



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

**“MEDICIÓN DE GRUPOS SULFHIDRILO (SH) Y DISULFURO
(S-S) EN LECHE CONCENTRADAS A BAJA TEMPERATURA
Y PRESIÓN DE VACÍO”**

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS:**

EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

PRESENTA:

EMMANUEL FLORES GIRÓN



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

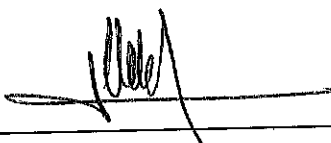
FEBRERO DE 2010

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO.

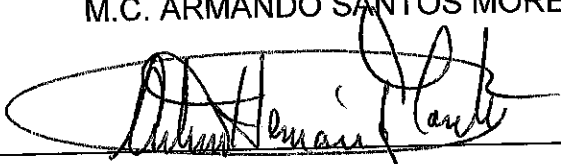
**MEDICIÓN DE GRUPOS SULFHIDRILO (SH) Y DISULFURO (S-S) EN
LECHES CONCENTRADAS A BAJA TEMPERATURA Y PRESIÓN DE VACÍO**

Tesis realizada por **Emmanuel Flores Girón** bajo la dirección del Comité
Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptada como requisito parcial para
obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA**

DIRECTOR: 
DR. SALVADOR VALLE GUADARRAMA

CODIRECTOR: 
M.C. ARMANDO SANTOS MORENO

ASESOR: 
DR. ARTURO HERNANDEZ MONTES

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo y Departamento de Ingeniería Agroindustrial por los recursos brindados para mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento de mis estudios de posgrado.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología, por el otorgamiento de la beca tesis de posgrado en su promoción 2009.

Al Dr. Salvador Valle Guadarrama por su apoyo en la dirección del proyecto.

Al M.C. Armando Santos Moreno por su dirección, apoyo y confianza.

Al Dr. Arturo Hernández Montes por sus observaciones durante la realización y revisión del trabajo.

A los profesores y trabajadores de la universidad que en más de una forma contribuyeron a mi formación académica, en especial al técnico Mauricio del laboratorio de lácteos por su apoyo y paciencia durante la realización de la fase experimental.

Emmanuel Flores Girón

A Juan Flores Hernández

Sólo poseemos eternamente lo que hemos perdido. (H. Ibsen).

DATOS BIOGRÁFICOS

Emmanuel Flores Girón realizó sus estudios de licenciatura en el Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Autónoma Chapingo. Su trabajo de tesis de licenciatura trato sobre los efectos de Calcio y Temperatura de Amasado en la Elaboración de Queso Oaxaca. Ha recibido capacitación en Calorimetría Diferencial de Barrido y en la Evaluación sensorial de alimentos para el control de calidad y pruebas sensoriales discriminativas.

MEDICIÓN DE GRUPOS SULFHIDRILLO (SH) Y DISULFURO (S-S) EN LECHEES CONCENTRADAS A BAJA TEMPERATURA Y PRESIÓN DE VACÍO

MEASUREMENT OF SULFHYDRYL (SH) AND DISULFIDE (S-S) GROUPS IN VACUUM-CONCENTRATED MILK AT LOW TEMPERATURE

Flores-Girón E.¹, S. Valle-Guadarrama².

RESUMEN

El objetivo principal fue medir el contenido de grupos sulfhidrilo (SH) y disulfuro (S-S) en leches después de su concentración a baja temperatura y presión de vacío. Las variables de estudio fueron: temperatura de proceso (40-60 °C), volumen de muestra a concentrar (150-500 mL) y tiempo de proceso (40-80 min). Se determinó el contenido de SH totales con el reactivo Ellman® y el contenido de S-S mediante reacción con p-cloromercuribenzoato-ditiozono. La temperatura de proceso no mostró una tendencia clara sobre el contenido de SH; a medida que el tiempo se incrementó el contenido de SH decayó; un volumen de muestra mayor se vio menos afectado por el proceso de concentración. Las muestras de 150 mL con un tiempo de proceso de 80 min presentaron la máxima disminución de SH con una caída del 74 % con respecto a la leche cruda. La metodología para determinación de S-S implementada no resultó útil para éste estudio porque presentó un alto error experimental.

Palabras clave: Leche concentrada, sulfhidrilos, disulfuros.

¹Autor, ²Director de tesis.

ABSTRACT

The main objective was to measure the content of sulfhydryl and disulfide groups in milk after its concentration at low temperature and vacuum pressure. The design variables were: process temperature (40-60 °C), sample volume to concentrate (150-500 mL) and processing time (40-80 min). The total SH content was determined with Ellman's reagent ® and the content of S-S by reaction with p-chloromercuribenzoate-dithizone. The process temperature did not show a clear trend over the SH content; as time increased, SH content declined, and a larger sample volume was less affected by the concentration process. Samples of 150 mL with a processing time of 80 min showed the maximum decrease of SH with a fall of 74 % compared to raw milk. The methodology for determination of SS implemented was not useful for this study because it showed a high experimental error value.

Key words: Concentrated milk, sulfhydryl groups, disulfide groups.

¹Author, ²Thesis director.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
CAPÍTULO I: ASPECTOS GENERALES	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Situación actual de la producción de industria láctea en México.....	5
2.2. Proteínas lácteas.....	14
2.3. Procesos de concentración de leche.....	35
3. BIBLIOGRAFÍA	39
CAPÍTULO II: MEDICIÓN DE GRUPOS SULFHIDRILO (SH) Y DISULFURO (S-S) EN LECHE CONCENTRADAS A BAJA TEMPERATURA Y PRESIÓN DE VACÍO	44
RESUMEN	45
ABSTRACT	45
1. INTRODUCCIÓN	46
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49

2.1 Selección de las condiciones del proceso de evaporación	49
2.2 Diseño experimental.....	50
2.3 Acondicionamiento de leche.....	51
2.4 Variables respuesta.....	52
3. RESULTADOS Y DISCUSION	56
3.1. Efecto de condiciones de proceso sobre el grado de evaporación	56
3.2. Medición de grupos sulfhidrilos totales.....	57
3.3. Efecto de la temperatura del proceso de concentración	58
3.4. Efecto de tiempo de proceso.....	59
3.5. Efecto del volumen de muestra	59
3.6. Efecto de las interacciones entre los factores de estudio.....	60
3.7. Medición de grupos disulfuro.....	65
4. CONCLUSIONES	69
5. BIBLIOGRAFÍA.....	70

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO I: ASPECTOS GENERALES

Cuadro 1. Producción nacional de la leche de vaca.....	5
Cuadro 2. Volumen de producción de leche, 2000-2006.....	6
Cuadro 3. Composición química de la leche de vaca:.....	13
Cuadro 4. Composición media de la micela de caseína en g/100 g.....	14
Cuadro 5. Principales cambios por tratamientos térmicos y consecuencias	25

CAPÍTULO II: MEDICIÓN DE GRUPOS SULFHIDRILO (SH) Y DISULFURO (S-S) EN LECHES CONCENTRADAS A BAJA TEMPERATURA Y PRESIÓN DE VACÍO

Cuadro 1. Condiciones de operación del rota-vapor durante el experimento....	49
Cuadro 2. Diseño factorial completo. Listado de tratamientos.	50
Cuadro 3. Soluciones requeridas para determinación de grupos disulfuro.	54
Cuadro 4. Comparación de valores experimentales y teóricos de grupos SH...58	
Cuadro 5. Curva patrón para determinación de grupos disulfuro	66
Cuadro 6. Comparación de valores experimentales y teóricos de grupos S-S..	68

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I: ASPECTOS GENERALES

Figura 1. Volumen de producción de leche (2000-2008).....	6
Figura 2. Comportamiento de la producción de leche a través del año.....	7
Figura 3. Producción de leche por estado.....	8
Figura 4. Gasto corriente en leche por trimestre.. ..	9
Figura 5. Gasto por decil en derivados lácteos.. ..	10
Figura 6. Volumen de importación de leche en polvo.....	11
Figura 7. Modelo de la submicela propuesto por schmidt	17
Figura 8. Representación esquemática de las fases durante el plegamiento de una cadena polipeptídica dentro de una estructura proteica nativa y ensamble en de la estructura cuaternaria.....	19

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO II: MEDICIÓN DE GRUPOS SULFHIDRILO (SH) Y DISULFURO (S-S) EN LECHE CONCENTRADAS A BAJA TEMPERATURA Y PRESIÓN DE VACÍO

Figura 1. Interacción temperatura de concentración y volumen de muestra sobre el contenido de grupos sulfhidrilos totales.	60
Figura 2. Interacción temperatura de concentración y tiempo de proceso sobre el contenido de grupos sulfhidrilos totales.	63
Figura 3. Interacción volumen de muestra y tiempo de proceso sobre el contenido de grupos sulfhidrilos totales.	65
Figura 4. Curva de absorbancia correspondiente a cada concentración de pCMB.....	67
Figura 5. Curva patrón de la reacción pCMB-ditiozono, para la determinación de grupos disulfuro	67

CAPÍTULO I: ASPECTOS GENERALES

1. INTRODUCCIÓN

La leche es el primer alimento del hombre y constituye su única fuente de nutrientes al momento del nacimiento. Este alimento contiene cantidades relativamente importantes de unos 55 nutrientes esenciales para el hombre (Amiot, 1991).

Dada su composición nutritiva la leche es altamente susceptible al desarrollo de microorganismos por lo que es perecedera, lo que origina que siempre se busque conservarla mediante tratamientos térmicos (pasteurización, esterilización, concentración), o su transformación en diversos productos derivados, como el queso principalmente.

En cuanto al entorno nacional, la agroindustria láctea está conformada por el conjunto de empresas involucradas en el acondicionamiento y transformación de la leche en derivados; ésta presenta dos rasgos notables: su heterogeneidad (v.g. según el sistema lechero que la establece, y los productos que elabora), y su concentración económica y tecnológica (Villegas, 2004).

La mayor parte de la leche producida en México se canaliza al consumo como leche fluida. Una porción todavía considerable (quizá 25 %) del total circula como leche cruda, para hervir y elaborar quesos artesanales, el resto se dedica a la elaboración de leche pasteurizada, UHT y otros derivados, por ejemplo, queso, yogur (Villegas, 2004).

A nivel general, en México existen tres tipos de explotaciones ganaderas que son: las especializadas o intensivas, las de doble propósito y las de traspato o ganadería familiar. De éstas, las dos últimas producen cerca del 60 % de la leche del país y mantienen un comportamiento heterogéneo en el volumen de producción ya que en la época de lluvias (junio, julio, agosto) presentan una alta producción y durante el resto del año esta producción tiende a bajar por la disposición de forrajes, principalmente.

Por lo anterior, se buscan actualmente otras formas de manejo de la leche fluida que permitan su uso óptimo, dentro de las cuales destacan el secado (leche en polvo) y concentración, por lo que conocer las características y cambios sufridos en la leche durante su concentración retoma importancia para conocer las opciones más viables.

Dos de los mayores defectos asociados con los tratamientos térmicos severos (altas temperaturas y/o tiempos prolongados) como los UHT en la leche son: 1) sabor a cocido seguido por desarrollo de otros defectos en el sabor y 2) desestabilización de las proteínas, resultando en la formación de depósitos en los equipos de calentamiento y/o gelificación o formación de precipitados finos en los envases (Patrick y Swaisgood, 1976).

La exposición de grupos sulfhidrilos en las proteínas de suero ocurre a la par del desarrollo de sabor a cocido y, de hecho, la aparición de estos sabores parece ser dependiente de la presencia de estos grupos. La inestabilidad de las

proteínas de suero durante el tratamiento térmico parece estar directamente relacionado con el cambio en la relación de grupos sulfhidrilos/disulfuro de estas proteínas (Patrick y Swaisgood 1976).

En la actualidad, el desarrollo de mejores tecnologías de proceso de producción, económicamente más rentables (v.g. ultrafiltración, osmosis inversa y electrodiálisis) ha hecho posible un incremento dramático en la producción de derivados de leche como los concentrados de proteína de suero (WPC). Sin embargo, estos productos, como el WPC, obtenidos de diferentes procesos no muestran la misma funcionalidad y estabilidad en formulaciones estandarizadas (Hollar y Parris, 1995).

Se han realizado numerosos estudios del contenido de los grupos sulfhidrido y disulfuro en leches que han sido tratadas térmicamente bajo diversas condiciones usando una amplia variedad de métodos analíticos; sin embargo, es limitado el número de estudios que han analizado el comportamiento de estos grupos en el proceso de concentración en vacío a bajas temperaturas y diferentes tiempos de proceso, por lo que este estudio pretendió analizar el comportamiento de el contenido de grupos sulfhidrilos y disulfuros durante este tipo de procesos, dada la importancia que el contenido de ellos representa en las características del producto obtenido y la funcionalidad que a éstos confieren. Asimismo, se planteó determinar las mejores condiciones de un proceso de concentración de leche sin que ésta sufra daños severos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Situación actual de la producción de industria láctea en México

2.1.1. Producción nacional de leche de bovino

Una base de datos confiable de esta agroindustria, a nivel nacional, no está disponible actualmente, dado que un gran número de microempresas opera en la economía informal y por tanto escapa del registro oficial (Villegas, 2004). Sin embargo, en el Cuadro 1 se muestran las principales variables que la conforman.

Cuadro 1. Producción nacional de la leche de vaca

Año	Volumen de Producción (miles de Litros)*	Precio medio al Productor (\$ /L)*	Valor de la Producción (Miles de Pesos)*	Importación (miles de Toneladas)**	Exportación (miles de Toneladas)*
1996	7,586,422	2.34	17,754,222	2,099.81	62.97
1997	7,848,105	2.60	20,372,539	2,082.34	64.67
1998	8,315,711	2.86	23,796,755	2,477.96	85.31
1999	8,877,314	2.97	26,404,552	2,784.17	114.57
2000	9,311,444	3.19	29,725,151	2,962.92	112.52
2001	9,472,293	3.20	30,355,737	2,910.92	131.05
2002	9,658,282	3.15	30,418,103	3,369.80	115.30
2003	9,784,355	3.22	31,531,371	3,467.19	130.18
2004	9,864,300	3.50	34,547,413	3,304.33	158.19
2005	9,868,301	3.76	37,078,797		
2006	10,088,551	3.79	38,232,681		
2007	10,345,982	4.03	41,720,669		
2008	10,589,481	4.32	45,775,180		
2009					

FUENTE: *SIACON; **FAOSTAT (2009).

En los últimos años se han logrado avances en la tecnificación de la producción lechera. La aplicación de técnicas en el manejo de ganado con mejores

características productivas y en el equipamiento de las explotaciones, ha permitido el crecimiento de la producción de leche de bovino como se observa en el Cuadro 2 y Figura 1 (Gallardo-Nieto, 2005).

Cuadro 2. Volumen de producción de Leche, 2000-2006 (miles de litros).

Año	Producción	Crecimiento anual %
2000	9311444	4.9
2001	9472293	1.7
2002	9658282	2.0
2003	9748355	1.3
2004	9864300	0.9
2005	9868301	0.9
2006	10088551	1.7
2007	10345982	2.5
2008	10589481	2.3

Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), SAGARPA (2009).

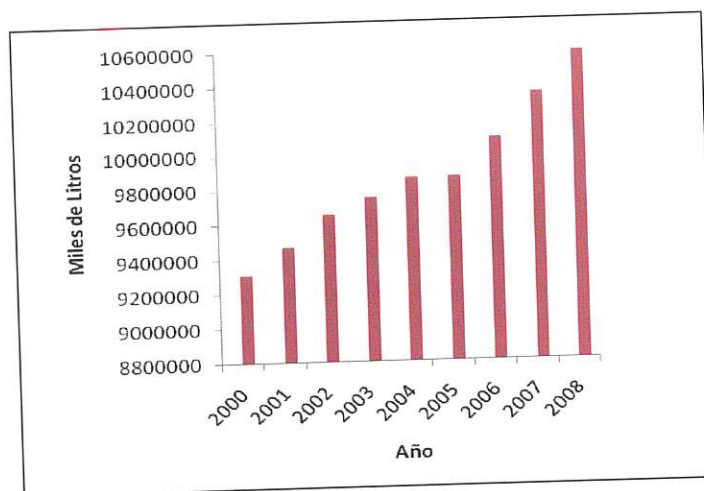


Figura 1. Volumen de producción de leche (2000-2008).

Aunado a lo anterior, se ha enfrentado un mercado más estable, con una mayor demanda de leche de producción nacional ante el encarecimiento de las importaciones de leche y sus derivados, especialmente hacia el segundo semestre de 2004 (Gallardo-Nieto, 2005).

2.1.2. Estacionalidad de la producción

Un factor altamente influyente en el demérito para la producción de leche es el comportamiento de la producción de leche a través del año (Figura 2), dado que en época de lluvias se presentan incrementos considerables en los volúmenes producidos.

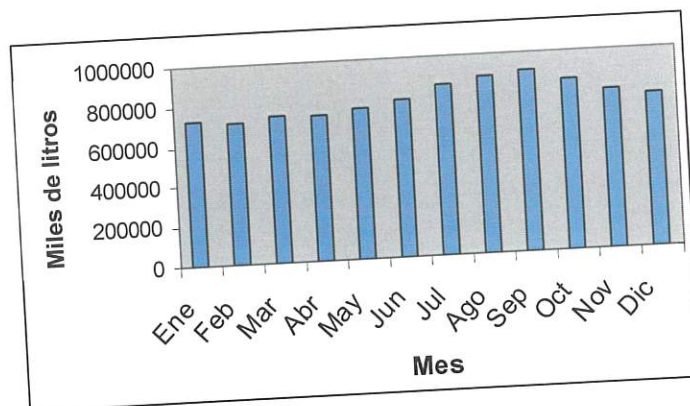


Figura 2. Comportamiento de la producción de leche a través del año, (datos promedio 1997-2007). Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), SAGARPA (2008).

Según Gallardo-Nieto (2006) este fenómeno ocasiona sobre-oferta en el mercado con una caída en los precios liquidados al productor, presentándose incluso volúmenes sin colocación en el mercado. Esta condición no se ha

podido controlar debido a la falta de infraestructura para el secado de leche, así como por los costos financieros que implica su almacenamiento hasta su uso.

2.1.3. Distribución de la producción de leche

La producción de leche en México se caracteriza por una alta heterogeneidad, tanto por aspectos tecnológicos, socioeconómicos, como por las condiciones de localización de las explotaciones. En la Figura 3 se muestran los principales estados productores, donde se desprende la distribución de la producción en el país. Es de destacar que la región de la laguna llega a aportar hasta el 20 % del total de la producción.

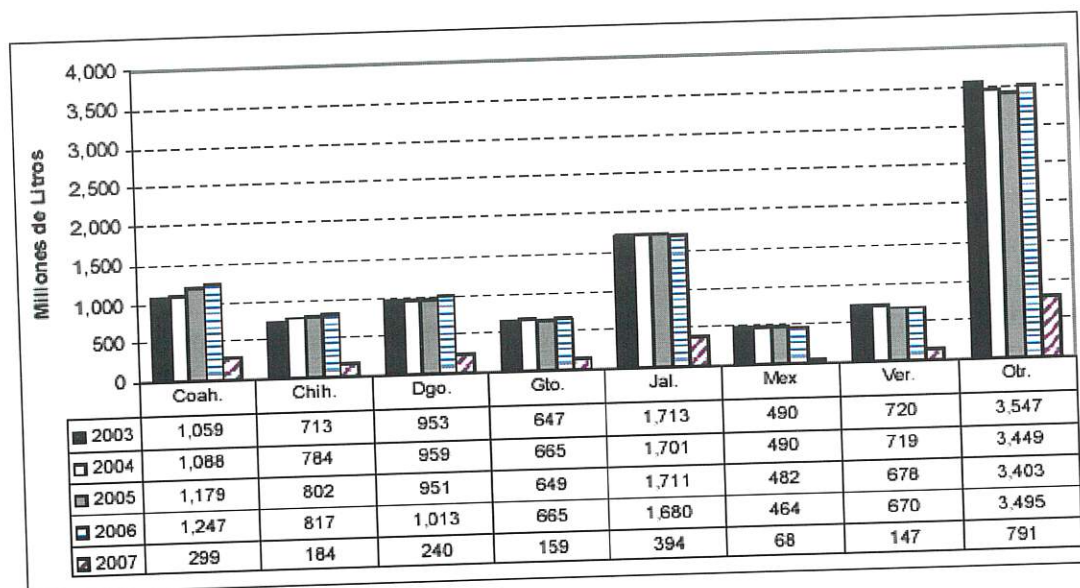


Figura 3. Producción de leche por estado. Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), SAGARPA. En Boletín de Leche Abril-Junio (2007).

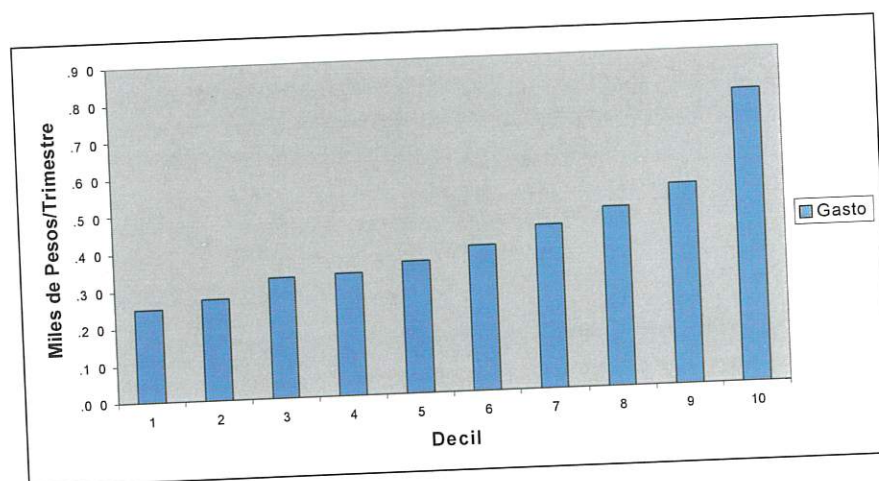


Figura 5. Gasto por decil en derivados lácteos. Fuente: INEGI. Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares (2006).

De todos los productos lácteos importados, la leche en polvo ocupa el mayor volumen. Para 2005, como se observa en la Figura 6, se importaron 182,800 toneladas, 15.3 % más que 2004 (Gallardo-Nieto, 2006). Este producto provino principalmente de la Unión Europea (43.8 %) y de Estados Unidos (28.2 %); Australia, Nueva Zelanda y Canadá en una menor proporción (Ángeles-Montiel *et. al.*, 2004).

En últimas fechas el precio de la leche ha aumentado considerablemente, Zavala-Peniche, titular de SEDESOL (El Universal, 23 de enero 2007), confirmó que la tendencia a la alza en el precio internacional de la leche en polvo continuaría, lo que tiene un grave impacto en el costo de leche Liconsa, ya que el 80 % de la materia prima que emplea esta paraestatal es de origen extranjero, ocupando un 65 % de la leche que se importa.

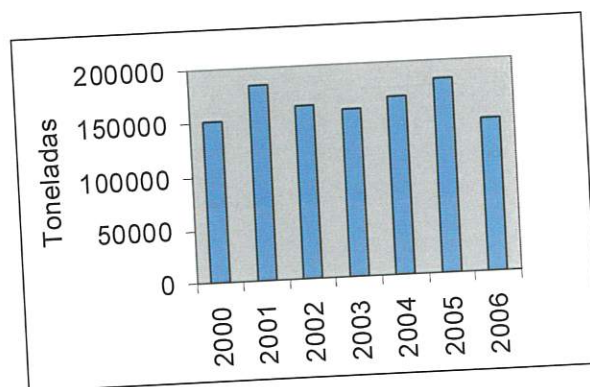


Figura 6. Volumen de Importación de Leche en polvo. Fuente: Sistema de Información Comercial de México (SIC-M) / Secretaría de Economía. Citado en Boletín de Leche Abril-Junio (2007).

El desabasto mundial de leche y su repercusión a la alza en los precios internacionales de la leche en polvo están impactando la operación de los programas sociales y ponen en riesgo su cobertura a los sectores más vulnerables del país (Corichi-García y Mejía-Haro, Senado de la Republica LX legislatura, 2007).

Se estima que aunado al incremento de los precios de la leche como materia prima de procesos industriales, y ante la imposibilidad de ampliar en forma rentable las importaciones de leche, ya fuera fluida o en polvo, se incentivó un mayor empleo de sucedáneos en la elaboración de productos (Gallardo-Nieto, 2005).

2.1.6. Composición de la leche

La leche es el producto de la secreción de las glándulas mamarias de los mamíferos, que proporciona nutrimentos y protección inmunológica a sus críos. En la mayoría de las especies contiene más agua que otros componentes, y se constituye de una compleja dispersión acuosa que contiene, mayoritariamente, proteínas, lípidos, lactosa y minerales (Cuadro 3).

Todos los componentes de la leche forman una dispersión acuosa que contiene grasa en un estado de emulsión, proteínas en estado coloidal y molecularmente dispersas, y compuestos orgánicos solubles, incluyendo vitaminas hidrosolubles y sustancias nitrogenadas no proteicas (Santos, 1995).

2.1.7. Pasteurización de leche

La principal finalidad de la pasteurización es destruir las bacterias patógenas que eventualmente pueden encontrarse en la leche. Por ello es una medida plenamente justificada, dado que durante la fabricación de productos lácteos, como el queso, se trabaja generalmente a temperaturas propicias para el desarrollo microbiano; sin embargo, se sabe que los gérmenes no sobreviven más de dos meses en el queso, por lo que la pasteurización se recomienda para quesos que se pongan a la venta antes de los 60 días de fabricados (Dumais *et al.*, 1991).

Cuadro 3. Composición química de la leche de vaca:

Componente	% o mg/454g
Proteína	3.5 %
Grasa	3.5 %
Carbohidratos	4.9 %
Calcio	535mg
Fósforo	422mg
Hierro	0.2mg
Sodio	227mg
Potasio	654mg
Tiamina	0.15mg
Riboflavina	0.78mg
Niacina	0.3mg
% de acidez de la leche ¹	0.1 %
pH normal	6.4-6.8

Fuente: Watt y Merrill (1963). ¹La acidez comprende: caseína, albúmina, bióxido de carbono, citratos y fosfatos.

Sin embargo, la pasteurización reduce el diámetro de micelas de caseína, lo que afecta de manera negativa la aptitud de la leche para la coagulación, defecto fácilmente subsanable con la adición de sales cálcicas y fermentos lácticos puros (Dilanjan, 1984).

La pasteurización baja se define, en la mayoría de los países, como un tratamiento térmico de tal intensidad que inhibe la fosfatasa alcalina de la leche. Puede llevarse a cabo calentando 30 minutos a 63 °C o 15 segundos a 72 °C. Se destruyen así casi todos los microorganismos patógenos presentes y la mayoría de las formas vegetativas microbianas. Entre los cambios originados por éste tratamiento destacan la inactivación permanente de enzimas, ligeras modificaciones en sabor, pequeñas modificaciones de las proteínas del lacto-suero y se retarda ligeramente el efecto del cuajo (Walstra y Jenness, 1987).

2.2. Proteínas lácteas

2.2.1. Micelas de caseína, estructura y función

Todas las caseínas son moléculas de gran tamaño que contienen fósforo y un gran número de aminoácidos. Entre ellos los más abundantes son el ácido glutámico y en menor grado la leucina y la prolina. El fósforo está presente en las moléculas en forma de monoéster fosfórico de los aminoácidos alcoholes serina y treonina (Veisseyre, 1988).

En la leche sin enfriar casi toda la caseína se presenta como partículas más o menos esféricas, la mayoría de las cuales tienen un diámetro de 0.02-0.30 μm , que comprenden de 20 a 150,000 moléculas de caseína (Walstra y Jenness, 1987). La micela de caseína es una partícula esférica (Cuadro 4) formada por la asociación de caseínas (α_{s1} - α_{s2} - β - κ) y algunos fragmentos peptídicos (las caseínas γ) que aparecen como consecuencia de la proteólisis de la caseína β y componentes salinos, entre los que hay que destacar el Ca y el fosfato (Brule y Lenoir, 1990).

Cuadro 4. Composición media de la micela de caseína en g/100 g.

Caseínas		Componentes salinos	
α_{s1}	33	Calcio	2.9
α_{s2}	11	Magnesio	0.2
β	33	Fosfato inorgánico	4.3
κ	11	Citrato	0.5
γ	4		
Total caseínas	92	Componentes salinos totales	8.0

Fuente: Brule y Lenoir (1990).

Las micelas de caseína contienen materia inorgánica, principalmente fosfato cálcico, en una porción de unos 8 g por 100 g de caseína. Las partículas son voluminosas, conteniendo más agua que caseína. Contienen además pequeñas cantidades de algunas otras proteínas, como las enzimas lácteas, lipasa y plasminá (Walstra y Jenness, 1987).

La existencia y las propiedades de las micelas de caseína tienen consecuencias en el empleo de la leche; son en gran parte responsables de la estabilidad de los productos lácteos durante su calentamiento, concentración y almacenamiento. Su comportamiento es esencial en varias fases de la fabricación de queso (Walstra y Jenness, 1987). Para Riel (1991), es de suponer que cada micela se encuentra conformada por un gran número de subunidades unidas entre ellas. Para Walstra y Jenness (1987) estas subunidades reciben el nombre de submicelas y las describen como formas esféricas de un diámetro aproximado de 10 nm; el espacio entre las submicelas es ocupado por agua.

Sin embargo, como lo menciona Villegas (2004), la organización de las micelas, que implica la repartición de sus componentes y su modo de asociación, permanece hasta hoy desconocida. Pese a esto, se han propuesto diversos modelos. Unos le atribuyen a la micela una estructura globular, con una repartición no uniforme de sus componentes; otros, retienen la idea de una estructura formada por subunidades o submicelas.

Según Schmidt (1980), citado por Brule y Lenoir (1990), la micela estaría formada por un conjunto de subunidades, de naturaleza exclusivamente proteica y de composición variable que se asocian las unas con otras a través de elementos minerales como el Ca, Mg y fosfato, principalmente (Figura 7).

Al interior de las submicelas, las caseínas se enlazan por enlaces hidrofóbicos. Cada una, empero, muestra en la periferia zonas hidrofílicas, por medio de las cuales establece puentes fosfocálcicos o cálcicos con otras submicelas, en forma tal que se genera una estructura casi esferoidal formada por submicelas agregadas. Puesto que en el interior las micelas caseínicas contienen calcio, fósforo y magnesio, se dice que están frecuentemente mineralizadas (Villegas, 2004).

2.2.2. Proteínas del lactosuero, estructura y función

Cerca del 20 % de la proteína total de la leche pertenece a un grupo de proteínas generalmente referidas como proteínas de suero o seroproteínas. Sus principales características son (Fox, 2003):

- Solubles a pH 4.6.
- Soluble en solución saturada de NaCl.
- Solubles después de coagulación enzimática de la caseína.
- Separables de las micelas de caseína por filtración en gel.
- Separables de las micelas de caseína por microfiltración.
- No sedimentadas por ultra-centrifugación, con o sin Ca^{2+} .

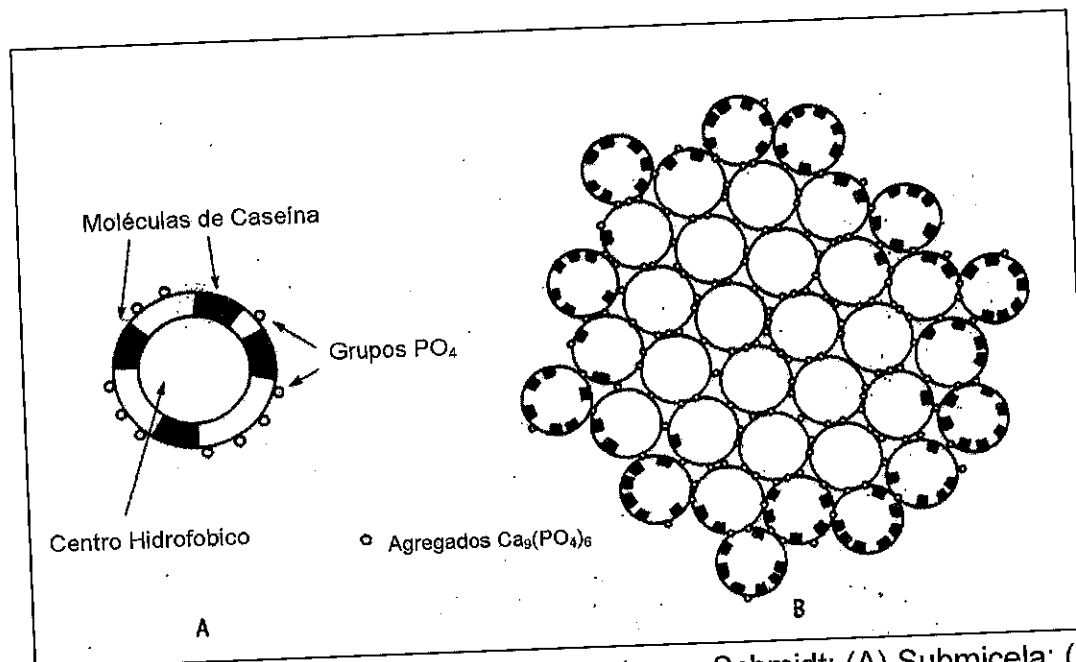


Figura 7. Modelo de la Submicela propuesto por Schmidt: (A) Submicela; (B) Micela de Caseína. Fuente: Rollema (1992).

2.2.3. β -lactoglobulina

La β -lactoglobulina es la principal proteína en la leche; representa cerca del 50 % de las proteínas de suero y cerca del 12 % de la proteína total de leche. La β -lactoglobulina bovina β -Lg consiste de 162 residuos por monómero, con un peso molecular de cerca de 18 kDa y es rica en aminoácidos sulfurados, los cuales le confieren un alto valor biológico de 110; adicionalmente contiene 2 puentes disulfuro intermoleculares y un mol de cisteína por monómero de 18 kDa (Fox, 2003).

La cisteína es especialmente importante por su capacidad para reaccionar a la desnaturalización térmica, formando interacciones con disulfuros intermoleculares con la κ -caseína y provocando efectos significativos en la coagulación enzimática y la estabilidad al calor de la leche (Singh, 1991). Estas

interacciones son también responsables del desarrollo de sabor a cocido de la leche calentada (Hutton and Patton, 1952; Swaisgood 1980).

La β -Lg es una proteína altamente estructurada, a un pH entre 2 y 6 del 10 al 15 % de las moléculas existen como α -hélices, 43 % como β -laminar y el 47 % como estructuras desordenadas como β -giros. Tiene una estructura altamente compacta, donde cada monómero existe casi como una esfera de un diámetro cercano a 3.6 nm (Fox, 2003; Whitford, 2005).

2.2.4. Desnaturalización y plegamiento de proteínas

Todas las proteínas empiezan su existencia en un ribosoma, como una secuencia lineal de residuos de aminoácidos. Para alcanzar su conformación nativa, este polipéptido debe plegarse durante y a continuación de la síntesis. En la Figura 8 se representan los pasos generales de tal proceso, la conformación nativa es sólo marginalmente estable, donde cambios moderados en el entorno de la proteína pueden acarrear cambios estructurales que puedan afectar al función (Nelson y Cox, 2001).

Dentro de la conformación nativa de las proteínas, la secuencia primara está formada por condensación de un residuo de aminoácido. Esto es la unión de un grupo α -carboxilo de un aminoácido con un el α -amino de otro. Cada proteína está definida por una secuencia única de residuos y todos los niveles de organización subsecuentes (secundaria, terciaria, cuaternaria) siguen esta estructura primaria (Whitford, 2005).

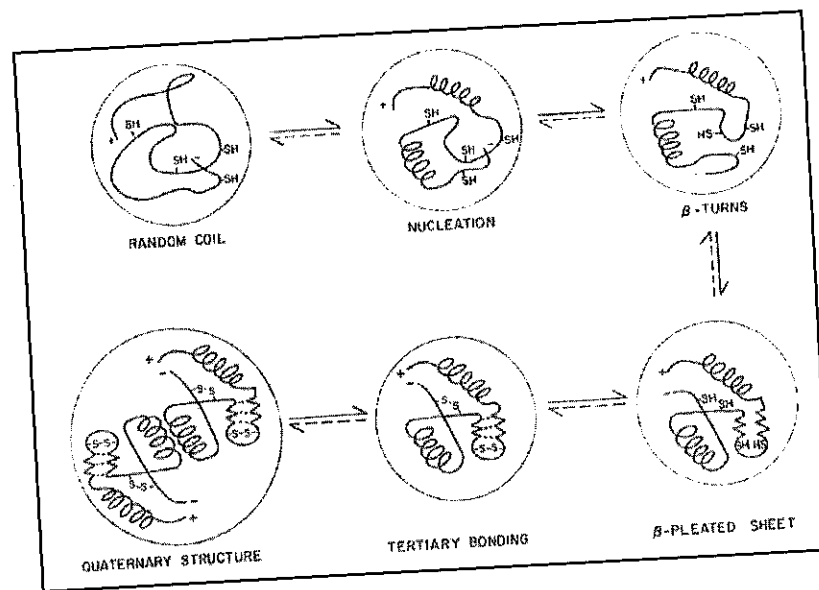


Figura 8. Representación esquemática de las fases durante el plegamiento de una cadena polipeptídica dentro de una estructura proteica nativa y ensamble en de la estructura cuaternaria. Fuente: Whitaker (1977).

Así, el principal enlace de la estructura primaria es un enlace peptídico covalente con un calor de formación cercano a 100 Kcal/mol que no se rompe durante la desnaturalización. Para la ruptura de un enlace peptídico se requeriría de una reacción de catálisis con ácidos o bases fuertes en presencia de calor, o por enzimas proteolíticas (Whitaker, 1977).

La estructura secundaria de una proteína consiste de regiones helicoidales (α -hélices, normalmente) y por regiones β -planas. Las α -hélices son estabilizadas por 3.6 puentes de hidrógeno en promedio por giro; los puentes de hidrógeno son débiles, teniendo un calor de formación de 1-5 Kcal/mol y son fácilmente perturbados por la competencia del puente con el agua, pero en las α -hélices y en el interior de la molécula nativa no hay presencia de agua. Las regiones β -planas son estabilizadas por puentes de hidrógeno y en menor medida por

interacciones electrostáticas hidrofóbicas entre el las cadenas de residuos de aminoácidos, las interacciones electrostáticas son bastante débiles, sin embargo, en colectivo éstas confieren la estabilidad de las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias (Whitaker, 1977).

2.2.5. Pérdida de estructura y pérdida de función de proteínas

Las estructuras proteicas han evolucionado para funcionar en entornos celulares concretos. Condiciones diferentes a las de la célula pueden provocar cambios grandes y pequeños en la estructura de la proteína. La pérdida suficiente de estructura tridimensional para originar la pérdida de funciones se denomina desnaturalización (Nelson y Cox, 2001); la desnaturalización es un cambio en las estructuras secundaria y terciaria (Whitaker, 1977) durante el cual el arreglo espacial de las cadenas polipeptídicas dentro de la molécula cambia de la forma típica o nativa a un arreglo más desordenado (Boye *et al.* 1997).

La mayoría de las proteínas se pueden desnaturalizar mediante calor, el cual afecta de una manera compleja a las interacciones débiles de las mismas (los enlaces de hidrógeno) lo que resulta generalmente en nuevas conformaciones temporales (Boye *et al.* 1997; Nelson y Cox, 2001). Si la temperatura se aumenta lentamente, la conformación de la proteína generalmente permanece intacta hasta que tiene lugar una pérdida brusca de la estructura (y función) dentro de un estrecho margen de temperaturas. La brusquedad del cambio sugiere que el desplegamiento es un proceso cooperativo: la pérdida de

estructura en una parte de la proteína desestabiliza otras partes. El efecto del calor no es fácilmente predecible (Nelson y Cox, 2001).

La desnaturalización de proteínas puede llevarse a cabo no solamente por acción del calor, sino también por la acción de extremos de pH de ciertos disolventes orgánicos miscibles en agua, como por ejemplo, el alcohol o la acetona de ciertos solutos tales como la urea o el cloruro de guanidinio o mediante detergentes. El tratamiento con cada uno de estos agentes desnaturalizantes puede considerarse relativamente suave, en el sentido de que no se rompen los enlaces covalentes de la cadena polipeptídica. Los disolventes orgánicos, la urea y los detergentes actúan principalmente rompiendo las interacciones hidrofóbicas que conforman el núcleo estable de las proteínas globulares (Nelson y Cox, 2001).

2.2.6. Desnaturalización de proteínas lácteas

La conformación de una proteína globular es estabilizada por un gran número de enlaces débiles; si la cadena peptídica se desdobra, la entropía de formación se aumenta y muchos grupos, especialmente enlaces pépticos, se hidratan lo que origina una gran cantidad de energía libre y el diferencial con respecto a la energía libre total de los enlaces que dan la conformación compacta disminuye, causando que la estabilidad conformacional sea mínima, por lo que ligeros cambios en las condiciones pueden por tanto llevar a desdoblamiento (Walstra *et al.*, 2006).

El desdoblamiento de las proteínas, como ya se mencionó, es llamado desnaturalización e implica una transformación de una proteína globular nativa a una proteína más o menos desordenada. Muchos agentes pueden causar desnaturalización de proteínas globulares, a continuación se mencionan brevemente los citados por Walstra *et al.* (2006):

Alta temperatura. Conduce siempre a desnaturalización (incrementando el efecto del cambio en la entropía de formación), aunque la temperatura necesitada varía; un valor comúnmente citado es 70 °C.

Baja temperatura. Puede causar desnaturalización de algunas proteínas (los puentes hidrofóbicos se vuelven ligeramente más débiles o incluso repulsivos); el pronto enfriamiento es siempre requerido, al menos a 20 °C, temperatura a la cual la estabilidad en la conformación es máxima.

Alta presión. Una presión hidrostática superior a 200 MPa (2 kbar) puede incluso causar desnaturalización por ruptura de puentes de hidrógeno.

pH alto. Una condición de pH por arriba de 8 ó 9 puede causar desnaturalización (debido a la repulsión mutua entre grupos cargados negativamente); sin embargo estos valores de pH rara vez se aplican en la práctica, incluso a bajo pH la desnaturalización puede ocurrir.

La adición de muchos agentes en altas concentraciones a las soluciones de proteína causan desnaturalización, por la ruptura de puentes de hidrógeno, pero estos agentes no son aplicados en la industria láctea; la urea, sin embargo, es frecuentemente usada en el laboratorio.

A menudo, una combinación de dos agentes puede fácilmente desnaturalizar a las proteínas; por ejemplo, un incremento moderado en la temperatura y un ligero aumento en el pH. Según Hollar y Parris (1995), la desnaturalización de las proteínas del suero inicia con un abultamiento inicial de la estructura de la proteína cuando ésta es primero expuesta al calor. A medida que la intensidad del tratamiento térmico se incrementa, las proteínas del suero se desdobl原因, agregan y sedimentan a través de un proceso múltiple (Hollar y Parris, 1995; Boye *et al.*, 1997).

La desnaturalización lleva a pérdida de la funcionalidad de la proteína nativa; por ejemplo, su desempeño como enzimas. En principio, sin embargo, la desnaturalización es un proceso reversible: al cambiar la condición a su valor original, por ejemplo, la reducción de la temperatura a su valor inicial, se recupera la conformación original y así mismo la actividad funcional. En la práctica, la regeneración frecuentemente no se consigue, porque las proteínas desdobladas son mucho más reactivas y pueden sufrir modificaciones en los enlaces covalentes que luego evitan la reconformación al estado nativo (Nelson y Cox, 2001; Walstra *et al.*, 2006).

2.2.7. Cambios causados por calentamiento

Los cambios en la composición de la leche causados por un incremento en la temperatura pueden ser reversibles o irreversibles. Los cambios sufridos por estos tratamientos son variables y muchos de ellos son interdependientes y pueden, incluso, ocurrir a diversas intensidades de calentamiento. En el Cuadro 5 se listan de forma breve los principales cambios químicos y físicos sufridos.

De las proteínas del suero, α -LA tiene la más baja temperatura de desnaturalización, 62 °C, seguida por β -SA a 64 °C, Ig a 72 °C, y β -LG a 78 °C. La β -lactoglobulina se desnaturaliza más rápido que α -LA a 85 °C y a otras temperaturas en leche calentada y sistemas de suero, y el efecto global del calentamiento es mayor en β -lactoglobulina que en α -LA esto se debe a que α -LA tiene capacidad de renaturalización en enfriamiento por lo que es considerada la lactoproteína mas termo estable (Hollar y Parris, 1995). En el caso de la β -lactoglobulina, Anema (2000) reportó que la desnaturalización de esta proteína es fuertemente dependiente de la concentración de sólidos presentes en la leche.

Cuadro 5. Principales cambios por tratamientos térmicos y sus consecuencias

Cambios	Consecuencias
1. Los gases, incluyendo el CO ₂ , son parcialmente removidos. La pérdida de O ₂ es importante para la tasa de reacciones de oxidación durante el calentamiento y para la tasa de crecimiento de algunas bacterias, la pérdida de gas es reversible pero requiere de un largo tiempo.	a. El crecimiento bacteriano de microorganismos sobrevivientes o adquiridos después del tratamiento térmico puede ser severamente afectado, generalmente aumentado, principalmente por la inactivación de inhibidores.
2. La proporción de fosfato coloidal se incrementa y la concentración de Ca ²⁺ disminuye, también reversible pero le toma alrededor de 24h.	b. Caída del valor nutritivo.
3. Isomerización de lactosa, se disminuye el rendimiento de lactulosa y ácidos orgánicos.	c. Cambios apreciables en sabor, debidos a los puntos 9, 10, 11 y 15 citados anteriormente.
4. Hidrolización de esteres fosfóricos (particularmente caseínas), los fosfolípidos se parten lo que aumenta la proporción de fosfato inorgánico.	d. Cambios en color. Al inicio se aumenta el brillo ligeramente por el cambio 2. Un tratamiento más severo producirá colores oscuros (café) debido al punto 9.
5. El pH de la leche disminuye y la acidez titulable aumenta, debido a los cambios 2, 3, y 4.	e. Incremento en viscosidad (por 6 y sobre todo 12). Especialmente en leches concentradas y esterilizadas.
6. La mayoría de las proteínas del suero se desnaturalizan y así se insolubilizan.	f. La coagulación por calor en leches evaporadas disminuye severamente cuando la leche ha sido previamente calentada y las proteínas de suero han sufrido ya una desnaturalización.
7. Parte de las proteínas de suero (especialmente β-lactoglobulina) forma enlaces covalentes con la κ-caseína y con algunas proteínas de la membrana del glóbulo de grasa.	g. La acción enzimática del cuajo se reduce y la proporción de sinéresis de las cuajadas disminuye.
8. Inactivación de enzimas.	h. La tendencia al cremado disminuye.
9. Ocurren reacciones entre proteína y lactosa, principalmente reacción de Maillard, lo que incluye una pérdida de la lisina disponible.	i. La propensión a la auto oxidación se afecta en diversas formas.
10. Se forman grupos -SH libres, esto causa, por ejemplo, disminución de el potencial REDOX.	j. La composición de las capas superficiales de los glóbulos grasos formados durante la homogenización o recombinación es afectada por la intensidad del calentamiento antes de la homogenización o recombinación principalmente por el cambio numero 6.
11. Otras reacciones ocurren entre las proteínas.	
12. Las micelas de caseínas se agregan, pudiendo llegar a la coagulación.	
13. Cambios severos ocurren a la membrana del glóbulo de grasa, e.g., en su contenido de Cu.	
14. Acilglicerolos se hidrolizan y se interesterifican.	
15. Se forman lactonas y metilketonas a partir de grasa.	

Fuente: Walstra *et al.* (2006).

A una temperatura de 75 °C la tasa de desnaturalización se ve retardada al aumentar la concentración de sólidos, sin embargo, con un aumento en la temperatura la disminución en la tasa de desnaturalización es menos pronunciada, y a 100 °C el contenido de sólidos ya no marca diferencia.

En varios sistemas de suero, el Ca, los sólidos totales y el pH afectan la desnaturalización de la proteína del suero, puesto que ayudan a la protección de la proteína globular de la desnaturalización térmica. La lactosa también afecta la solubilidad de la proteína del suero después del tratamiento con calor (Hollar y Parris, 1995).

En estudios prácticos, se ha encontrado que leches concentradas recombinadas hechas a partir de leches térmicamente tratadas fueron más estables que las hechas con leches no tratadas térmicamente. Un calentamiento antes de la desnaturalización de la proteína de suero mejora parcialmente la estabilidad al calor de la leche y sistemas de suero (Newstead *et al.*, 1977, citado por Hollar y Parris 1995).

2.2.8. Grupos sulfhidrilo y disulfuro en leche: importancia y determinación

Dos de los mayores defectos asociados con los tratamientos térmicos severos (altas temperaturas y/o tiempos prolongados) como los UHT en la leche son: 1) sabor a cocido seguido por desarrollo de otros defectos en el sabor y 2) desestabilización de las proteínas, resultando en la formación de depósitos en

los equipos de calentamiento y/o gelificación o formación de precipitados finos en los envases (Patrick y Swaisgood, 1976)

Los grupos tiol ($-SH$) de la cisteína son muy reactivos en su forma ionizada, se les llama grupo mercapto o sulfhidrilo y es la cadena lateral más reactiva de los 20 aminoácidos comúnmente encontrados y reacciona con diversos agentes. El átomo de sulfuro influencia significativamente las propiedades de la cadena, con formación de puentes disulfuro entre residuos de cisteína cercanos, formando un enlace covalente fuerte; asimismo, ejerce restricciones conformacionales considerables en la estructuras adoptadas. El grupo tiol ioniza a pH alcalinos ($\sim pH 8.5$) para formar un anión tiolato reactivo (S^-) el cual reacciona rápidamente con muchos componentes, de los cuales los más importantes incluyen otros tioles y disulfuros en reacciones de intercambio ocurriendo a pH neutral o alcalino (Whitford, 2005).

En la cadena peptídica el grupo sulfhidrilo tiene un pK alrededor de 9.5 a 25 °C, lo cual implica que a un pH de 6.1, 6.4, y 6.7, en promedio, 0.04 %, 0.08 % y 0.16 % del grupo, respectivamente está disociado. Consecuentemente, la tasa de reacción de $CH_2-SH + OH^-$ (cisteína) a $CH_2-S^- + H_2O$ depende fuertemente del pH. Obviamente, para que esta reacción pueda ocurrir la cadena peptídica debe estar desdoblada, a menos que el grupo tiol esté del lado exterior de la molécula, lo cual es excepcional (Walstra *et al.*, 2006).

La exposición de grupos sulfhidrilos en las proteínas de suero ocurre a la par del desarrollo de sabor a cocido y, de hecho, la aparición de estos sabores parece ser dependiente de la presencia de estos grupos. La inestabilidad de las proteínas de suero durante el tratamiento térmico parece estar directamente relacionado con el cambio en la relación de grupos sulfhidrilos/disulfuro de estas proteínas (Patrick y Swaisgood, 1976).

La actividad antioxidante y el contenido de sulfhidrilos totales de leche cruda no cambian durante su almacenamiento a 5°C. Sin embargo, leche que ha sufrido un tratamiento térmico pierde rápidamente los grupos sulfhidrilos después del calentamiento y, a la par, la actividad antioxidante también decae, aunque en una tasa menor, por ejemplo 7 horas después del tratamiento la muestra de leche ha perdido cerca de 14 % de la actividad antioxidante, pero el contenido de SH ha decaído ya en un 60 % (con relación a la medición inmediata a al tratamiento térmico). La pérdida en el contenido de sulfhidrilos totales representa la oxidación de grupos sulfhidrilos más reactivos resultado del calentamiento (Taylor y Richardson, 1980).

La caída de los sulfhidrilos totales se da cuando los tratamientos térmicos llevan la leche a la desnaturalización de las proteínas de suero, incrementando significativamente el número de tioles reactivos, los cuales se ven envueltos en reacciones de oxidación, como son las interacciones de intercambio intermoleculares con formación de puentes disulfuro S-S (Sava *et al.*, 2005). Se debe notar que estos cambios pueden ocurrir incluso a pH bajo (4.5) y baja

temperatura (20 °C), aunque serán ligeramente más lentos. La formación de puentes disulfuro puede considerablemente afectar la conformación proteica (Walstra *et al.*, 2006).

Según Swaisgood (1980), los puentes disulfuro en las proteínas y péptidos son un factor de enlace covalente fácilmente reversible en la estructura terciaria de las mismas y la estabilidad de estas uniones depende sobre todo del potencial de óxido-reducción del medio. La formación y hendiduras de los disulfuros en cadenas proteicas nacientes vía reacción entre péptidos tiolados ocurren durante el plegamiento de las proteínas.

Los puentes disulfuro dictan el plegamiento de una proteína al unirlos mediante fuertes enlaces covalentes entre los residuos de cisteína que usualmente están ampliamente separados en la estructura primaria. Un puente disulfuro no se puede formar entre residuos de cisteína cercanos y lo común es que los residuos de cisteína estén al menos separados por 5 residuos de otros aminoácidos. La formación de un puente disulfuro restringe por completo la conformación de los polipéptidos y se rompen únicamente a altas temperaturas, pH ácidos o en presencia de reductores (Whitford, 2005).

Los agentes reductores como el mercaptoetanol, tioglicolato disminuyen los enlaces disulfuro, sin embargo, la estabilidad al calcio de los complejos caseínicos decae promoviendo la gelificación, por ejemplo, de la leche esterilizada concentrada. El uso de sustancias como la N-etilmaleimida (NEM) y

el iodoacetato bloquean a los grupos $-SH$ para la formación de $S-S$ y retardan la gelificación (Nakai, 1964).

Actualmente, para trabajos en laboratorio, el rompimiento de $S-S$ se realiza mediante el uso de sulfito de sodio (SO_3^{2-}) el cual según Cayot *et al.* (2002) produce un grupo sulfhidrilo (SH) y un grupo sulfurado ($S-SO_3^-$).

2.2.9. Determinación de $-SH$ y $S-S$

Existen diversos métodos para su determinación, sin embargo, los que han comprobado su utilidad y reproducibilidad son los basados en la utilización de reactivo ELLMAN, el cual parte de la reacción de intercambio entre un disulfuro aromático con mercaptanos orgánicos con desarrollo de color.

Se trata de una reacción cuantitativa de Bis (p-nitrofenil) disulfuro (PNPD) con un mercaptano donde se libera 1 mol de p-tionitrobenzoato por mol de mercaptano. Este anión tiene un color amarillo con coeficiente de extinción molar de 13600/cm a 412 nm y es un ácido con un pK de 5.1 que a un pH de 8 se a ionizado en un 99 %, y la absorbancia a 412 nm puede ser usada como una medida de los mercaptanos capaces de desplazar al PNBD de los disulfuros presentes (Ellman, 1958).

En general, se sabe que existe una relación entre la intensidad del calor aplicado en el contenido de $-SH$ con una cinética de primer orden, donde la tendencia normal es el incremento de los grupos sulfhidrilo activos y, cuando el

tiempo de exposición al calor se prolonga, el contenido de -SH llega un punto máximo, seguido de un decremento que se intensifica con la extensión del periodo de exposición (Koka *et al.*, 1968).

El procedimiento Ellman para determinación de -SH presenta dificultades para su aplicación en análisis de leche, debido a la dificultad para su clarificación. Patrick y Swaisgood (1976), solucionaron el problema mediante la filtración de la muestra. Por su parte Guingamp *et al.* (1993) propusieron para su implementación el uso de un agente clarificante de patente protegida. En ambas metodologías se hace uso de soluciones de EDTA para inhibir la oxidación de los tioles presentes.

La metodología Ellman permite también la determinación de grupos disulfuro, sin embargo, existen otros métodos basados en el uso de mercuriales que permiten su determinación y también la de sulfhidrilos.

Los mercuriales orgánicos son compuestos altamente reactivos y son altamente sensibles y específicos para reacción con sulfhidrilos, han sido ampliamente usados en estudios de funciones bioquímicas de éstos, asimismo se han determinado en diferentes alimentos, entre ellos la leche, donde se encontró que la reacción de β -lactoglobulina con p-mercuriobenzoato es más lenta comparada con la de albumina (Boyer, 1954).

En 1957, Fridovich y Handler publicaron un método colorimétrico para determinar sulfhidrilos con mercuriales, cuya especial virtud es la traslación de la reacción a un cambio en absorbancia dentro del rango de luz visible, lo cual elimina la interferencia debida al uso de la región ultravioleta.

Esta metodología incluye el uso de ditiozono, el cual es un compuesto comúnmente usado en determinaciones de metales pesados y tiene capacidad de reaccionar con p-mercuribenzoato, mostrando una disminución lineal en la absorbancia a 620 nm a medida que se incrementa la concentración de mercurial. Si un exceso de p-mercuribenzoato se hace reaccionar con compuestos sulfhídricos, sólo el mercurial no unido al mercaptido está disponible para reaccionar con el ditiozono, permitiendo la simple determinación de -SH (Fridovich y Handler, 1957).

Sasago *et al.* (1963) modificaron la metodología de Fridovich y Handler (1957) agregando el uso de tetra acetato de etilenediamina (EDTA) y urea para la determinación de SH y S-S en leche. La urea permite la ruptura de puentes de hidrógeno y el EDTA disminuye la interferencia de los iones metálicos. Para la determinación de grupos S-S se emplea, además, sulfito de sodio para ruptura de enlaces covalentes.

2.2.10. Daños a la capacidad de coagulación enzimática de la leche por el calor

La leche que ha sido calentada a temperaturas mayores de 70 °C por un tiempo suficiente, presenta tiempos mayores de coagulación enzimática y forma geles más débiles que los obtenidos con leches no calentadas (Waungana *et al.*, 1996).

El calentamiento de la leche por encima de 60 °C induce cambios significativos, entre los que destacan la desnaturalización de las proteínas de suero y las interacciones resultantes con la κ -caseína, pero también produce conversiones de calcio soluble, magnesio y fosfato al estado coloidal, que provoca cambios en el producto de la coagulación enzimática (Singh y Waungana, 2001).

Se ha establecido que la κ -caseína es la fracción crítica de la caseína encargada de la estabilidad de las micelas. La molécula de κ -caseína se puede dividir en dos partes. La actividad de la quimosina u otra enzima proteolítica, durante la fase primaria de la reacción de cuajado, que es la hidrólisis del enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆. La κ -caseína se divide en para- κ -caseína (residuos 1-105), el cual es totalmente hidrofóbica, y el macropéptido (CMP) (residuos 106-169) el cual es muy hidrofílico. Algunos macropéptidos tienen ácido siálico unido. Frecuentemente, si los macropéptidos son glicosilados se les llama glucomacropéptidos GMP (Fox, 2003).

En general se acepta que la κ -caseína está situada en la superficie de la micela y que la proporción del macropéptido existe como un segmento, llamado comúnmente "hairs", el cual sobresale de la superficie y provee a la micela de una capa estérica, que la estabiliza (Kruif y Holt, 2003).

El papel de la renina es cortar o rasurar esa capa y, por consecuencia expone el centro de las micelas, las cuales por su naturaleza hidrofóbica empiezan a agregarse. Esta reacción constituye la segunda etapa del cuajado (Martin *et al.*, 2003).

Dado que el proceso de coagulación conlleva al rompimiento específico del enlace 105-106 de la κ -caseína, éste se ve fuertemente interferido cuando se usan leches que contienen proteínas de suero desnaturalizadas, las cuales son capaces de formar complejos con las micelas de caseína, específicamente con κ -caseína por formación de puentes disulfuro (Waungana *et al.*, 1996).

Singh y Waungana (2001) reportaron que la desnaturalización de β -Lg puede darse incluso a bajas temperaturas si el tiempo es prolongado o calentando la leche a una velocidad más baja de lo requerido para alcanzar una temperatura de tratamiento.

2.2.11. Medición de la actividad enzimática

Históricamente, la actividad enzimática ha sido medida en términos del tiempo que le toma a la enzima coagular la leche; sin embargo, esto suele ser ambiguo por la dependencia en la concentración de la enzima.

Existe un gran número de problemas asociados a la cuantificación de κ -caseína entera. Primero, hay tres variantes genéticas (A, B, y C) de κ -caseína. Por otra parte, la κ -caseína tiene una tendencia a auto-agregarse. La κ -caseína tiene dos grupos -SH (grupos tiol) en las posiciones Cys₁₁ y Cys₈₈ y es capaz de formar enlaces disulfuro (Hyslop, 2003).

Algunos residuos de macropéptidos son glicosilados pero a diferentes niveles, lo cual origina un serio problema si se intenta cuantificar la extensión de la proteólisis. Usando cromatografía de intercambio iónico de alta resolución, Dalglish (1986) obtuvo un solo pico para κ -caseína en presencia de mercaptol, sin embargo, la técnica no es útil para estudiar la proteólisis inducida por renina, porque hubo una pequeña diferencia en el tiempo de retención entre κ -caseína entera y para- κ -caseína (Hyslop, 2003).

2.3. Procesos de concentración de leche

2.3.1. Leche evaporada

La leche evaporada es el producto que se obtiene de la concentración de la leche por medio de calor y después esterilizándola en recipientes herméticos.

Los procedimientos de concentración se hacen a vacío y temperaturas relativamente bajas, lo que mejora la eficiencia energética y permite la obtención de un producto de calidad (Dumais *et al.*, 1991).

La leche para este proceso debe ser primero pasteurizada. Con ello, no solo se destruye a la mayoría de los microorganismos y enzimas, sino que también se evita la coagulación de la leche concentrada durante la esterilización (Veisseyre, 1988).

2.3.2. Leches concentrada

La leche concentrada que es usada en la elaboración de queso Cheddar, consta de un proceso distinto, en el cual es primero pasteurizada y posteriormente concentrada a baja presión y temperatura (Anderson *et al.*, 1993). Esta leche no es esterilizada a altas temperaturas, pues esto provocaría formación de enlaces disulfuro entre las caseínas α_s y κ , lo que impedirían la acción de la renina.

2.3.3. Proceso de evaporación

La evaporación es una operación unitaria que se emplea para eliminar parcialmente por ebullición agua de los alimentos líquidos. La separación se logra por diferencia en cuanto a volatilidad entre el agua (disolvente) y los solutos (Sharma *et al.*, 2003).

La ebullición se define como la vaporización de un líquido en el seno del mismo. Esto implica formación de burbujas de vapor en cualquier punto de la masa líquida que, por su menor densidad, ascienden hasta la superficie donde se deshacen liberando vapor, es notorio que para que la ebullición se produzca es necesario una gran cantidad de energía que eleve a la presión de vapor al nivel necesario para vencer la presión del sistema, más la de la columna de líquido más la tensión superficial (Hermida, 2000).

Las propiedades químicas y físicas de la solución a evaporar tienen un alto efecto sobre el tipo de evaporador a usarse. Según Geankoplis (1998) las principales variables que afectan los métodos de procesamiento son:

- **Concentración de líquido:** a medida que el líquido se concentra la viscosidad puede aumentar notablemente, causando una disminución en el coeficiente de transferencia, por lo que se debe prever una circulación adecuada.
- **Solubilidad:** a medida que la solución se calienta la concentración de solutos aumenta y debe evitarse superar el límite de cristalización.
- **Sensibilidad térmica:** los materiales biológicos y alimentos son sensibles a la temperatura y al tiempo de exposición al calor prolongado.

- **Presión y temperatura:** el punto de ebullición está relacionado con la presión del sistema; cuánto más elevada sea la presión de operación del evaporador, mayor será la temperatura de ebullición.

2.3.4. Uso de leche concentrada en elaboración de quesos

Foster *et al.* (1990) estudió el uso de leche entera concentrada en la elaboración de queso Cheddar, obteniendo que al utilizar leche concentrada se incrementaba el número de glóbulos de grasa, pero su tamaño se reducía y concluyó que este tipo de proceso permite un uso óptimo de los equipos existentes permitiendo incrementos en el rendimiento quesero.

Anderson *et al.* (1993) evaluó queso Cheddar elaborados con leche descremada condensada obteniendo altos rendimientos. Encontró diferencias sensoriales, ya que el sabor y textura se modificaron, sin embargo, el sabor permaneció siendo aceptable por los panelistas.

Acharya y Mistry (2005) compararon queso elaborado con leche concentrada a baja presión contra quesos hechos con leche ultrafiltrada, encontrando que el contenido de humedad disminuye al aumentar el nivel de concentración de la leche. La capacidad para fundir también se vio afectada por la concentración de la leche y tendió a disminuir. Concluyó también que la dureza del queso se incrementa para quesos de leche ultrafiltrada y que los de leche condensada a vacío son más duros que los elaborados con leche fluida.

3. BIBLIOGRAFÍA

- Acharya M. R. and V. V. Mistry. 2005. Effect of vacuum-condensed or ultrafiltered milk on pasteurized process cheese. *Journal of Dairy Science* Vol. 88, No.09: 3037-3043. American Dairy Science Association.
- Amiot. 1991. Composición y estructura físico química de la leche. En: Fundación de Tecnología Lechera de Québec (eds.), *Ciencia y Tecnología de la leche*. Traducido por Oria-Almudi R. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Anderson D. L., V. V. Mistry., R. L. Brandsma and K. A. Baldwin. 1993. Reduced fat cheddar cheese from condensed milk: manufacture, composition, and ripening. *Journal of Dairy Science* Vol. 76, No.10: 2832-2844. American Dairy Science Association.
- Anema S.G. 2000. The effect of milk concentration on the thermal denaturation and disulfide aggregation of β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural Food Chemistry*.
- Ángeles-Montiel R., J. S. Mora-Flores, M. A. Martínez-Damián y R. García-Mata. 2004. Efecto de las importaciones de leche en el mercado nacional del producto. Publicado como ensayo en *Agrociencia* 38: 555-564.
- Boye J. I., C.Y. Ma. and V.R. Harwalkar. 1997. Thermal denaturation and coagulation of proteins. In: *Foods Proteins and their Applications*. Damodaron S. and Paraf A. (Eds). Marcel Dekter Inc. N. Y. USA.
- Boyer P. D. 1954. Spectrophotometric study of the reaction of protein sulfhydryl groups with organic mercurial. *Journal of American Chemistry Society* 76(17): 4331-4337.
- Brule G. y J. Lenoir. 1990. La coagulación de la leche. En: Eck A. (Coordinador). *El Queso*. Ed. Omega. Barcelona, España. 490p.
- Cayot P., H. Rosier, L. Roullier, T. Haertle, and Tainturier. 2002. Electrochemical modifications of proteins: Disulfide Bonds Reduction. *Journal of Food Chemistry* 77: 309-315.
- Dalgleish D.G., Y Pouliot. and Paquin, P. (1987) Studies on the heat stability of milk. I. Behaviour of divalent cations and phosphate in milks heated in stainless steel system. *J. Dairy Research* 54: 29-37.
- Dilanján S. CH. 1984. Fundamentos de la elaboración de queso. Traducido del ruso por Kühn F. y del alemán por De Quirós y Fernández A. B. 1ª reimpresión en lengua española. Acribia. Zaragoza España.

- Dumais R., J.A Blais y F. Conrad. 1991. Queso. En: Fundación de Tecnología Lechera de Québec (eds.), Ciencia y Tecnología de la leche. Traducido por Oria-Almudi R. Acribia. Zaragoza, España. p. 249-296.
- Ellman G. L. 1958. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. Archives of Biochemistry and Biophysics 74: 443-450.
- Foster S. J., R. J. Baer; and V. V. Mistry. 1990. Cheddar cheese manufactured from condensed milk. Journal of Dairy Science Vol. 73, No.08: 1980-1987. American Dairy Science Association.
- Fox P.F., 2003. Milk Proteins. In: Advanced Dairy Chemistry-1 Proteins, part A. Fox P.F. y McSweemey P.L.H (Eds). 3th edition. Kluwer academic/plenum publishers.
- Fridovich I. and Handler P. 1957. Colorimetric assay for reaction of sulfhydryl groups with organic mercurials. J. Analitical Chemistry 29(8): 1219-1220.
- Gallardo-Nieto J. L. 2005. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México 2005. Preliminar 20.04.2005. Coordinación General de Ganadería. SAGARPA.
- Gallardo-Nieto J. L. 2006. Situación de la Producción de la Leche de Bovino en México 2006. En: Entorno Ganadero. Año 03. No. 19, Agosto-Septiembre 2006 pp25-32.
- Geankoplis C. J. 1998. Procesos de Transporte y operaciones Unitarias. 3ª. Edición. CECSA. México.
- Guingamp M., Humbert G., and Linden G. 1993. Determination of sulfhydryl groups in milk using ellman's procedure and clarifying reagent ®. J. Dairy Sci. No. 76: 2152-2155.
- Hermida B. J. R, 2000. Fundamentos de Ingeniería de Procesos Agroalimentarios. Editorial Mundi-Prensa. España.
- Hollar C.M y Parris N. 1995. Factors affecting the denaturation and aggregation of whey proteins in heated whey protein concentrate mixtures. Journal of Dairy Science 78: 2610-267.
- Hutton J. T. and S. Patton. 1952. The origin of sulfhydryl groups in milk proteins and their contributions to "cooked" flavor. Journal Series of the Pennsylvania Agricultural Experiment Station. No.1727. 699-705.
- Hyslop D.B. Enzymatic coagulation of milk. In: Advanced Dairy Chemistry-1 Proteins, part B. Fox P.F. y McSweemey P.L.H. (Eds). 3th edition. Kluwer academic/plenum publishers.

INEGI. Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares 2006.

Koka M., E. M. Mikolajcik and I. A. Gould. 1968. Spectrophotometric method for determination of heat-activated sulfhydryl groups of skimmilk. *Journal of Dairy Science* Vol. 51, No 2.

Kruif C.G y C. Holt. 2003. Casein Micelle Structure, functions and interactions. En: *Advanced Dairy Chemistry-1 Proteins, part A*. Editor: Fox P.F. y McSweemey P.L.H. 3ra edition. Kluwer academic/plenum publishers.

Martin, P., P. Ferranti, C. Leroux and Addeo F. 2003. Non-bovine caseins: quantitative variability and molecular diversity. In: *Advanced Dairy Chemistry-1 Proteins, part A*. Fox P.F. y McSweemey P.L.H (Eds). 3th edition. Kluwer academic/plenum publishers.

Nakai S., Wilson H.K., and Herreid E. O. 1964. Effect of Changes in Sulfur Compounds on Stability and Gelation of Caseins and of Sterile Concentrated Milk. *Journal of Dairy Science* 47:431.

Nelson D.L. and M.M. Cox. 2001, *Lehninger Principios de Bioquímica*. 3ª Ed. Ed. Omega.

Newstead D. F., W.B. Sanderson, and E.F. Conaghan. 1977. Effects of whey protein concentrations and heat treatment on the heat stability of concentrated and unconcentrated milk. *N.Z. Journal of Dairy Science and Technology*. 12:29.

Patrick P. and H. Swaisgood. 1976. Sulfhydryl and disulfide groups in skim milk as affected by direct ultra-high temperature heating and subsequent storage. *Journal of Dairy Science* Vol.59, No. 4.

Riel, R. 1991. Composición y estructura físico química de la leche. En: *Fundación de Tecnología Lechera de Québec (eds.), Ciencia y Tecnología de la leche*. Traducido por Oria-Almudi R. Acribia. Zaragoza, España.

Rollema H. S. 1992. Casein association and micelle formation. In: *Advanced Dairy Chemistry 1: Proteins*. Fox P.F. (ed.) Elsevier Science Publishes LTD. U.S.A.

Santos-Moreno, A. 1995. *Química y bioquímica de alimentos*. Universidad Autónoma Chapingo. México.

Sasago K., H. K. Wilson y Herreid. 1963. Determination of sulfhydryl and disulfide groups in milk by the p-choloromercibenzoate-dithiozone method. *Journal of Dairy Science* Vol. 46 No. 12 1348-1351.

- Sava N., V.P. Plancken, W. Claeys and M. Hendrickx. 2005. The kinetics of heat-induced structural changes of β -Lactoglobulin. *Journal of Dairy Science* 88:1646-1653.
- Sawyer L. β -lactoglobulin. In: *Advanced Dairy Chemistry-1 Proteins*, part B. Editor: Fox P.F. y McSweemey P.L.H. 3th edition. Kluwer academic/plenum publishers.
- Sharma S. K., S. J. Mulvaney y S. S. H. Rizvi. 2003. *Ingeniería de Alimentos*. Ed. LIMUSA-WILEY. México.
- SIAP. Boletín de Leche / Abril - Junio de 2007. ISSN 1405-681X.
- Singh H. 1991. Modification of food proteins by covalent crosslinking. *Trends in Food Science and Technology*, 2, 196-200.
- Singh H. and Waungana A. 2001. Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. *International Dairy Journal* 11 (2001) 543-551.
- Swaisgood H. 1980. Sulphydryl oxidase: properties and applications. *Enzyme Microbiological Technology*. Vol. 2 October. 265-272.
- Taylor, M. J. and Richardson. 1980. Antioxidant activity of skim milk: effect of heat and resultant sulfhydryl groups. *Journal of Dairy Science* 63: 1783-1795.
- Veisseyre R. 1988. *Lactología Técnica*. Acribia. Zaragoza, España. 628p.
- Villegas-De Gante. A. 2004. *Tecnología Quesera*. Primera edición. Trillas. México. 398p.
- Walstra P. y R. JENNESS. 1987. *Química y física lactológica*. Traducido por Sanz-Pérez B. Acribia. Zaragoza, España.
- Walstra P., Wouters, J. T. M. y Geurts, T.J. 2006. *Dairy Science and Technology*. Second Edition. CRC Press.
- Watt B. K. and A.L. Merrill. 1963. *Composition of Foods*. USDA Agriculture. (Handbook 8). Washington D.C., U.S.A.
- Waungana A., Singh H., and Bennett. 1996. Influence of denaturation and aggregation of β -lactoglobulin on rennet coagulation properties of skim milk and ultrafiltered milk. *Food Research International* 29. No. 8: 715-721. Canadian Institute of Food Science and Technology.

Whitaker J. R. (1977). Denaturation and renaturation of proteins. In: Foods Proteins. Whitaker J.R. and Tannenbaum (Eds). AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut. USA.

Whitford D. 2005. Proteins: Structure and Function. Wiley. Spain.

CAPÍTULO II: ARTÍCULO

MEDICIÓN DE GRUPOS SULFHIDRILO (SH) Y DISULFURO (S-S) EN LECHES CONCENTRADAS A BAJA TEMPERATURA Y PRESIÓN DE VACÍO

MEDICIÓN DE GRUPOS SULFHIDRILLO (SH) Y DISULFURO (S-S) EN LECHE CONCENTRADAS A BAJA TEMPERATURA Y PRESIÓN DE VACÍO

MEASUREMENT OF SULFHYDRYL (SH) AND DISULFIDE (S-S) GROUPS IN VACUUM- CONCENTRATED MILK AT LOW TEMPERATURE

Flores-Girón E.¹, S. Valle-Guadarrama².

RESUMEN

El objetivo principal fue medir el contenido de grupos sulfhidrilo (SH) y disulfuro (S-S) en leches después de su concentración a baja temperatura y presión de vacío. Estos grupos funcionales se ven implicados en un amplio rango de interacciones protéicas pero, pese a su importancia, es limitado el número de estudios que analizan su comportamiento en procesos a bajas temperaturas y tiempos prolongados. Las variables de estudio fueron: temperatura de proceso (40-60 °C), volumen de muestra a concentrar (150-500 mL) y tiempo de proceso (40-80 min). Se determinó el contenido de SH totales con el uso del reactivo Ellman® y el contenido de S-S mediante reacción con p-cloromercuribenzoato-ditiozono. La temperatura de proceso no mostró una tendencia clara sobre el contenido de SH. A medida que el tiempo se incrementó el contenido de SH decayó; un volumen de muestra mayor causó menor afectación por el proceso de concentración. Las muestras de 150 mL con un tiempo de proceso de 80 min presentaron la máxima disminución de SH, con una caída del 74 % con respecto a la leche cruda. La metodología para determinación de S-S implementada no resultó útil para éste estudio, debido a que presentó un alto error experimental y la variabilidad natural de la técnica no permitió la observación de diferencias estadísticas entre tratamientos.

Palabras clave: Leche concentrada, Sulfhidrilos, Disulfuros.

¹Autor, ²Director de tesis.

ABSTRACT

The main objective was to measure the content of sulfhydryl and disulfide groups in milk after its concentration at low temperature and vacuum pressure, since these functional groups are involved in a wide range of protein interactions; despite their importance, the number of studies that analyze the behavior of these compounds in processes at low temperatures and long time is limited. The design variables were: process temperature (40-60 °C), sample volume to concentrate (150-500 mL) and processing time (40-80 min). The total SH content was determined with Ellman's reagent® and the content of S-S by reaction with p-chloromercuribenzoate-dithione. The process temperature did not show a clear trend over the SH content; as time increased, SH content declined, and a larger sample volume was less affected by the concentration process. Samples of 150 mL with a processing time of 80 min showed the maximum decrease of SH with a fall of 74 % compared to raw milk. The methodology for determination of SS implemented was not useful for this study because it showed a high experimental error value.

Key words: Concentrated milk, Sulfhydryl groups, Disulfide groups.

¹Author, ²Thesis director.

1. INTRODUCCIÓN

Dada su composición nutritiva, la leche es altamente susceptible al desarrollo de microorganismos, por lo que es perecedera, lo que origina que siempre se busque conservarla mediante tratamientos térmicos (pasteurización, esterilización, concentración), o su transformación en diversos productos derivados, como el queso principalmente.

La mayor parte de la leche producida en México se canaliza al consumo como leche fluida. Una porción todavía considerable (quizá 25 %) del total circula como leche cruda, para hervir y elaborar quesos artesanales; el resto se dedica a la elaboración de leche pasteurizada, UHT y otros derivados, por ejemplo, queso y yogur (Villegas, 2004).

A nivel general, en México existen tres tipos de explotaciones ganaderas que son: las especializadas o intensivas, las de doble propósito y las de traspatio o ganadería familiar. De éstas las dos últimas producen cerca del 60 % de la leche del país y mantienen un comportamiento heterogéneo en el volumen de producción, ya que en la época de lluvias (junio, julio, agosto) presentan una alta producción y durante el resto del año esta producción tiende a bajar por la disposición de forrajes, principalmente.

Actualmente se buscan otras formas de manejo de la leche fluida que permitan su uso óptimo. Dentro de ellas destacan el secado (leche en polvo) y concentración, que implican tratamientos térmicos, por lo que conocer las

características y cambios sufridos en la leche durante su concentración retoma importancia.

Dos de los mayores defectos asociados con los tratamientos térmicos severos (altas temperaturas y/o tiempos prolongados) como los UHT en la leche son: 1) sabor a cocido seguido por desarrollo de otros defectos en el sabor y 2) desestabilización de las proteínas, resultando en la formación de depósitos proteicos en los equipos de calentamiento y/o gelificación o formación de precipitados finos en los envases (Patrick y Swaisgood, 1976).

La exposición de grupos sulfhidrilos en las proteínas de suero ocurre a la par del desarrollo de sabor a cocido y, de hecho, la aparición de estos sabores parece ser dependiente de la presencia de estos grupos. La inestabilidad de las proteínas de suero durante el tratamiento térmico parece estar directamente relacionado con el cambio en la relación de grupos sulfhidrilos/disulfuro de estas proteínas (Patrick y Swaisgood, 1976).

En la actualidad, el desarrollo de mejores tecnologías de proceso de producción, económicamente más rentables (v.g., ultrafiltración, ósmosis inversa y electrodiálisis) ha hecho posible un incremento dramático en la producción de derivados de leche como los concentrados de proteína de suero (WPC). Sin embargo, estos productos, como el WPC, obtenidos de diferentes procesos no muestran la misma funcionalidad y estabilidad en formulaciones estandarizadas (Hollar y Parris, 1995).

Se han realizado numerosos estudios del contenido de los grupos sulfhidrilo y disulfuro en leches que han sido tratadas térmicamente bajo diversas condiciones usando una amplia variedad de métodos analíticos; sin embargo, es limitado el número de estudios que han analizado el comportamiento de estos grupos en el proceso de concentración en vacío a bajas temperaturas y diferentes tiempos de proceso, por lo que este estudio pretendió analizar el comportamiento del contenido de grupos sulfhidrilos y disulfuros durante este tipo de procesos, dada la importancia que el contenido de ellos representa en las características del producto obtenido y la funcionalidad que a éstos confieren.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación en Lácteos, Laboratorio de Bioquímica y en el Laboratorio de Investigación del Departamento de Ingeniería Agroindustrial.

2.1 Selección de las condiciones del proceso de evaporación

Las temperaturas a las que se realizaron las concentraciones fueron: 40, 50 y 60°C y las presiones de vacío necesarias para llegar a su punto de evaporación se calcularon mediante la ecuación de Antoine para agua entre 0° y 60°C, como sigue:

$$\text{Log (Pv)} = 8.10765 - (1750.286/T + 235)$$

donde: T se sustituyó en °C y Pv en mmHg. Sin embargo, durante la realización de las pruebas preliminares se notó que a esas presiones de trabajo era muy pobre la evaporación; que sólo se tenía una ebullición durante los primeros minutos de operación cuando el equipo llegaba a la presión programada y después ya no continuaba. Por ello, se decidió reducir aún más la presión y para que la disminución fuera homogénea se re-cálculo para temperaturas 6 °C abajo de la deseada (Cuadro 1).

Cuadro 1. Condiciones de operación del rota-vapor durante el experimento.

Temperatura de trabajo (°C)	Temperatura para cálculo (°C)	Presión	
		mmHg	mbar
40	34	39.90	52.50
50	44	68.27	89.82
60	54	112.53	148.07

2.2 Diseño experimental

Las variables de estudio fueron: temperatura de concentración (40-60°C), volumen de muestra a concentrar (150- 500 mL) y tiempo de concentración (40-80 min). Para evaluar el efecto sobre el proceso de concentración, los resultados de evaporación se sometieron a regresión lineal múltiple como función de estos factores.

Cuadro 2. Diseño factorial completo. Listado de tratamientos.

Unidad Experimental	Código del programa*	Temperatura (°C)	Volumen (mL)	Tiempo (min)
1	"Cube001a"	40.0	150.0	40.0
2	"Cube001b"	40.0	150.0	40.0
3	"Cube002a"	60.0	150.0	40.0
4	"Cube002b"	60.0	150.0	40.0
5	"Cube003a"	40.0	500.0	40.0
6	"Cube003b"	40.0	500.0	40.0
7	"Cube004a"	60.0	500.0	40.0
8	"Cube004b"	60.0	500.0	40.0
9	"Cube005a"	40.0	150.0	80.0
10	"Cube005b"	40.0	150.0	80.0
11	"Cube006a"	60.0	150.0	80.0
12	"Cube006b"	60.0	150.0	80.0
13	"Cube007a"	40.0	500.0	80.0
14	"Cube007b"	40.0	500.0	80.0
15	"Cube008a"	60.0	500.0	80.0
16	"Cube008b"	60.0	500.0	80.0
17	"Cent-a"	50.0	325.0	60.0
18	"Cent-b"	50.0	325.0	60.0
19	"Cent-c"	50.0	325.0	60.0

*código asignado por el programa THE UNSCRAMBLER®.

Se estableció un diseño completamente al azar con arreglo factorial completo mediante el uso del programa THE UNSCRAMBLER® para tres factores con dos niveles, dos réplicas y tres muestras centrales. Estas últimas se utilizaron

para la comprobación de la linealidad de las variables de estudio y se conformaron de los valores medios de los intervalos de los factores, quedando como se indica en el Cuadro 2.

El modelo estadístico de un experimento factorial 2^3 es:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + e_{ijk}$$

$$i = 1, 2, \dots, a \quad j = 1, 2, \dots, b \quad k = 1, 2, \dots, c \quad l = 1, 2, \dots, n$$

Donde μ es la media general de la población; α_i es el efecto del nivel i del factor 1; β_j es el efecto del nivel j del factor 2; γ_k es el efecto del nivel k del factor 3; $(\alpha\beta)_{ij}$ es el efecto de la interacción entre el nivel i del factor 1 y nivel j del factor 2; $(\alpha\gamma)_{ik}$ representa el efecto de la interacción entre el nivel i del factor 1 y nivel k del factor 3; $(\beta\gamma)_{jk}$ es el efecto de la interacción entre el nivel j del factor 2 y nivel k del factor 3 y, finalmente, e_{ijk} es el componente del error.

Para todas las variables analizadas se manejó un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, donde la regla de decisión fue: si $p > 0.05$, entonces, se acepta la hipótesis nula (H_0 = no efecto de tratamiento).

2.3 Acondicionamiento de leche

Se partió de leche cruda obtenida en la granja experimental de la Universidad Autónoma Chapingo; se descremó y se sometió a pasteurización lenta (63 °C por 30 min). Se determinó el contenido de grasa por el método 920.125-Gerber

estándar (A.O.A.C., 1998) y sólidos totales por el método 925.23 (A.O.A.C., 1998).

2.4 Variables respuesta

La variable principal evaluada fue el contenido de grupos sulfhidrilo y disulfuro como medida de la desnaturalización de las proteínas por efecto del tratamiento térmico durante la concentración al vacío.

Se determinó también el contenido de sólidos totales de cada muestra antes y después de ser concentrada por el método 925.23 (A.O.A.C., 1998), para realizar los cálculos de concentración de -SH y S-S en las muestras.

2.4.1. Determinación de grupos sulfhidrilo y disulfuro en leche

Se siguieron dos metodologías; la primera fue propuesta por Patrick y Swaisgood (1976) y utiliza el agente ELLMAN® (5,5'-ditiobis ó 2-ácido nitrobenzoico, DTNB). Este método permitió conocer el contenido total de grupos sulfhidrilo. La segunda metodología permitió la medición de grupos disulfuro, y fue desarrollada por Sasago *et al.* (1963), el método está basado en la utilización p-Cloromercuribezoato-Ditiozono (PCMB-D).

2.4.2. El método de ELLMAN

Este método ocupa como reactivos, agente ELLMAN®, buffer fosfato pH 8.0, NaOH 1M y urea. El método se basa en la utilización del DTNB, el cual reacciona específicamente con los grupos sulfhidrilo. Una muestra de 1 mL de

leche descremada se trata con 1.4 g de urea para exponer los grupos sulfhidrilos totales; se adicionan 3 mL de buffer fosfato pH 8, y luego 1 mL de DTNB 2mM y se permite el desarrollo de color por 40 minutos a temperatura ambiente; el volumen se ajusta a 7.0 mL, y posteriormente se filtra a través de papel Whatman 40. La absorbancia del thionitrobenzoato específicamente liberado en la reacción con los grupos sulfhidrilos se lee a 412 nm y la concentración en la solución es calculada en base a una absorbitividad molar de 13600.

En todos los casos, el blanco espectrofotométrico consistió de una muestra tratada de la misma manera, excepto por la omisión de DTNB. La técnica utilizada en este experimento determinó el contenido total de grupos -SH. La medición se realizó 24 h después del tratamiento para permitir la oxidación de los -SH activos hacia S-S producto del calentamiento.

La actividad antioxidante y el contenido de sulfhidrilos totales en leche que ha sufrido un tratamiento disminuye (Taylor y Richardson, 1980). La caída de los sulfhidrilos totales en la leche se da cuando los tratamientos térmicos la llevan a la desnaturalización de las proteínas de suero, incrementando significativamente el número de tioles reactivos, los cuales se ven envueltos en reacciones de oxidación como son las interacciones de intercambio intermoleculares con formación de puentes disulfuro S-S (Sava *et al.*, 2005).

2.4.3. Método p-cloromercuri bezoato-ditiozono

Los reactivos que se utilizan son: urea 8 M, buffer fosfato pH 7, EDTA 0.1M pH 7, NaSO₃ 1.0 M, PCMB, solución 0.5mM y ditiozono, 3 ml de solución (200 mg/100 mL CCl₄ cubierta con agua) que se diluye en 200 mL con CCl₄.

La metodología que se siguió fue la siguiente: se prepara la muestra problema mediante la adición de 0.1 mL de Na₂SO₃ 1 M a 0.05 mL de leche los cuales se aforan a 1.45mL con agua; para la determinación de S-S de cada muestra se requirieren cuatro soluciones (Cuadro 3).

Cuadro 3. Soluciones requeridas para determinación de grupos disulfuro.

No.	Leche (problema)	PCMB	Urea	Agua
--(mL)--				
1	---	---	1.0	0.45 (blanco para no. 4)
2	0.25	---	1.0	0.20 (blanco para no. 3)
3	0.25	0.20	1.0	---
4	---	0.20	1.0	0.25

Se agregaron 10 mL de ditiozono diluido a cada una de las cuatro soluciones y se agitaron vigorosamente por un minuto; posteriormente, se dejaron en reposo por 30 min a temperatura de refrigeración (5-10°C); se filtró la mezcla en papel Whatman No. 40 y se leyó la absorbancia (DO) a 620 nm de cada solución.

Para calcular la absorbancia de las muestras problema se obtuvo la diferencia entre las absorbancia de las cuatro soluciones (Cuadro 3):

$$DO = (DO1-DO4)-(DO2-DO3)$$

Para conocer el contenido de S-S se corrió una curva patrón con la adición de diferentes volúmenes de solución de PCMB, de 0.02 mM a 0.5 mM, a la solución de ditiozono. Para evitar la interferencia de iones metálicos se usó EDTA, el cual no afecta la reacción PCMB-D.

En las dos metodologías, la muestra para el análisis tuvo que ser reajustada al contenido original de sólidos antes de su concentración.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Efecto de condiciones de proceso sobre el grado de evaporación

Los resultados de evaporación se sometieron a un análisis de regresión lineal múltiple como función de las condiciones de volumen inicial, tiempo de concentración y presión total en la cámara de evaporación. La siguiente ecuación muestra la relación obtenida, donde Δe es la cantidad de agua evaporada (mL), Δt es el tiempo de evaporación (min), V_i es el volumen inicial de leche (mL) y P es la presión aplicada en la cámara de evaporación (mbar):

$$\Delta e = 5.239 + 0.02 V_i + 0.775 \Delta t + 0.033 P$$

El análisis estadístico mostró que sólo el coeficiente del tiempo de evaporación (0.775) fue significativo, lo que indicó que en la cantidad de agua evaporada de la leche sólo el tiempo es determinante y no así la cantidad de leche inicial, ni la presión imperante en la cámara de evaporación, y como este último parámetro determina la temperatura de proceso, se deduce que la temperatura tampoco tuvo impacto sobre la cantidad de agua eliminada de la leche. Esta situación resulta también evidente a partir de la magnitud de los coeficientes de cada uno de los factores, donde los correspondientes a V_i y a P resultaron muy pequeños.

Desde el punto de vista de la transferencia de calor, a medida que crece el gradiente de temperatura entre el agua de calefacción en el equipo y la leche en la cámara de evaporación se espera una mayor transferencia energética, lo que

debe traducirse en una mayor cantidad de agua eliminada. Dado que no se observó una evaporación diferencial por efecto de la variación de la presión (que determina la temperatura de ebullición), se deduce que el rango de presiones usadas no fue lo suficientemente amplio para causar un efecto diferencial entre las diferentes condiciones aplicadas.

Por otro lado, como no hubo efecto del volumen inicial, se deduce que el efecto de agitación impartido en el rota-vapor sobre la leche era semejante, independientemente de la cantidad de líquido presente en la cámara de evaporación, lo que explica que sólo el tiempo de proceso sea determinante en la evaporación.

3.2. Medición de grupos sulfhidrilos totales

Dentro de las pruebas preliminares se realizaron ensayos de la técnica de determinación de grupos sulfhidrilos totales siguiendo la metodología propuesta por Patrick y Swaisgood (1976) para comprobar que el uso de la técnica era correcto y que tenía un nivel de reproducibilidad aceptable. En el Cuadro 4 se muestran los valores obtenidos en tales pruebas y los valores reportados en otros trabajos de investigación. Se observa que los valores obtenidos durante la implementación de la técnica para $-SH$ fueron similares a los reportados en la literatura, por lo que se comprobó que la técnica era bastante reproducible con una baja desviación estándar, lo que resultó útil para el propósito de esta investigación, por lo que se procedió a su aplicación en el diseño experimental.

Cuadro 4. Comparación de valores experimentales y teóricos para grupos SH.

Muestra	Valor experimental*		Valor teórico	
	($\mu\text{M/g}$ Proteína)*	$\mu\text{M/g}^{**}$	($\mu\text{M/g}$ Proteína)*	$\mu\text{M/g}^{**}$
Leche cruda	3.3026($\pm$ 0.26)	1.24($\pm$ 0.11)	2.7 a 3.3 ²	1.52 ($\pm$ 0.40) ¹
L. Pasteurizada	--	1.078 ($\pm$ 0.19)	--	1.02 ($\pm$ 0.19) ¹

*Se analizaron tres muestras con dos repeticiones. **Se toma como referencia 32g de proteína por litro. ***g de sólidos no grasos totales. ¹Guingamp M., Humbert G., Linden G (1993). ²Patrick P., Swaisgood H. (1976). El valor del símbolo $\pm$ corresponde a la desviación estándar.

Se realizó un análisis de varianza para los resultados del diseño antes descrito, donde el modelo mostró una probabilidad (p) igual a 0.0004 por lo que, para un nivel de significancia $\alpha=0.05$, al menos uno de los factores presentó un efecto significativo sobre tratamientos. A continuación se describen a detalle los resultados obtenidos.

3.3. Efecto de la temperatura del proceso de concentración

Con base en los resultados del análisis de varianza para el factor temperatura del proceso de concentración de la leche, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, pues se obtuvo un valor $p=0.93$, que es superior al nivel de significancia $\alpha=0.05$. Se cree que razón de esto fue que todos los tratamientos térmicos aplicados fueron con temperaturas menores a las de desnaturalización de las proteínas del suero, de las cuales la α -LA tuvo el valor más bajo, 62 °C, seguida por β -SA a 64 °C, Ig a 72 °C, y β -LG a 78 °C (Hollar y Parris, 1995).

3.4. Efecto de tiempo de proceso

Con un valor $p=0.0007$, para el factor tiempo de proceso, se tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Se encontró un efecto negativo, esto es, a medida que el tiempo de proceso se incrementó el contenido de grupos sulfhidrilos decayó y se atribuyó al hecho de que la sensibilidad térmica de los materiales biológicos y alimentos depende no sólo de la temperatura sino también del tiempo de exposición al calor.

3.5. Efecto del volumen de muestra

El factor volumen de muestra presentó un efecto estadísticamente significativo sobre el contenido de grupos sulfhidrilo, con un valor $p= 0.0032$, siendo un efecto positivo, lo cual implica que cuando el volumen de muestra fue mayor el contenido de grupos sulfhidrilos presentes también fue mayor que cuando el volumen de muestra era menor.

Se mostró antes que el volumen de muestra no afectó la cantidad de agua eliminada, es decir, que los distintos volúmenes usados tuvieron aproximadamente la misma cantidad de masa eliminada por evaporación. Esto significa que cuanto mayor era el volumen de muestra usado, la concentración de sólidos alcanzada era menor, lo cual sugiere que el contenido de grupos sulfhidrilos se afecta por el contenido de sólidos totales en la leche. Hollar y Parris (1995) encontraron en varios sistemas de suero, que el Ca, los sólidos totales y el pH afectan la desnaturalización de la proteína del suero, puesto que ayudan a la protección de la proteína globular de la desnaturalización térmica.

3.6. Efecto de las interacciones entre los factores de estudio

3.6.1. Interacción temperatura-volumen

Como producto de la interacción entre factores: temperatura de concentración y volumen de muestra, se obtuvo un valor $p = 0.0422$ por lo que, para un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, se encontró que sí existió efecto estadísticamente significativo sobre tratamientos, mismo que se representa en la Figura 1.

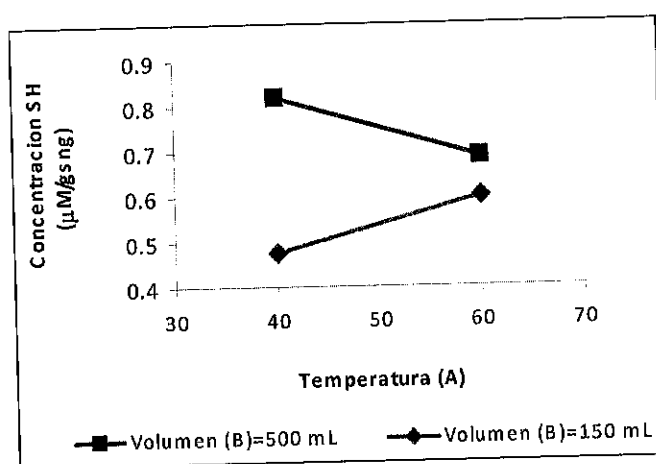


Figura 1. Interacción Temperatura de concentración y Volumen de muestra sobre el contenido de grupos sulfhidrilos totales.

Como se observa en la Figura 1, cuando el volumen de muestra a concentrar fue de 500 mL, el contenido de grupos sulfhidrilos, posterior al proceso de concentración, fue menor para el tratamiento a 60°C que cuando la temperatura de proceso fue 40°C y, por el contrario, cuando se trabajó con un volumen de 150 mL el contenido de sulfhidrilos fue menor para la temperatura de tratamiento más baja (40°C).

Se encontró también que para el tratamiento con volumen de muestra de 150 mL y temperatura de 60°C el contenido de -SH totales fue menor que para los tratamientos que incluían un volumen de 500 mL.

No obstante que la temperatura como factor independiente no mostró efecto estadísticamente significativo sobre el contenido de grupos sulfhidrilos de los tratamientos, se observó que sí tuvo una influencia sobre los mismos cuando se cambio el volumen de muestra. Sawyer (2003) mencionó que existen trabajos con β -lactoglobulina bovina *in Vitro* que sugieren que la disociación de los dímeros ocurre entre 30 y 50 °C incrementando la reactividad de grupos tiol.

Por su parte Walstra *et al.* (2006) mencionaron que una baja temperatura puede causar desnaturalización de algunas proteínas (los puentes hidrofóbicos se vuelven ligeramente más débiles o incluso repulsivos) y que el enfriamiento es siempre requerido, al menos a 20 °C, temperatura a la cual la estabilidad en la conformación es máxima. Esto lleva a deducir que aunque las temperaturas de estudio son bajas (40-60°C) sí presentan una influencia sobre el contenido de sulfhidrilos.

Sin embargo, no queda del todo claro el porqué a un volumen de muestra menor el contenido de SH se ve más afectado por una temperatura menor (40 °C) posiblemente y pese a la conocida influencia de la temperatura sobre el contenido de SH, como reportan Jang y Swaisgood (1990) para las interacciones entre β -lactoglobulina desnaturalizada por calor y k-caseína,

mediante un intercambio por la formación de interacciones moleculares (puentes disulfuro) que cambiaría la concentración de -SH y el balance -SH/S-S, éstas no pueden ser detectadas a temperaturas de tratamientos entre 55-65 °C, debido a que la temperatura de desnaturalización de la β -lactoglobulina no ha sido superada.

Al parecer, como lo menciona Hollar y Parris (1995) para varios sistemas de suero, el contenido los sólidos totales durante el tratamiento térmico afectan el grado de desnaturalización de la proteína del suero, esto implicaría que el contenido de sólidos alcanzado en cada uno de los tratamientos afecto el contenido de SH, pero el análisis no se condujo para retomar al contenido de sólidos como variable respuesta,

Se encontró también que, como se había observado en el efecto por factor, un menor volumen de muestra conlleva a una mayor pérdida de sulfhidrilos totales. Esto podría deberse a que como resultado de la agitación constante durante el proceso de concentración un volumen menor se ve más expuesto a la superficie de transferencia de calor.

3.6.2. Interacción temperatura-tiempo

Producto de la interacción entre factores: temperatura de concentración y tiempo de proceso, se obtuvo un valor $p= 0.0003$, por lo que se encuentra que existe efecto estadísticamente significativo sobre tratamientos, mismo que se representa en la Figura 2.

La interacción muestra que a un mayor tiempo de proceso (80 minutos) el contenido de grupos sulfhidrilo decayó más a una temperatura menor (40°C) que a un tratamiento con una temperatura mayor (60°C). Por el contrario, a un tiempo menor de proceso (40 minutos) la disminución de grupos SH fue mayor para una alta temperatura.

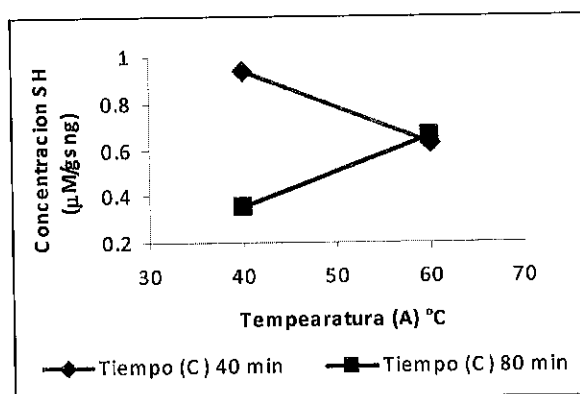


Figura 2. Interacción temperatura de concentración y tiempo de proceso sobre el contenido de grupos Sulfhidrilos totales.

Singh y Waungana (2001) reportaron que la desnaturalización de β -Lg puede darse incluso a bajas temperaturas si el tiempo es prolongado o calentando la leche a una velocidad más baja de lo requerido para alcanzar una temperatura de tratamiento.

En general, se sabe que existe una relación entre la intensidad del calor aplicado en el contenido de -SH con una cinética de primer orden, donde la tendencia normal es el incremento de los grupos sulfhidrilo activos y, cuando el tiempo de exposición al calor se prolonga, el contenido de -SH llega un punto

máximo, seguido de un decremento que se intensifica con la extensión del periodo de exposición (Koka *et al.*, 1968).

Por tanto es claro que, un tiempo de proceso mayor (80 min) causó valores más bajos en el contenido de -SH totales dado que, como mencionan Walstra *et al* (2006), un calentamiento severo llevó a la formación de puentes disulfuro S-S, debiéndose notar que estos cambios pueden ocurrir incluso a pH bajo (4.5) y baja temperatura (20 °C), aunque con un proceso ligeramente más lento.

3.6.3. Interacción volumen-tiempo

Para la interacción volumen de muestra-tiempo de proceso, se encontró un valor $p=0.0175$, indicando que ésta existe y es significativa, como se muestra en la Figura 3. Para un tiempo de proceso de 40 minutos el contenido de grupos SH parece no variar con el volumen de muestra.

La caída de SH sólo fue menor en $0.028 \mu\text{M/g}_{\text{sng}}$ para el volumen de muestra menor (150 mL) en comparación con la muestra de 500 mL. Por otro lado, cuando el tiempo de proceso se incrementó a 80 minutos el volumen de muestra retoma importancia, dado que a un menor volumen el contenido de sulfhidrilos decayó a un nivel más bajo, indicando una mayor pérdida en la estructura de la proteína láctea. En promedio, los tratamientos con la combinación de un volumen de 150 mL y 80 minutos tuvieron una concentración de $0.322 \mu\text{M/g}_{\text{sng}}$ de SH que representa cerca del 26 % del contenido promedio de SH totales presentes en una leche cruda.

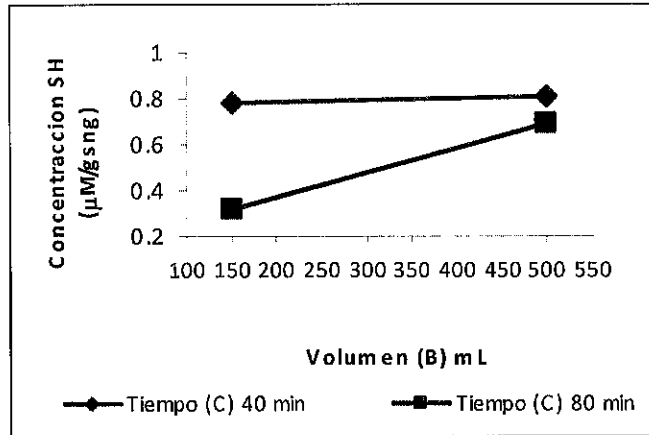


Figura 3. Interacción Volumen de muestra y tiempo de proceso sobre el contenido de grupos sulfhidrilos totales.

Como se había mencionado con anterioridad, el decremento de los SH totales se intensifica con la extensión del periodo de exposición al calor (Koka *et al.*, 1968) y, como se observó en este experimento, un volumen de muestra menor también causa una mayor pérdida de SH totales. Se infiere que la combinación de un menor volumen de muestra con un tiempo mayor de proceso provoca que el nivel de SH se vea severamente afectado, indicando un mayor grado de pérdida de las estructuras nativas de las proteínas lácteas.

3.7. Medición de grupos disulfuro

Dentro de las pruebas previas se determinó la curva patrón para la técnica de determinación de grupos disulfuro por el método p-cloromercuri bezoato-ditiozono (Sasago *et al.*, 1963). En el Cuadro 5 se muestran los valores de absorbancia obtenidos para cada concentración de p-cloromercuri- bezoato (PCMB), así como la diferencia con respecto de la absorbancia de la solución de ditiozono.

Cuadro 5. Curva patrón para determinación de grupos disulfuro

Concentración PCMB (mM)	Absorbancia*	Diferencia**
0.50	0.3345	0.4905
0.40	0.4305	0.3945
0.20	0.6220	0.2030
0.10	0.6855	0.1395
0.08	0.6990	0.1260
0.06	0.6915	0.1335
0.04	0.7030	0.1220
0.02	0.7425	0.0825
0.00	0.8250	0.0000

*Valor promedio, tres replicas. **Diferencia entre la absorbancia de cada concentración y la solución de con solo ditiozono (0mM de PCMB).

La absorbancia para la solución de ditiozono tuvo un valor promedio de 0.825 (Cuadro 5), el cual fue cercano al reportado por Fridovich y Handler (1957) quienes mencionaron que para este tipo de ensayos la absorbancia para la solución recién preparada debe ser aproximadamente de 0.840 a una longitud de onda de 625 nm.

Como se observa en la Figura 4, a medida que se aumenta la concentración de PCMB disminuye la absorbancia, sin embargo, para la obtención de la curva patrón el método requiere que se calcule la diferencia con respecto de la solución de ditiozono puro. En la Figura 5 se muestra la curva patrón y el modelo lineal que se utiliza para los cálculos de las concentraciones de las soluciones problema.

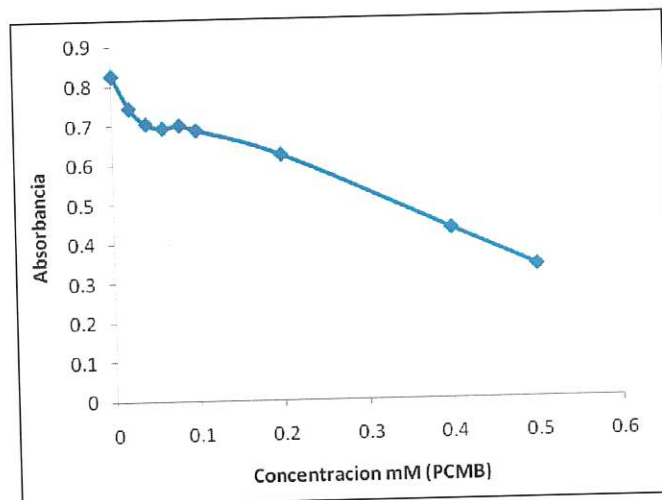


Figura 4. Curva de absorbancia correspondiente a cada concentración de PCMB.

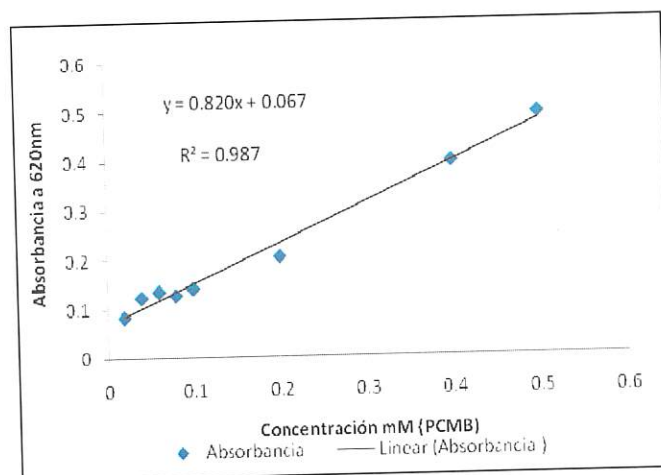


Figura 5. Curva patrón de la reacción PCMB-Ditiozono, para la determinación de grupos disulfuro (la absorbancia es la diferencia con respecto del control).

Se realizaron ensayos de la técnica de determinación de grupos disulfuro siguiendo la metodología para comprobar datos teóricos que se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Comparación de valores experimentales y teóricos para grupos S-S.

Muestra	Valor experimental	Valor teórico
	mM por litro	
Leche cruda	0.95 (± 0.09)	0.97 (± 0.06) ¹
L. Pasteurizada	0.90 (± 0.08)	0.91 (± 0.06) ¹

¹ Sasago *et al.* (1963). El símbolo $\pm$ representa el valor de la desviación estándar.

Aunque se observa en el Cuadro 6 que los valores obtenidos son similares a los reportados, durante la aplicación de la técnica a las unidades experimentales. El error experimental fue alto y, como también se observa en los datos reportados, la variabilidad natural de la técnica no permitió la observación de diferencias estadísticas entre tratamiento, por lo que se asume que esta metodología no es aplicable o útil para detectar cambios en el contenido de grupos disulfuro de leches tratadas a baja temperatura (40-60°C).

4. CONCLUSIONES

Los procesos de concentración de leche a bajas temperaturas y presiones de vacío modifican el contenido de sulfhidrilos totales de la leche

El factor temperatura de proceso no mostró una clara tendencia en su influencia sobre el contenido de SH.

En volúmenes mayores de leche el contenido de SH totales se ve menos afectado por el tratamiento térmico.

El factor tiempo fue altamente importante en el diseño de procesos de concentración de leche, pese a que en el tratamiento a baja temperatura el contenido de SH decayó a medida que el tiempo de proceso se extendió.

Las interacciones entre factores fueron notorias y modificaron la forma en que la muestra se vio afectada por los tratamientos. Un tiempo de proceso prolongado (80 min) aunado a un volumen de muestra pequeño (150 mL) provocó la máxima disminución en el contenido de SH en los tratamientos estudiados.

La metodología para determinación de grupos disulfuro basada en uso de PCMB no resultó útil para este tipo de estudios porque no se logro un control del error experimental.

5. BIBLIOGRAFÍA

- A.O.A.C.1998. Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of Analysis. Washington D.C. U.S.A.
- Fridovich I. and Handler P. 1957. Colorimetric assay for reaction of sulfhydryl groups with organic mercurials. J. Analitical Chemistry 29(8): 1219-1220.
- Guingamp M., Humbert G., and Linden G. 1993. Determination of sulfhydryl groups in milk using ellman's procedure and clarifying reagent ®. J. Dairy Sci. No. 76: 2152-2155.
- Hollar C.M y Parris N. 1995. Factors Affecting the Denaturation and Aggregation of Whey Proteins in Heated Whey Protein Concentrate Mixtures. J. Dairy Science Vol 78. 2610-267.
- Jang H.D. and Swaisgood H. E. 1990. Disulfide bond formation between thermally denatured β -lactoglobulin and κ -casein in casein micelles. Journal of Dairy Science 73: 900-904.
- Koka M., E. M. Mikolajcik and I. A. Gould. 1968. Spectrophotometric method for determination of heat-activated sulfhydryl groups of skim milk. Journal of Dairy Science Vol. 51, No 2.
- Patrick P. and H. Swaisgood. 1976. Sulfhydryl and disulfide groups in skim milk as affected by direct ultra-high temperature heating and subsequent storage. Journal of Dairy Science Vol.59, No. 4.
- Sasago K., H. K. Wilson y Herreid. 1963. Determination of sulfhydryl and disulfide groups in milk by the p-choloromercibenzoate-dithiozone method. Journal of Dairy Science Vol. 46 No. 12 1348-1351
- Sava N., V.P. Plancken, W. Claeys and M. Hendrickx. 2005. The kinetics of heat-induced structural changes of β -Lactoglobulin. Journal of Dairy Science 88:1646-1653.
- Sawyer L. β -lactoglobulin. In: Advanced Dairy Chemistry-1 Proteins, part B. Editor: Fox P.F. y McSweemey P.L.H. 3th edition. Kluwer academic/plenum publishers.
- Singh H. and Waungana A. 2001. Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. International Dairy Journal 11 (2001) 543-551.
- Taylor, M. J. and Richardson. 1980. Antioxidant activity of skim milk: effect of heat and resultant sulfhydryl groups. Journal of Dairy Science 63: 1783-1795.

Walstra P., Wouters, J. T. M. y Geurts, T.J. 2006. Dairy Science and Technology. Second Edition. CRC Press.

Villegas-De Gante. A. 2004. Tecnología Quesera. Primera edición. Trillas. México. 398 p.