SDS) encontraron que el 50% ($n = 96$) de las leches UHT comercializadas en la Ciudad de México durante 2001 presentó adulteración con GMP. Se reitera con los resultados ahora obtenidos que se sigue contraviniendo lo establecido en la legislación sanitaria mexicana (DOF, 2003) que descarta el uso de lactosuero en leche aún en época de lluvia, cuando se observa disminución del contenido de proteína.

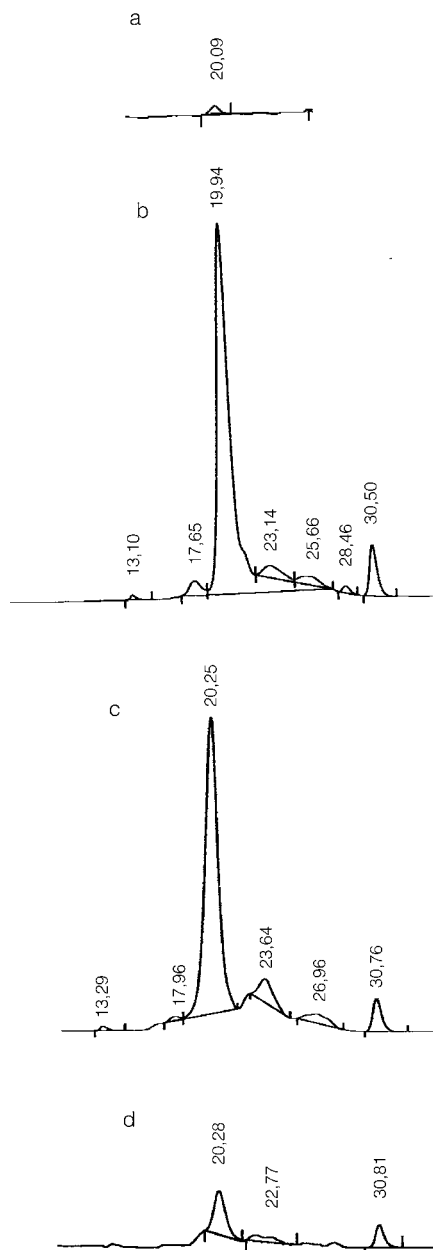


Figura 1. Cromatogramas de a: leche fresca entera (control negativo), b: leche fresca adicionada con 3% de suero de quesería en polvo (control positivo), c: marca 1 de leche UHT, y d: marca 2 de leche UHT.

HPLC

La respuesta de detección fue lineal en el intervalo de concentraciones de 0,5-5% (p/v), obteniéndose un coeficiente de correlación $r=0,9969$. Se consideró que la presencia de una señal o pico con tiempo de retención (Rt) correspondiente al GMP indicaba la adición de suero de quesería; la ausencia del mismo a un Rt de 20min, sobre todo para muestras con adulteración $<0,5\%$, significó que no era posible detectar adulteraciones inferiores a este porcentaje de suero añadido. Los resultados obtenidos mostraron

semejanza con los de Olieman y Van Riel. (1983 y 1989), quienes informaron 0,8% como límite de detección, lo cual muestra que usando la técnica HPLC se pueden detectar pequeñas cantidades de suero de quesería. Si se comparan los cromatogramas de la Figura 1 se observa que la muestra de leche cruda (a, control negativo) no presentó una señal relevante en el pico correspondiente al GMP, mientras que en el control positivo (b) se detectó el pico típico de GMP con Rt de 19,94min. Benítez *et al.* (2001) utilizando la técnica de HPLC en condiciones cromatográficas diferentes informaron un Rt de 61min. Sharma *et al.* (1993) utilizando un método modificado de HPLC con una columna (Protein PaK-125 de $30 \times 0,75$ cm) de filtración por gel para determinar el GMP, lograron reducir el tiempo de retención de 40 a 15min, cercano al Rt obtenido en este trabajo.

Las concentraciones de suero de quesería determinadas por HPLC en cada una de las marcas de leche UHT analizadas se muestran en la Tabla I. En las diez marcas se encontraron concentraciones de suero muy bajas. Asimismo, se muestran los cromatogramas (Figura 1c y d) de la marca 1 de leche UHT, donde se detectó adulteración con suero y la marca 2, donde la concentración del GMP fue baja. Los resultados indicaron que el 50% de las muestras analizadas fueron positivas a concentraciones $<1\%$ y en el resto fue superior. El valor medio para las marcas estudiadas fue mayor al 1%. Fue de interés observar que en el control positivo con 3% de suero adicionado no se recuperaron las cantidades totales, sino solo 2,46; 2,36 y 2,04% (p/v) que representaron el 68 al 82%.

En la mayoría de los métodos usados para determinar el GMP las muestras de leche se preparan mezclándolas con TCA, con la finalidad de precipitar las caseínas y subsecuentemente analizar el sobrenadante, donde se encuentran las proteínas del suero y el GMP (Olieman y van Riel, 1989; Calvo, 2002). Cuando se usa TCA al 2%, en el sobrenadante se pueden detectar la mayoría de las fracciones del GMP, mientras que cuando se utiliza TCA al 8% el precipitado de fracciones proteicas (caseínas) es mayor y en el sobrenadante es más fácil detectar el GMP, por lo cual se considera 8% como la concentración óptima de TCA para los análisis por HPLC (Olieman y van Riel, 1989).

Recientemente Thomä *et al.* (2006) utilizaron un método cromatográfico para determinar simultáneamente las fracciones del GMP y las proteínas del suero. Encontraron

que a concentraciones bajas (1%) de TCA se pierde $\sim 10\%$ del total del GMP y que la precipitación de las proteínas del suero con TCA no es la más adecuada porque puede conducir a una pobre estimación del contenido del GMP, posiblemente atribuido a la sensibilidad de sus formas glicosiladas y no glicosiladas en soluciones de TCA, lo cual genera una solubilidad muy variada (Ferreira *et al.*, 2003). Los últimos autores utilizaron con éxito ácido clorhídrico como pretratamiento en muestras de leche en polvo para precipitar las proteínas, obteniendo una recuperación del GMP de 93-97%.

Lo anterior llevó a considerar que la presencia de niveles bajos de suero de quesería detectados en las muestras de leche UHT analizadas pudo haber reflejado efectos adversos para la recuperación del GMP cuando se hacen pretratamientos con TCA y con ello se inducen pérdidas parciales de GMP.

Cuantificación por la relación PS/PT utilizando la UV-4^a-DS

Previamente a la aplicación de la UV-4^a DS para la determinación de la relación PS/PT en las muestras de leche UHT, se llevó a cabo la estandarización del método propuesto por Meisel (1995) y Miralles (2000) con modificaciones. Se estimó la linealidad de respuesta por análisis de regresión lineal, la repetibilidad y la reproducibilidad mediante la desviación estándar relativa.

De acuerdo con Meisel (1995) y Lüthi-Peng y Puhan (1999) se usaron como compuestos modelo los n-acetil ésteres de Trp, Tyr y Phe, cuyas concentraciones fueron seleccionadas teniendo en cuenta que la relación Trp/Tyr en la leche es de 0,59 para las proteínas de suero y de 0,19 para las caseínas (Miralles *et al.*, 2000).

Puesto que el coeficiente de extinción molar del Trp es cinco veces

TABLA I
DETECCIÓN DE SUERO DE QUESERÍA
EN LECHE UHT COMERCIAL
POR EL MÉTODO DE HPLC

Muestras de leche UHT	Toma de muestras % (P/V)		
	Septiembre	Octubre	Noviembre
1	1,06	2,41	1,29
2	0,48	0,46	0,48
3	2,92	0,56	0,54
4	1,51	1,78	0,60
5	0,49	0,49	0,40
6	0,81	2,48	1,37
7	1,76	1,03	1,73
8	0,41	0,81	0,89
9	0,90	1,05	1,72
10	0,52	1,13	2,18
Control positivo (3%)	2,46	2,36	2,04

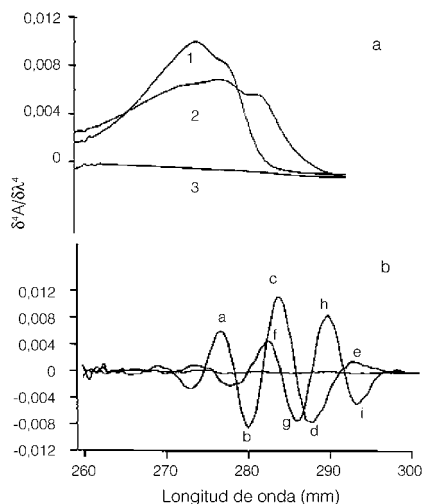


Figura 2. Espectro UV de los n-acetil ésteres de Trp (0,105mM), Tyr (0,5mM) y de Phe (1,05mM). a: orden 0, b: orden 4. Máximos de n-acetil éster de Tyr en 276, 282 y 293nm (a, c, e); mínimos del n-acetil éster de Tyr en 278 y 287nm (b, d); máximos del n-acetil éster de Trp en 283 y 289nm (f, h); mínimos del n-acetil éster de Trp en 285 y 294nm (g, i). Tomado de Miralles (2001).

mayor que el de la Tyr, y el de la Phe es muy pequeño comparado con ellos, la concentración de Phe empleada fue 10 veces superior (1,05mM) que la de Trp (0,105mM) y ésta a su vez 5 veces inferior que la de Tyr (0,5mM). La Figura 2a muestra los espectros de absorción UV de orden 0 y 4 de los péptidos empleados como compuestos modelo. Los espectros de orden cero presentaron un solapamiento para los máximos de los n-acetil-ésteres de Trp y Tyr (Figura 2a), mientras que los espectros de la cuarta derivada (Figura 2b) presentaron señales separadas para los péptidos con aminoácidos aromáticos.

En el espectro de la cuarta derivada se pudo observar que la Tyr presentó máximos de absorción a 276nm (a), 283nm (c) y 293nm (e), y mínimos a 278nm (b) y 287nm (d). El Trp presentó máximos de absorción a 282nm (f) y 289nm (h), y mínimos de a 285nm (g) y 294nm (i).

La Figura 3 muestra la superposición del espectro de la cuarta derivada de una muestra de leche y de los compuestos modelo. Los tres máximos en 276nm (a), 283nm (b) y 289nm (c) y los tres mínimos en 278nm (d), 287nm (e) y 294nm (f) en el espectro de la leche corresponden a la contribución de la Tyr (a,d), del Trp (c,f) o de ambos (b,e).

Con el fin de seleccionar la longitud de onda para el análisis espectroscópico, Meisel (1995) y Lüthi-Peng y Puhán (1999) usaron la misma relación mínimo/máximo, para cuantificar las proteínas de suero con sus correspondientes máximos y mínimos de 282 y 296nm, respectivamente,

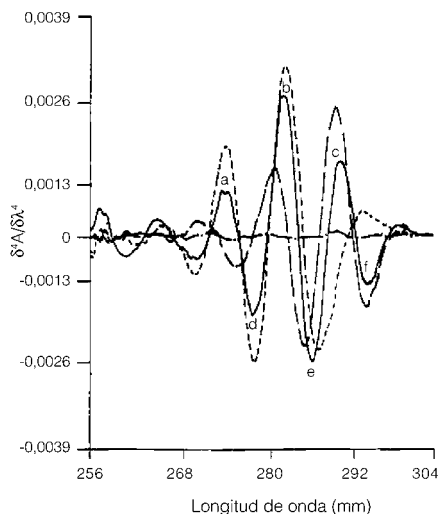


Figura 3. Espectros UV de la cuarta derivada de una muestra de leche UHT desnatada (—), de los n-acetil ésteres de Trp 0,105mM (—), Tyr 0,5mM (- - -) y Phe 1,05mM (- - -) que se usaron como compuestos modelo. Máximos estimados a 276 (a), 283 (b) y 289nm (c), y mínimos estimados a 278 (d), 287 (e) y 294nm (f). Modificado de Miralles (2001).

mientras que en este estudio las longitudes de onda utilizadas fueron 283 y 294 nm, similar a lo registrado por Miralles *et al.* (2000).

Para establecer la linealidad de la absorbancia frente a distintos volúmenes de leche, se tomaron volúmenes entre 30 y 170µl y se completaron hasta 2ml con NaOH 0,1M, pH 6,12 y HCl-guanidina 6M, determinándose la cuarta derivada del espectro de absorción a 283 y 294nm. La relación $(\delta^4A/\delta\lambda^4_{294})/(\delta^4A/\delta\lambda^4_{283})$ se mantuvo constante con un volumen de 30µl, permitiendo utilizar menor cantidad de reactivos que en los estudios de Meisel (1995) y Miralles *et al.* (2000).

La exactitud en la determinación de la relación PS/PT se obtuvo estableciendo una recta de calibración con las muestras de caseína y proteínas de suero con una relación PS/PT de 5, 10, 15, 20, 2% y 30%. La Figura 4 muestra los espectros de la cuarta derivada obtenidos en la cual puede observarse la coincidencia de los máximos a 283nm y la diferente respuesta de los mínimos a 294nm.

El resultado del análisis de regresión lineal simple para la determinación PS/PT en las muestras de calibración y en las muestras NISECAS se aprecia en Tabla II. Se presenta el coeficiente de regresión, el valor de la pendiente y la variable independiente representada por el cociente PS/PT. La exactitud media del método, calculada como el cocien-

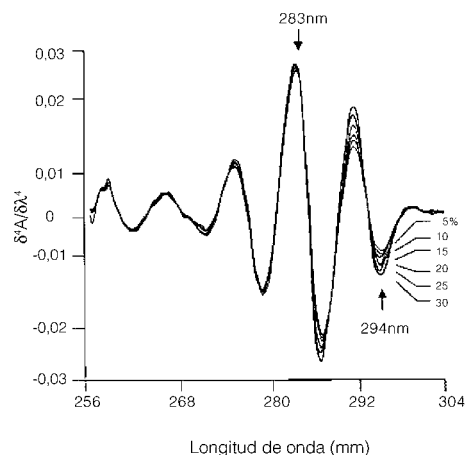


Figura 4. Espectros de la cuarta derivada de mezclas de caseínas y proteínas de suero con una relación PS/PT de 5, 10, 15, 20, 25 y 30%. Modificado de Miralles (2001)

te entre el valor encontrado para las muestras de calibrado y su valor teórico, fue de 103,56%.

La repetibilidad del método se estudió en diferentes días, mediante el análisis de las mezclas de calibración y una muestra de leche UHT descremada por sextuplicado. La repetibilidad del método expresada como la desviación estándar relativa (RSD) fue de 2,3%.

En la Tabla III se presentan los resultados de la determinación cuantitativa de la relación PS/PT de muestras de leche cruda auténtica y UHT adicionadas de suero de quesería, en proporciones de 2,5 a 15%. El incremento observado en la relación PS/PT fue mayor para la leche UHT que para la leche cruda. La prueba t de Student permitió definir una diferencia marginal entre la relación PS/PT en la concentración a 0% entre la leche cruda y la leche UHT. Para el resto de las concentraciones se encontró una significación alta ($P < 0,01$), lo que representó que valores de PS/PT $> 13,5\%$ podrían ser indicativos de adición de suero a la leche, en un nivel de 5%.

En cuanto a las concentraciones de suero de quesería determinadas por la UV-4ª DS de las diez marcas de leche UHT analizadas, 36,7% de las muestras fueron positivas por lo menos en dos ocasiones durante el periodo de toma de muestras (Tabla IV). Es decir que 90% de las muestras estudiadas tenían suero de quesería. Solo la marca 4 no presentó agregado de suero en

TABLA II
ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL DE LA RELACIÓN PS/PT PRESENTE EN LAS MUESTRAS DE CALIBRADO Y EN LAS MUESTRAS NISECAS

Muestras	a	b	R ²
Muestras de calibrado (n= 20)	57,320	0,510	0,986
Muestras NISECAS (n= 20)	40,396	0,234	0,995

a: ordenada al origen, b: pendiente.

TABLE III
DETERMINACIÓN DE PS/PT MEDIANTE
UV-4TH DS EN UNA MUESTRA DE LECHE UHT
Y UNA MUESTRA DE LECHE CRUDA
CON ADICIONES DE SUERO WPC-34
ENTRE 2,5 Y 15% EXPRESADO EN PROTEÍNA

Adición de suero (% en proteína)	Determinación de la relación PS/PT (%) ¹	
	Leche cruda Media ±DE	Leche UHT Media ±DE
0	12,4 ±1,06 a	14,4 ±1,69 b
2,5	13,5 ±0,94 ab	16,3 ±0,73 ab
5	14,4 ±1,10 ab	17,4 ±0,96 a
10	15,8 ±1,19 bc	18,9 ±0,77 ac
12,5	17,5 ±0,83 cd	20,1 ±0,91 c
15	19,1 ±1,81 d	23,5 ±1,87 d

n= 6. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (p< 0,05)

las repeticiones 2 y 3. En las marcas de leche positivas, el nivel de adulteración fue mayor en las tomas de muestras 1 y 3. Un nivel de adulteración >10% se estimó en 10% de las muestras en septiembre, octubre y noviembre, periodo cuando los sólidos totales son menores, provocando que las industrias recurran a la adición de suero de quesería para estandarizar el contenido de proteínas totales en la leche y obtener productos con contenido de proteína constante (Lüthi-Peng y Puhan, 1999).

Cuantificación de PS/PT total en leches UHT comerciales

Los valores obtenidos tras el análisis de las muestras problema expresaron una relación PS/PT media de 14,2% (n= 30). Dicho valor es diferente al registrado por Miralles *et al.* (2000) de 18,1 ±2,3% en leches UHT descremadas. En este trabajo y de acuerdo con los valores registrados en el Tabla III, se estableció que los porcentajes >13,5 en la relación PS/PT indicaban adición de suero.

TABLE IV
PORCENTAJE DE SUERO EN POLVO ESTIMADO
EN MUESTRAS DE LECHE UHT COMERCIAL POR
EL MÉTODO DE LA CUARTA DERIVADA

Muestras de leche UHT	Toma de muestras % (p/v)			
	Septiembre	Octubre	Noviembre	Promedio
1	5,50	4,90	12,10	7,50
2	2,80	1,80	7,10	3,90
3	0,70	2,50	1,30	1,50
4	7,30	0	0	1,30
5	6,30	7,00	1,70	5,00
6	10,50	3,50	6,10	6,70
7	11,30	4,40	3,00	6,23
8	3,80	4,70	4,80	4,43
9	3,90	6,40	4,10	7,80
10	7,70	1,80	4,30	4,60

Urbán *et al.* (2002), utilizando la técnica de electroforesis (PAGE-SDS), encontraron que 50% (n= 96) de la leche UHT comercializada en la ciudad de México presentaba adulteración con suero de quesería, contraviniendo lo establecido en la legislación sanitaria mexicana, que descarta el uso de lactosuero aun en época de lluvias cuando disminuye el contenido de proteína.

La relación natural PS/PT puede variar por diversos factores. Lüthi-Peng y Puhan (1999) encontraron, utilizando un método espectroscópico, valores para leche cruda de vaca (n= 34) entre 12,7 y 21%, valor que coincide con el obtenido en este estudio (12,43%).

Coulon *et al.* (1998) revisaron los factores genéticos, fisiológicos y dietéticos que afectan la proporción de caseína en la proteína total de la leche y mostraron que existen variantes genéticas de la β-Lg, siendo las más comunes las llamadas A y B, que difieren en dos aminoácidos. La variante A tiene valina en la posición 118 y aspartato en la posición 64, mientras que la variante B tiene alanina y glicina, respectivamente.

La variante genética de la β-Lg es el principal factor que afecta la relación caseína/proteína en la leche, mientras que los factores ligados a la dieta tienen una influencia menor. La relación PS/PT encontrada por Coulon *et al.* (1998) fue de 16,8% en la leche con presencia de β-Lg BB, de 18,4% en la leche con β-Lg AB y 19,6% en la leche con β-Lg AA. Por tanto, aunque este factor tiene influencia en cada vaca, no es detectable en leche procedente de grandes mezclas, como las muestras estudiadas (Miralles, 2001 y Coulon *et al.*, 1998). Por ello se considera que para evaluar la relación natural de proteínas de suero/caseínas, habría que establecer un intervalo "normal" de esta relación, que incluyera todos los intervalos que pudieran darse.

Meisel (1995) y Miralles *et al.* (2000) han encontrado datos discordantes en el contenido de grasa y la relación PS/PT: Mientras que el primero señaló que en la cuarta derivada del espectro de absorción no hubo influencia del contenido graso, Miralles, en cambio, al trabajar con leche entera UHT encontró diferencias en la desviación estándar relativa, al compararla con leches descremadas.

Los procedimientos industriales de ultrapasteurización no afectan la relación PS/PT (Miralles *et al.*, 2000). El Comité del Codex de leche y productos lácteos recomienda que la relación proteínas de suero/caseínas no debe ser afectada por el procedimiento de estandarización, por lo que ha propuesto límites para la relación de proteínas de suero/caseínas en leches evaporadas, condensadas edulcoradas, en polvo, queso y nata en polvo (CODEX, 2006).

Conclusión

Los resultados obtenidos por el método de electroforesis indican que la aparición del glicomacropéptido en leche UHT representa una característica específica y sensible para detectar grados de adulteración de leche con suero. En este estudio se detectó que el 70% de las marcas de leche tuvieron adiciones >1%, lo que no puede ser revelado al analizar las características físico-químicas de la leche.

Las mismas diez marcas de leche UHT analizadas mediante el método de electroforesis se analizaron por el método de HPLC, resultando el 50% de muestras positivas a la adición de suero en un nivel <1% y el otro 50% a nivel >1%. Esto es, se observó el incremento al número de muestras positivas, así como la concentración de suero, demostrando que este método de análisis fue más sensible para la detección del GMP.

La determinación de la relación PS/PT a través de la cuarta derivada del espectro de absorción permitió detectar adiciones de suero en las diez marcas de leche UHT. En el 56,7% de las muestras se detectaron adiciones de suero <5% y en el 36,7% restante se detectaron adiciones >5%.

Los tres métodos indicaron el empleo fraudulento de dicho subproducto, conforme lo establece la legislación nacional vigente, que para el caso de la leche UHT descarta el uso de ingredientes o aditivos tales como el lactosuero.

REFERENCIAS

- Alcázar MCD, Rosas RJ, Jaramillo ACJ, Peña BSD (2000) Detección de glucomacropéptido (GMP) como indicador de adulteración con suero de quesería en leche deshidratada. *Vet. Méx.* 31: 217-222.
- Benítez E, Ponce P, Noa M (2001) Detección de suero de quesería en leche en polvo por HPLC de filtración por gel (GFC-HPLC). *Rev. Salud Anim.* 23: 27-31.
- Bordin G, Cordeiro R, De la Calle B, Rodríguez AR (2001) Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 928: 63-76.
- Calvo MM (2002) Influence of fat, heat treatments and species on milk rennet clotting properties and glycomacropéptido formation. *Eur. Food Res. Technol.* 214: 182-185.
- CODEX (2006) Stan 252-2006. En *Codex Alimentarius*

- tarius. Committee on Milk and Milk Products. International Dairy Federation (IDF). Roma, Italia
- Coulon JB, Hurtand C, Remond B, Vêrité R (1998) Factors contributing to variation in the proportion of casein in cow's milk true protein: a review of recent INRA experiments. *J. Dairy Res.* 65: 375-387.
- De Koning PJ, Van Rooijen PJ (1971) Estimation of whey proteins in casein co-precipitate or in mixtures with powder by the use of a modified ninhydrin reaction. *Milchwissenschaft* 26: 1-6.
- DOF (2003) *Norma Oficial Mexicana NOM-SCFI-155-2003. Leche, Fórmula Láctea y Producto Lácteo Combinado*. Diario Oficial de la Federación (12/09/2003). México DF.
- Ferreira MPLVO, Oliveira MBPP (2003) Determination of caseinomacropéptide by an RP-HPLC method and monitoring of the addition of rennet whey to powdered milk. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 26: 1, 99-107.
- FIRA (2001) Tendencias y oportunidades de desarrollo de la red de leche en México. En *Boletín Informativo 2001*. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. México. *FIRA* 23: 81-93.
- Herrera MMS, Verdalet GI (2005) El suero de queso: ¿producto vital o simple desecho? Universidad Veracruzana. *La Ciencia y el Hombre*, mayo-agosto, Vol. XVIII, 2: 53-54
- Laemli UK (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lechner E, Klostermeyer H (1981) Nachweis einer Verfälschung von Magermilchpulver mit Molkenpulver (polarographische methode). *Milchwissenschaft* 36: 267-270.
- Lüthi-Peng QQ, Puhan Z (1999) The 4th derivative spectroscopic method for the rapid determination of protein and casein in milk. *Milchwissenschaft* 50: 247-251.
- Meisel H (1995) Application of fourth derivative spectroscopy to quantification of whey protein and casein in total milk protein. *Milchwissenschaft* 50: 247-251.
- Miralles B (2001) *Detección de Caseinato y Suero de Leche en Productos Lácteos Mediante Técnicas Electroforéticas, Cromatográficas y Espectroscópicas*. Tesis. Universidad Complutense de Madrid. España. pp. 7-61.
- Miralles B, Bartolomé B, Ramos M, Amigo L (2000) Determination of whey protein to total protein ratio in UHT milk using fourth derivative spectroscopy. *Int. Dairy J.* 10: 191-197.
- Miralles B, Ramos M, Amigo L (2003) Influence of proteolysis of milk on the whey protein to total protein ratio as determined by capillary electrophoresis. *J. Dairy Sci.* 86: 2813-2817.
- Olieman C, Van den Bedem JW (1983) A sensitive HPLC method detecting and estimating rennet whey solids in skim milk powder. *Neth. Milk Dairy J.* 37: 27-36.
- Olieman C, Van Riel JAM (1989) Detection of rennet whey solids in skim milk powder and buttermilk powder with reversed-phase HPLC. *Neth. Milk Dairy J.* 43:171-184.
- Pinto CM, Casadini VS, Brito CC, Molina CH, Israel AL. 1991. Detección de sólidos totales de suero de quesería en leche pasteurizada y leche en polvo por electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS. *Alimentos* 16: 23-31.
- Recio I, García Risco MR, López Fandino R, Olano A, Ramos M (2000) Detection of rennet whey solids in UHT milk by capillary electrophoresis. *Int. Dairy J.* 10: 3.
- Sharma SK, Hill AR, Mittal GS (1992) An improved method to measure glycomacropéptides (GMP) in renneted milk. *Milchwissenschaft* 48: 71-73.
- SIAP (2006) *Boletín de Leche* (Enero-Junio). Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- SIC (2006) *Boletín de Leche*. Sistema de Información Comercial de México. Secretaría de Economía. México. 36 pp.
- Sorensen HH (1992) The liquid milk market. *Bull. IDF* 280: 46-64.
- Thomä C, Krause I, Kulozik U (2006) Precipitation behavior of caseinomacropéptides and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPLC. *Int. Dairy J.* 16: 285-293.
- Urbán G, Vega S, Fresán C, Pérez J, Prado F, González M, González C, Ramírez A (1998) Separación por electroforesis (PAGE-SDS) del caseinomacropéptide liberado por quimosina sobre la κ -caseína. Efectos de proteólisis por bacterias psicrótrofas. *AgroSur* 26: 110-120.
- Urbán G, Pérez N, Pérez J, Fresán C, González C, Vega S, Gutiérrez R, Díaz G (2002) Detección de adulteración con suero de quesería en leches fluidas mexicanas mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE). *Rev. Salud Anim.* 24: 42-47.
- Wheelock JV, Knight DJ (1969) The action of rennet on wholemilk. *J. Dairy Res.* 36: 183-190
- Wolfshoon-Pombo AF, Moreira-Furtado MAM (1989) Detection of adulteration of pasteurized milk with whey by determination of the casein-bound phosphorus and protein nitrogen content. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 188: 16-21.

APPLICATION OF THREE ANALYTIC METHODS FOR THE DETECTION OF CHEESE SERUM IN UHT MILK COMMERCIALIZED IN MEXICO CITY

Acacia Ramírez Ayala, Salvador Vega y León, Guadalupe Prado Flores and Rey Gutiérrez Tolentino

SUMMARY

The presence of cheese serum was detected in ultra pasteurized milks (UHT) commercialized in Mexico City. This was achieved through sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), by high performance liquid chromatography (HPLC) and by the calculation of the fourth derivative of the absorption spectrum (UV-4thDS). Monthly, ten (10) skimmed UHT milk samples were analyzed during September, October and November, and the values obtained through the three methods were compared against those from authentic raw milk with addition

of cheese serum in different amounts. The percentage of positive samples to cheese serum analyzed through electrophoresis, HPLC and UV-4thDS was 70.50 and 90%, respectively. The applied techniques related to the detection and estimation of the glycomacropéptide (GMP) by electrophoresis or by HPLC, and the results obtained indicated that the quantification of the serum protein/total protein (PS/PT) relationship by UV-4thDS was a more sensitive indicator of cheese serum additions.

APLICAÇÃO DE TRÊS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETECÇÃO DE SORO DE QUEIJO ORIUNDO DE QUEIJARIA EM LEITE UHT COMERCIALIZADO NA CIDADE DO MÉXICO

Acacia Ramírez Ayala, Salvador Vega y León, Guadalupe Prado Flores e Rey Gutiérrez Tolentino

RESUMO

Determinou-se a presença de soro de queijo proveniente de queijaria em leites ultrapasteurizados (UHT) comercializados na Cidade do México mediante electroforese em gel de poli(acrilamida)-dodecilsulfato de sódio (PAGE-SDS), cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e a quarta derivada do espectro de absorção (UV-4thDS). Analizaram-se um total de 30 amostras de leite UHT descremado durante os meses de setembro, outubro e novembro, média de 10 amostras por mês, contrastando os valores encontrados pelos três métodos com os de leite cru autêntico

adicionada com soro de queijaria em diferentes níveis. A porcentagem de amostras positivas a soro de queijaria analisadas por electroforese, HPLC e UV-4thDS foi de 70, 50 e 90% respectivamente. As técnicas utilizadas relacionadas com a detecção e estimação do glicomacropéptideo (GMP) por electroforese ou por HPLC e os resultados obtidos indicaram que a quantificação da relação proteínas de soro/proteína total (PS/PT) por UV-4thDS foi um indicador mais sensível a adições de soro de queijaria.