



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Tema:

“Estudio del Contenido proteico en diferentes leches comerciales de vaca en Ecuador y su Actividad antioxidante *in vitro*”

Trabajo de titulación, modalidad proyecto de investigación, previo la obtención del Título de Ingeniero en Alimentos otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autor: Edmundo Xavier Guzmán Romero

Tutor: PhD. Wilman Ismael Carillo Terán

Ambato – Ecuador

Septiembre - 2016

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Wilman Ismael Carrillo Terán

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 06 de agosto de 2016.



Ph.D. Wilman Ismael Carrillo Terán

C.I: 17570800-4

TUTOR

AUTORÍA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Yo, Edmundo Xavier Guzmán Romero manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniera en Alimentos son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Edmundo Xavier Guzmán Romero

C.I: 050347576-6

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Mg. Danae Fernández Rivero
C.I: 1757180-9




Dra. Dayana Cristina Morales Acosta
C.I: 180413557-0

6 de Septiembre De 2016

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de éste proyecto de investigación o parte de él un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de éste Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando ésta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Edmundo Xavier Guzmán Romero

C.I: 050347576-6

AUTOR

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Ambato por medio de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en alimentos permitirme haber culminado mis estudios.

Al Dr. Ismael Carrillo por su ayuda, su motivación y haberme permitido ser parte de su grupo de trabajo y llegar así a culminar una etapa de mi vida.

A mis amigos Carlos, Daniel, Marcelo, Marjorie, Johana, José, Gabriela, Alejandro, Miguel por haberme brindado su amistad sincera por haber compartido muchas buenas y malas en esta etapa de mi vida.

A mis maestros por haberme brindarme todo su conocimiento y amistad en la formación profesional y personal en toda la vida universitaria.

A Dr. Cecilia Carpio por brindarme su ayuda en la elaboración de mi proyecto de graduación.

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado en primer lugar a Dios y a mi Padre por haberme guiado, protegido y llenado de sabiduría desde el cielo en cada etapa de mi vida hasta el día de hoy.

Muy orgulloso de dedicar este trabajo a mi Madre Eva Romero quien me dio la vida y supo brindarme su más sincero amor, amistad, cariño y apoyarme en cada etapa de mi vida por haberme guiado y formado como una persona de bien pese a todas las adversidades que la vida nos puso al frente, gracias por ser mi mejor amiga por ser mi confidente, y que siempre será el amor de mi vida.

A mi Papá Geovanni Laverde por haberme apoyado desde que llego a nuestras vidas, por brindarme su cariño sincero, estar ahí cuando más lo necesite y por ser mi mejor amigo.

A mis hermanos Erika Guzmán y Adrián Guzmán por ser mi vida por apoyarme en todo momento por ser mis mejores amigos, mis confidentes y alegrarme siempre la vida pese a el golpe tan duro que nos dio la vida supieron ser lo que mejor me ayudo a llegar hasta esta etapa de mi vida.

A mis hermanas Brigith Guzmán y Esthelita Laverde, mis sobrinos Mauricio y Maickel, porque desde el día que llegaron a mi vida la llenaron de mucha felicidad, a mi tío Manuel Romero por apoyarme en todo momento.

A Estefanía Ortiz por estar ahí cuando más lo necesite, por apoyarme, por ser mi confidente, mi amiga, mi novia y brindarme su amistad más sincera y sobre todo cuando llegó a mi vida la cambió por completo.

ÍNDICE GENERAL

Carátula.....	I
ÍNDICE GENERAL	VIII
ABSTRAC	xviii
RESUMEN	xix
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	3
EL PROBLEMA	3
1.1. Tema.....	3
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos.....	5
1.3.1. Objetivo General	5
1.3.2. Objetivos específicos	5
CAPITULO II	6
MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	6
2.2. Hipótesis.....	8
2.2.1. Hipótesis nula.....	8
2.2.2. Hipotesis alternativa	8
2.3. Señalamiento de las variables de la hipótesis	8
2.3.1. Variable independiente.....	8
2.3.2. Variable dependiente.....	8
CAPITULO III	9
MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1. Materiales	9
3.2. Métodos.....	10
3.2.1. Obtención de caseínas totales y proteínas de suero.....	10

3.2.2.	Tratamiento térmico	10
3.2.3.	Hidrólisis de caseínas lácteas y proteínas de suero.....	10
3.2.4.	Actividad antioxidante <i>in vitro</i> (Método TBARS).....	11
3.2.5.	Aplicación de la técnica analítica de Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).....	11
3.2.6.	Método de Biuret	11
3.2.7.	Método de DUMAS	12
3.3.	Diseño Experimental.....	12
3.3.1.	Diseño de bloques completamente al azar.....	12
CAPITULO IV		13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		13
4.1.	Análisis y discusión de los resultados	13
4.1.1.	Rendimiento de caseínas lácteas y proteínas de suero de diferentes leches comerciales del Ecuador	13
4.2.	Cuantificación de proteínas por el método de Biuret y Dumas.....	15
4.3.	Electroforesis SDS-PAGE de caseínas lácteas y proteínas de suero	16
4.3.1.	Electroforesis de caseínas lácteas	17
4.3.2.	Electroforesis de proteínas de suero.....	18
4.3.3.	Electroforesis de caseínas, proteínas de suero e hidrolizado de caseína de leche entera sin tratar.....	19
4.4.	Porcentaje de Inhibición de peroxidación lipídica.....	20
4.4.1.	Porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática	20
4.4.2.	% de inhibición de peroxidación lipídica proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática.....	24

4.5. Análisis de varianza ANOVA para las diferentes caseínas lácteas de diferentes leches comerciales del Ecuador modificadas con hidrólisis enzimática y temperatura más hidrolisis enzimática.....	26
4.5.1. Análisis de varianza para la concentración de 0,02 mg/ml de caseínas con sus diferentes tratamientos aplicados (hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática)	26
4.5.2. Análisis de varianza para la concentración de 0,04 mg/mL de caseínas con sus diferentes tratamientos aplicados (hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática)	28
4.5.3. Análisis de varianza para la concentración de 0,1 mg/ml de caseínas con sus diferentes tratamientos aplicados (hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática)	30
4.5.4. Análisis de varianza para la concentración de 0,20 mg/ml de caseínas con sus diferentes tratamientos aplicados (hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática)	32
4.6. Análisis de varianza ANOVA para las diferentes proteínas de suero de diferentes leches comerciales del Ecuador modificadas con hidrólisis enzimática y temperatura más hidrolisis enzimática.....	34
4.6.1. Análisis de varianza para la concentración de 0,02 mg/ml de proteínas de suero con sus tratamientos (hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática)	34
4.6.2. Análisis de varianza para la concentración de 0,04 mg/ml de proteínas de suero con sus tratamientos (hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática)	35
4.6.3. Análisis de varianza para la concentración de 0,10 mg/ml de proteínas de suero con sus tratamientos (hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática)	37
4.6.4. Análisis de varianza para la concentración de 0,20 mg/ml de proteínas de suero con sus tratamientos (hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática)	38
4.7. Verificación de hipótesis.....	39

CAPITULO V	41
5.1. Conclusiones.....	41
5.2. Recomendaciones.....	42
MATERIALES DE REFERENCIA.....	43
Referencias bibliográficas	43
Anexos.....	47
Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica para el control BHT, Caseínas lácteas y proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática.....	47
Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas modificadas con hidrólisis enzimática.....	47
Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas modificadas con temperatura más hidrólisis enzimática.....	50
Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática.....	53
Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con temperatura más hidrólisis enzimática.....	55
Protocolo de investigación.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales y equipos de laboratorio utilizados en la investigación... 9	9
Tabla 2. Bloques y tratamientos (caseínas)..... 12	12
Tabla 3. Bloques y tratamientos (proteínas de suero) 12	12
Tabla 4. Volumen utilizado y rendimientos de caseínas y proteínas de suero 13	13
Tabla 8. Inhibición de peroxidación lipídica in vitro de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática de diferentes leches comerciales del Ecuador..... 25	25
Tabla 9. Cálculo de <i>porcentaje</i> de inhibición de peroxidación lipídica del control BHT 47	47
Tabla 10. Cálculo de <i>porcentaje</i> de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática de leche entera sin tratar 48	48
Tabla 11. Cálculo de <i>porcentaje</i> de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Zuuu..... 48	48
Tabla 12. Cálculo de <i>porcentaje</i> de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Alpina..... 49	49
Tabla 13. Cálculo de <i>porcentaje</i> de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Vita Leche..... 49	49
Tabla 14. Cálculo de <i>porcentaje</i> de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Leche LA Finca..... 50	50
Tabla 15. Cálculo de <i>porcentaje</i> de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática de leche entera sin tratar 50	50
Tabla 16. Cálculo de <i>porcentaje</i> de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Leche Zuuu..... 51	51

Tabla 17. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Leche Alpina	51
Tabla 18. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Vita Leche	52
Tabla 19. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Leche La Finca	52
Tabla 20. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática de leche entera sin tratar	53
Tabla 21. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Leche Zuuu	53
Tabla 22. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Leche Alpina	54
Tabla 23. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Vita Leche	54
Tabla 24. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Leche La Finca	55
Tabla 25. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática de leche entera sin tratar	55
Tabla 26. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Leche Zuuu	56
Tabla 27. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Leche Alpina	56

Tabla 28. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Vita Leche	57
Tabla 29. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Leche La Finca	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. SDS -PAGE. Columna 1: proteína estándar; Columna 2: proteínas de caseína (leche La Finca); columna 3: proteínas de caseína (Vita leche); columna 4 (leche Alpina); columna 5: proteínas de caseína (leche entera sin tratar).	17
Figura 2. SDS -PAGE. Columna 1: proteína estándar; Columna 2: proteínas de suero (leche Entera sin tratar); columna 3: proteínas de suero (leche Zuuu); columna 4 proteínas de suero (leche Alpina); columna 5: proteínas desuero (Vita leche); columna 6: proteínas de suero (leche La Finca).....	18
Figura 3. SDS –PAGE de leche entera sin tratar. Columna 1: proteína estándar; columna 2: proteína de suero; columna 3: proteínas de caseína y columna 4: hidrolizado de caseína.....	19
Figura 4. Tabla de análisis de varianza ANOVA para él porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica, y Test LSD Fisher para las diferentes leches comerciales del Ecuador y tratamientos a una concentración de 0,02 mg/mL de caseína modificada.	27
Figura 5. Media de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica y SD: \pm desviación estándar de las diferentes caseínas modificadas con distintos tratamientos de leches comerciales del Ecuador a una concentración de 0,02mg/mL.....	28
Figura 6. Tabla de análisis de varianza ANOVA para él porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica, y Test LSD Fisher para las diferentes leches comerciales del Ecuador y tratamientos a una concentración de 0,04 mg/mL de caseína modificada.	28
Figura 7. Media de porcentaje de inhibición de peroxidación y SD: \pm desviación estándar de las diferentes caseínas modificadas con distintos tratamientos de leches comerciales del Ecuador a una concentración de 0,04mg/mL.....	29
Figura 8. Tabla de análisis de varianza ANOVA para él porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica, y Test LSD Fisher para las diferentes leches comerciales del Ecuador y tratamientos a una concentración de 0,10 mg/mL de caseína modificada.	30

Figura 9. Media de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica y SD: \pm desviación estándar de las diferentes caseínas modificadas con distintos tratamientos de leches comerciales del Ecuador a una concentración de 0,10 mg/mL.....	31
Figura 10. Tabla de análisis de varianza ANOVA para el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica, y Test LSD Fisher para las diferentes leches comerciales del Ecuador y tratamientos a una concentración de 0,20 mg/mL de caseína modificada.	32
Figura 11. Media de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica y SD: \pm desviación estándar de las diferentes caseínas modificadas con distintos tratamientos de leches comerciales del Ecuador a una concentración de 0,20 mg/mL.....	33
Figura 12. Tabla de análisis de varianza ANOVA para el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica, y Test LSD Fisher para las diferentes leches comerciales del Ecuador y tratamientos a una concentración de 0,02 mg/mL de proteínas de suero modificadas.	34
Figura 13. Media de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica y SD: \pm desviación estándar de las diferentes proteínas de suero modificadas con distintos tratamientos de leches comerciales del Ecuador a una concentración de 0,02 mg/mL.....	35
Figura 14. Tabla de análisis de varianza ANOVA para el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica, y Test LSD Fisher para las diferentes leches comerciales del Ecuador y tratamientos a una concentración de 0,04 mg/mL de proteínas de suero modificadas.	35
Figura 15. Media de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica y SD: \pm desviación estándar de las diferentes proteínas de suero modificadas con distintos tratamientos de leches comerciales del Ecuador a una concentración de 0,04 mg/mL.....	36
Figura 16. Tabla de análisis de varianza ANOVA para el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica, y Test LSD Fisher para las diferentes leches comerciales del Ecuador y tratamientos a una concentración de 0,10 mg/mL de proteínas de suero modificadas.	37

Figura 17. Media de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica y SD: \pm desviación estándar de las diferentes proteínas de suero modificadas con distintos tratamientos de leches comerciales del Ecuador a una concentración de 0,10 mg/mL. 38

Figura 18. Tabla de análisis de varianza ANOVA para el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica, y Test LSD Fisher para las diferentes leches comerciales del Ecuador y tratamientos a una concentración de 0,20 mg/mL de proteínas de suero modificadas. 38

Figura 19. Media de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica y SD: \pm desviación estándar de las diferentes proteínas de suero modificadas con distintos tratamientos de leches comerciales del Ecuador a una concentración de 0,20 mg/mL. 39

ABSTRAC

In this study determined the content of dairy proteins (dairy caseins and proteins of serum), of different commercial milks of cow by means of precipitation isoeléctrica, in which it obtained that the milk with greater performance in dairy proteins was the whole milk without treating with 3,368%. Besides it quantified them to him by the method BIURET finding that the whole milk without treating possesses 20,343% in dairy caseins and 10,893% in proteins of serum. Also it evaluated the proteinaceous profile of the dairy proteins by means of electroforesis SDS-PAGE in which it observed that the dairy proteins in his fraction caseínica are composed mainly by alpha-casein, beta-casein and k-casein, in the proteins of serum in the whole milk without treating found: α -lactoalbuminas, B-lactoglobulinas, inmunoglobulins, seroalbúminas, Lactoferrina and in the others milks studied observed an absence of the ultimas 4 proteins mentioned. The dairy proteins were subjected to enzymatic hydrolysis with pepsin, and obtained peptides bioactivos that presented high values of percentage of inhibition of peroxidación lipídica for the whole milk without treating with the method of TBARS with values between 33,333% and 55,556%, for caseins And values between 18,492% and 34,840 for proteins of serum to distinct concentrations: 0,020; 0,040; 0,100; and 0,200 mg/mL. The dairy proteins when being subjected to a thermal treatment before being hidrolizadas increased his percentage of inhibition of peroxidación lipídica obtaining values between 45,009% and 58,004% for the dairy caseins and values between 26,930 and 40,866% for the proteins of serum.

Keywords: proteinaceous content, milk of cow, antioxidant activity, proteinaceous profile, Biuret.

RESUMEN

En este estudio se determinó el contenido de proteínas lácteas (caseínas lácteas y proteínas de suero), de diferentes leches comerciales de vaca mediante precipitación isoelectrica, en la cual se obtuvo que la leche con mayor rendimiento en proteínas lácteas fue la leche entera sin tratar con un 3,368%, además se las cuantificó por el método BIURET encontrando que la leche entera sin tratar posee 20,343% en caseínas lácteas y un 10,893% en proteínas de suero. También se evaluó el perfil proteico de las proteínas lácteas mediante electroforesis SDS-PAGE en la cual se observó que las proteínas lácteas en su fracción caseínica están compuestas principalmente por alfa-caseína, beta-caseína y k-caseína, en las proteínas de suero en la leche entera sin tratar se encontraron: α -lactoalbuminas, B-lactoglobulinas, inmunoglobulinas, seroalbuminas, Lactoferrina y en las otras leches estudiadas se observó una ausencia de las ultimas 4 proteínas mencionadas. Las proteínas lácteas fueron sometidos a hidrólisis enzimática con pepsina, y se obtuvieron péptidos bioactivos que presentaron valores altos de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica para la leche entera sin tratar con el método de TBARS con valores entre 33,333% y 55,556%, para caseínas y valores entre 18,492% y 34,840 para proteínas de suero a distintas concentraciones: 0,020; 0,040; 0,100; y 0,200 mg/mL. Las proteínas lácteas al ser sometidas a un tratamiento térmico antes de ser hidrolizadas aumentaron su porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica obteniendo valores entre 45,009% y 58,004% para las caseínas lácteas y valores entre 26,930 y 40,866% para las proteínas de suero.

Palabras clave: contenido proteico, leche de vaca, actividad antioxidante, perfil proteico, Biuret.

INTRODUCCIÓN

La leche es una de los principales productos agropecuarios producidos en el Ecuador y en varios países de Sudamérica, desde el punto de vista de los consumidores, la leche es uno de los alimentos base en la dieta diaria. En los últimos años la producción de leche ha sido el mayor ingreso en los sectores ganaderos rurales del país, la producción de leche en el sector industrial y de comercio genera una gran cantidad de ingresos **(Delgado et al 1999)**.

Una leche de excelente calidad en su composición debe tener un porcentaje de proteína mayor 3,5%; grasa mayor 3,5%; sólidos totales mayor 12,2%; un bajo número de mesófilos (<50.000 Ufc/mL) y de células somáticas (<100.000 CS/mL), debe ser libre de inhibidores e inocua **(Calderón et al; 2006)**. La composición fisicoquímica de la leche es variable y depende de varios factores: genéticos, fisiológicos, nutricionales, ambientales, características individuales, selección y mejoramiento de la raza del animal **(Magarinos; 2000)**.

La adulteración de la leche con cualquier aditivo en la industria, constituye un fraude al consumidor, competencia desleal al productor y además afecta la cadena productiva lechera. Una de las prácticas fraudulentas más frecuentes en la producción e industria de la leche, es la adición de agua con el objeto de aumentar su volumen. Al aumentar agua en la leche los solutos se diluyen y se reduce el valor nutricional, también es una fuente de contaminación microbiológica, y es quizá la forma más simple de fraude en la industria que permite de aumentar ingresos y disminuir costos de producción **(González y Medina, 2005)**.

Las proteínas lácteas (caseínas lácteas y proteínas de suero) probablemente son el grupo de proteínas que más se ha estudiado. La leche en su composición natural está conformada básicamente por tres estructuras: a) proteínas, b) glóbulos de grasa y c) lactosa, las dos primeras se encuentran en estado coloidal y la tercera en una solución. Entre los grupos de proteínas presentes en la leche se encuentran definidos claramente dos: las caseínas fosfoproteínas organizadas en forma de conglomerados coloidales denominadas micelas, y que por su estructura compleja son estables al calor e insolubles a pH 4,6; y las

proteínas séricas, con una estructura globular compleja, que no se pueden precipitar a pH 4,6 ya que son básicas y a la vez inestables al calor **(Huppertz; 2009)**.

La ingesta de proteínas de buena calidad, en la dieta de las personas es esencial desde el punto de vista nutricional, gracias al contenido de aminoácidos esenciales. Actualmente se ha comunicado que las proteínas de los alimentos pueden, además, ejercer otras funciones in vivo, por medio de sus péptidos con actividad biológica **(Korhonen; 20019)**.

La leche posee estos péptidos bioactivos de forma inactiva, los cuales pueden ser liberados de la secuencia proteica por la acción de enzimas digestivas durante el tránsito intestinal o durante el procesamiento del alimento, como en la fermentación de la leche o la maduración de los quesos. Una vez liberados, estos péptidos pueden ejercer un efecto fisiológico en el organismo **(Foltz; 2007)**.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1. Tema

Estudio del contenido proteico en diferentes leches comerciales de vaca en Ecuador y su actividad antioxidante *in vitro*.

1.2. Justificación

La leche es un líquido nutritivo blanquecino, producido por las hembras de los mamíferos, que en su composición posee cantidades de proteína, grasas, vitaminas y minerales esenciales para la alimentación de las personas, éste alimento posee un alto consumo a nivel mundial. La leche entera de vaca contiene aproximadamente, el 3,5% de proteína de los cuales el 80% son caseínas y 20% son proteínas de suero. Las caseínas se han clasificado como α -, β - y K-caseínas, el suero de leche contiene β -lactoglobulina, α -lactalbúmina y varias proteínas de poca importancia con diferentes actividades biológicas como son enzimas, y propiedades de unión a inmunoglobulinas y minerales **(Mohanty y col., 2015)**. Las propiedades multifuncionales de péptidos biológicamente activos de la leche se reconocen cada vez más, los cuales podrían mostrar un impacto positivo en la fisiología humana y en el metabolismo, aplicado directamente a través de la hidrólisis enzimática *in vivo* o *in vitro*. **(Cristóbal y Weiler, 2003)**. Los péptidos biológicamente activos derivados de la leche se encuentran inicialmente en forma inactiva dentro de la secuencia de las moléculas precursoras pero se pueden liberar de tres maneras: en primer lugar por hidrólisis enzimática con enzimas digestivas como la pepsina, tripsina, quimotripsina; en segundo lugar por fermentación de la leche con cultivos iniciadores proteolíticos y en tercer lugar por proteólisis con enzimas derivadas de microorganismos proteolíticos **(Korhonen y Pihlanto, 2003)**.

En la industria de lácteos se considera adulteración de este producto cuando su naturaleza o composición no corresponden con lo que se etiqueta, anuncia, expende, suministra, o cuando no corresponda a las especificaciones de su autorización; o haya sufrido tratamiento que disimule su alteración, se encubran defectos en su proceso, o en la calidad sanitaria de las materias primas

utilizadas. (**Ley General de Salud, 1998**). Alrededor del mundo la leche es sometida a varios tratamientos para controlar su inocuidad como UHT, pasteurización y esterilización con tensoactivos, etc. En la industria se adultera la leche con adición de almidón, agua, suero de quesería y aditivos que no son especificados en el etiquetado. La leche posee proteínas de referencia declaradas por la FAO y OMS por este motivo se considera un alimento nutritivo por excelencia. Las proteínas lácteas se modifican por diferentes métodos entre ellos se encuentran la hidrólisis enzimática, altas temperaturas, microondas, etc.

Por esta razón, en este estudio se caracterizó las caseínas de leche entera de vaca y leches de diferentes marcas comerciales, y se determinó mediante electroforesis SDS-PAGE el perfil proteico. Las proteínas lácteas fueron modificadas mediante tratamiento térmico e hidrólisis enzimática con pepsina y posteriormente se evaluó si estas proteínas modificadas tienen mayor actividad antioxidante que las proteínas no tratadas consultadas en bibliografía.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

- Determinar el contenido proteico de leche entera y leches comerciales de vaca en Ecuador y su actividad antioxidante *in vitro* (método TBARS).

1.3.2. Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar las proteínas de leche entera y leches comerciales de vaca.
- Potenciar la actividad antioxidante de las proteínas lácteas bovinas mediante hidrólisis enzimática porcina.
- Incrementar la actividad antioxidante de las proteínas lácteas bovinas mediante tratamiento térmico.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

La adulteración de alimentos con otras materias primas de especies con mayor disponibilidad y/o menor costo se observa en todo el mundo (**Herman, 2001**). En la industria láctea existen diversas maneras en las que la leche puede ser adulterada, destacándose las siguientes: la adición de agua, la presencia de agentes neutralizantes y la incorporación de suero de quesería, estas adulteraciones pueden plantear riesgos para la salud de las personas con trastornos metabólicos o alergias particulares (**Woolfe, 2004**). Para la mayoría de estas adulteraciones existen diversos métodos analíticos que permiten conocer la calidad del producto. Así por ejemplo para detectar la adición de agua existen principalmente tres métodos: a) refractométrico, b) crioscópico y, c) osmométrico. En el caso de agentes neutralizantes, las más sencillas son las pruebas colorimétricas que usan indicadores de pH como el ácido rosálico o rojo de fenol. Pero, específicamente en la adulteración de leche con suero, no existe una técnica oficial que pueda detectarlo (**Pinto et al., 1991**). En la industria un problema complejo ha sido y es, el desarrollo de un método de análisis capaz de detectar adulteración de la leche con un componente propio de la leche, el cual se ha basado en las propiedades físico-químicas de las proteínas, el cual puede ser durante el fenómeno de coagulación ocurrido en el proceso de fabricación de los quesos (**Nakano y Ozimek, 1999**).

En bibliografía científica existen muchos estudios que sustentan que las proteínas derivadas de la leche bovina como la lactoferrina, α -Lactoalbumina, β -Lactoglobulina, α ₁ y α ₂ caseínas ejercen actividades biológicas sobre el organismo humano. Entre ellos destacan actividad antimicrobiana, actividad antiviral, actividad antitumoral y actividad antioxidante. Estas proteínas cuando son hidrolizadas por diferentes enzimas proteolíticas pueden producir determinadas secuencias de aminoácidos llamados péptidos bioactivos. Dichos péptidos también pueden ejercer actividades biológicas sobre el organismo humano. Por este motivo existe mucho interés en obtener nuevos hidrolizados que permitan identificar nuevos péptidos bioactivos.

La investigación realizada por **Mohanty y col (2015)**. Destacan que los péptidos bioactivos derivados de la leche han sido identificados como ingredientes potenciales de alimentos funcionales que promueven la salud, estos péptidos bioactivos están dirigidos a las enfermedades crónicas relacionadas con la dieta, en especial las enfermedades no transmisibles a saber: obesidad, enfermedades cardiovasculares y diabetes.

En investigaciones posteriores se han obtenido péptidos bioactivos de la leche de vaca los cuales han mostrado actividad antimicrobiana para inhibir muchos patógenos Gram negativos y Gram positivos, incluyendo *Escherichia coli* MTCC82, *Aeromonas hydrophila* ATCC7966, *Salmonella typhi* MTCC3216, *Bacillus cereus* ATCC10702, *Salmonella typhimurium* SB300, *S. enteritidis* 125109, *Staphylococcus aureus* MTCC 96 (**Mohanty et al., 2014**). A la vez dichos péptidos pudieron controlar muchas infecciones microbianas *Staphylococcus* spp., *Sarcina* spp., *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes* (**Lahov y Regelson, 1996**). Otros investigadores han reconocido nuevos péptidos antibacterianos a partir de una quimosina, tripsina bovina recopilación de α_2 -CN, como, Isracidine, que tiene un fuerte efecto protector contra algunas bacterias como *S. aureus*, *S. pyogenes* y *Listeria monocytogenes*. (**Lahov y Regelson, 1996**).

Varios péptidos obtenidos de la leche también son importantes en el metabolismo oxidativo que es fundamental para la supervivencia de las células, ayudando a la eliminación de radicales libres (**Mohanty y col., 2015**). El cuerpo humano libera un exceso de radicales libres los cuales oxidan las proteínas celulares, lípidos de membrana, ADN y enzimas, causan el cierre de la respiración celular y ciertas enfermedades incluyendo la aterosclerosis, la diabetes, la artritis reumatoide y oxidativa, daño de ADN que conduce al cáncer (**Abuja y Albertini, 2001 , Halliwell, 2000 y Halliwell y Whiteman, 2004**).

Además, los péptidos antioxidantes de la caseínas de la leche se componen de (10 – 55) aminoácidos hidrofóbicos incluyendo prolina, histidina, tirosina o triptófano en la secuencia que son ampliamente distribuido entre las caseínas, en la hidrólisis por enzimas proteolíticas. Dichos aminoácidos tienen importancia en la actividad antioxidante (**Korhonen y Pihlanto, 2003**).

2.2. Hipótesis

2.2.1. Hipótesis nula

- Los tratamientos aplicados a las caseínas lácteas y proteínas de suero de diferentes leches comerciales del Ecuador no afectan significativamente el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica en mantequilla.

2.2.2. Hipotesis alternativa

- Hidrólisis enzimática y temperatura mas hidrólisis enzimática aplicados a las caseínas lácteas y proteínas de suero de diferentes leches comerciales del Ecuador afectan significativamente el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica en mantequilla.

2.3. Señalamiento de las variables de la hipótesis

2.3.1. Variable independiente

- Hidrólisis enzimática.
- Temperatura mas hidrólisis enzimática.
- Diferentes leches comerciales del Ecuador.

2.3.2. Variable dependiente

- Porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica en mantequilla.

CAPITULO III
MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Tabla 1. Materiales y equipos de laboratorio utilizados en la investigación.

Materiales de laboratorio	Equipos de laboratorio
• Vasos de precipitación	• Liofilizador
• Tubos de ensayo	• Electroforesis SDS-PAGE
• Pipetas	• Congelador -80°C
• Buretas	• Espectrofotómetro
• Varillas de agitación	• Refrigeradoras
• Mesas	• Incubadora
• Reactivos	• Estufa
• Espátulas	• Vortex
• Planchas de agitación	• Termomix
• pH-metro	
• Balón de aforo	
• Tubos eppendorf	
• Puntas de pipetas	

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

3.2. Métodos

3.2.1. Obtención de caseínas totales y proteínas de suero

Las caseínas bovinas se las obtuvo según el método descrito por **López-Expósito y col., (2007)**. Para separar la fracción caseínica, se descendió el pH a 4,6 con HCl 0,1 N a todas las leches estudiadas y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se centrifugó a 4.000 rpm durante 20 minutos, el precipitado de caseínas se lavó dos veces con agua acidulada a pH 4,6 y se separó el suero lácteo, este se congeló a -20°C y se liofilizó. Posteriormente al precipitado de caseínas, se le realizó tres lavados con una mezcla de agua/diclorometano en una proporción 50: 50, para eliminar restos de grasa y se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos. Una vez hechos los lavados, los precipitados se congelaron y liofilizaron.

3.2.2. Tratamiento térmico

Para desnaturalizar por calor a la caseína de la leche entera de vaca y leches comerciales y proteínas de suero, se prepararon soluciones de caseína y otra de proteínas de suero a una concentración de 1 mg/mL y se sometieron a baño María a 90°C durante 30 minutos en tampón fosfato potasio 10 mM a pH 7 y se centrifugó a 3.000 rpm durante 15 minutos para eliminar los agregados insolubles, se liofilizaron y se analizaron mediante SDS-PAGE.

3.2.3. Hidrólisis de caseínas lácteas y proteínas de suero

Para obtener los hidrolizados de proteínas lácteas, se prepararon suspensiones acuosas de caseína y proteínas de suero al 0,5% (p/v) en SGF y se ajustó con HCl 1 M a pH 2,0 y se añadió pepsina porcina A (E.C. 3.4.23.1., 570 U/mg de proteína) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluida para obtener una relación enzima/sustrato 3,7% (p/p). Las hidrólisis se llevaron a cabo durante 3 horas a 37°C. La inactivación de la enzima se realizó mediante calentamiento a 80°C durante 20 minutos y ajustando con NaOH 1 M el pH a 7,0. Los hidrolizados se centrifugaron a 13.000 rpm durante 20 minutos y se recolectaron los sobrenadantes. Las muestras fueron congeladas a -20°C y se liofilizaron.

3.2.4. Actividad antioxidante *in vitro* (Método TBARS)

Las muestras fueron analizadas mediante el método descrito por **Guzmán-Chozas et al, (1997)**. Con ligeras modificaciones en un frasco de vidrio ámbar se colocaron 5 mL de reactivo de TBA recién preparado (ácido 2-tiobarbitúrico 0.02 M en ácido acético glacial al 90%), y 0,5 g de mantequilla. El frasco se sumergió en un baño de agua a 90°C durante 45 minutos. También se preparó un blanco con el mismo procedimiento anterior. Luego el frasco fue enfriado en agua durante 10 minutos. Una porción de la muestra se llevó a una cubeta y la absorbancia de la muestra fue leída a 532nm en un espectrofotómetro.

Modificaciones: no se midió la absorbancia en lapsos de tiempo, se usaron varias concentraciones de muestra y se trabajó en tubos eppendorf de 2mL.

3.2.5. Aplicación de la técnica analítica de Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Para la caracterización de las proteínas de leche se empleó la técnica analítica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes utilizando el método descrito por **Laemmli, (1970)** con modificaciones. Las muestras fueron sometidas a un campo eléctrico de 200 V durante 30 minutos en un buffer Tris-HCl usando un equipo Bio-Rad, modelo Mini Protean II (Bio-Rad Life Science, USA), los geles fueron teñidos durante la noche en azul de coomassie y luego fueron desteñidos en una mezcla de metanol, etanol y ácido acético. Una vez que se obtuvieron los geles, estos fueron fotografiados digitalmente con un equipo Bio-Rad modelo ChemiDoc. Los geles se hicieron por duplicado para la interpretación de los resultados.

3.2.6. Método de Biuret

Se pesó 7,8 a 8,1 mg de muestra + 1 mL de agua + 100 µL de NaOH en tubos. Luego se pasó 0,3 mL de solución a otro tubo y se colocó 1,5 mL de compuesto de Biuret. El método se basa en la formación del complejo coloreado de Cu^{2+} y los grupos NH en medio básico. La reacción se basa en la formación de un compuesto de color violeta, debido a la formación de un complejo de coordinación entre los iones Cu^{2+} y los pares de electrones no

compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos presentando un máximo de absorción a 540 nm. **(Brandford, 1976).**

3.2.7. Método de DUMAS

Pesar 50 mg de muestra homogénea. Seleccionar una curva de calibración adecuada (EDTA) dependiendo de la proteína de la muestra/nitrógeno contenida, dejar correr el programa y leer los resultados obtenidos.

3.3. Diseño Experimental

Los datos obtenidos fueron tabulados y procesados mediante programas estadísticos: Excel e InfoStat. Los datos experimentales se presentan como valores promedio con sus respectivas desviaciones estándar. La comparación de tratamientos y bloques se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) empleando el test de mínimas diferencias significativas (LSD) Fisher con una significancia del 95 % para determinar las diferencias entre bloques y tratamientos.

3.3.1. Diseño de bloques completamente al azar

3.3.1.2 Bloques y tratamientos

Tabla 2. Bloques y tratamientos (caseínas)

Bloques	Tratamientos (Hidrólisis enzimática)
a ₀) Leche 1 (Leche entera sin tratar)	b ₀ .- sin temperatura
a ₁) Leche 2 (Leche Zuuu)	b ₁ .- con temperatura
a ₂) Leche 3 (Leche alpina)	
a ₃) Leche 4 (Vita Leche)	
a ₄) Leche 5 (Leche La Finca)	

Elaborado por: Xavier Guzmán

Tabla 3. Bloques y tratamientos (proteínas de suero)

Bloques (proteínas de suero)	Hidrólisis enzimática
a ₀) Leche 1 (Leche entera sin tratar)	b ₀ .- sin temperatura
a ₁) Leche 2 (Leche Zuuu)	b ₁ .- con temperatura
a ₂) Leche 3 (Leche alpina)	
a ₃) Leche 4 (Vita Leche)	
a ₄) Leche 5 (Leche La Finca)	

Elaborado por: Xavier Guzmán

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis y discusión de los resultados

4.1.1. Rendimiento de caseínas lácteas y proteínas de suero de diferentes leches comerciales del Ecuador

La composición de la leche posee una variación considerable dependiendo de la raza del animal, el estado de lactancia, alimento, época del año y muchos otros factores, aun así, algunas de las relaciones entre los componentes son muy estables y pueden ser utilizados para indicar si ha ocurrido alguna adulteración en la composición de la leche. La fracción proteica de la leche contiene un gran número de compuestos biológicamente activos, además de las proteínas de la leche, caseínas y proteínas del suero lácteo, existen también pequeñas cantidades de otras proteínas (Robert & Zaloga; 1994).

Tabla 4. Volumen utilizado y rendimientos de caseínas y proteínas de suero

Marcas de leche	volumen utilizado (mL)	% de caseínas	% de proteínas de suero
Leche entera sin tratar	100	2,742±0,049	0,626±0,026
Leche Zuuu	100	2,425±0,059	0,341±0,028
Leche Alpina	100	2,541±0,064	0,390±0,023
Vita Leche	100	2,493±0,044	0,451±0,029
Leche La finca	100	2,650±0,047	0,544±0,031

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

El estudio del perfil proteico de las diferentes leches comerciales y una leche entera sin tratar del Ecuador, se realizó mediante precipitación isoeléctrica a pH 4,6 de 100 mL de cada leche, para separar las caseínas lácteas de las proteínas de suero, esto fue realizado por triplicado. Posteriormente estas proteínas fueron liofilizadas por 5 días y los rendimientos se calcularon en base seca. Los resultados obtenidos muestran que cada leche posee valores diferentes en su contenido de proteínas.

En la Tabla 4 al calcular los rendimientos de caseínas lácteas y proteínas de suero, se puede observar que la leche entera sin tratar presentó un valor más alto en el contenido de proteínas con un $2,742\pm 0,049\%$ de caseínas lácteas y $0,626\pm 0,026\%$ de proteínas de suero, que es el valor que más se asemeja al valor descrito por **Mohanty y col., (2015)**, en la cual se indica que la leche de vaca contiene un 3,5% de proteínas totales y que el 80% de estas son caseínas lácteas y el 20% proteínas de suero, la única leche comercial que presentó un valor más cercano al valor de referencia fue la leche de la marca La Finca, con un $2,650\pm 0,047\%$ de caseínas lácteas y un valor de $0,544\pm 0,031\%$ de proteínas de suero, seguido de la marca Vita Leche que posee un valor de $2,493\pm 0,044\%$ de caseínas lácteas y $0,451\pm 0,031\%$ de proteínas de suero. A continuación viene la leche de marca Alpina que posee un valor de $2,541\pm 0,064\%$ de caseínas lácteas y $0,390\pm 0,023\%$ de proteínas de suero, estas leches comerciales contienen el valor mínimo que está establecido por la norma **INEN 10, 1984**, la cual indica que la leche entera pasteurizada debe tener un mínimo del 2,9 % de proteína en su composición para ser puestas en vitrinas para su consumo. Por otra parte la leche de marca Zuuu posee un valor de $2,425\pm 0,059\%$ de caseínas lácteas y un $0,341\pm 0,028$ de proteínas de suero, lo cual indica que el contenido de proteínas está por debajo del recomendado.

Como se puede observar en la Tabla 4 y 5, el rendimiento de caseínas totales y proteínas de suero de todas las leches comerciales estudiadas posee variación unas de otras, esto puede deberse a que las leches comerciales, al ser sometidas a varios procesos tecnológicos como pasteurización, esterilización entre otros sufren cambios en su composición proteica (**Hata, 1996**). Los tratamientos térmicos aplicados a la leche ($85 - 90^{\circ}\text{C}$ por varios minutos) son normalmente en la elaboración de yogurt y leches fermentadas, en los cuales es deseable la producción de ácido láctico desde el comienzo para obtener una textura firme así como una mayor retención de suero. Los cambios en las partículas de caseínas dependen de la temperatura y de la duración del tratamiento térmico y también los cambios pequeños de pH de la leche durante el tratamiento térmico causan un decremento pequeño en el tamaño de las micelas de caseína (**Guyamarc' et al; 2007**).

4.2. Cuantificación de proteínas por el método de Biuret y Dumas

Tabla 5. Porcentaje de proteína pura de caseínas lácteas y proteínas de suero por el método de Biuret.

Marcas de Leche	Caseínas Lácteas en (%)	Proteínas de suero en (%)
Leche entera sin tratar	20,343±0,299	10,893±0,207
Leche Zuuu	12,448±0,651	5,725±0,180
Leche Alpina	14,455±0,493	6,945±0,459
Vita Leche	14,8375±0,509	7,248±0,356
Leche La Finca	16,883±0,733	7,8275±0,328

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Tabla 6. Porcentaje de proteína pura de caseínas lácteas y proteínas de suero por el método de Dumas.

Marcas de Leche	Caseínas Lácteas en (%)	Proteínas de suero en (%)
Leche entera sin tratar	78,879	43,091
Leche Zuuu	15,382	18,478
Leche Alpina	31,930	15,621
Vita Leche	37,338	14,579
Leche La Finca	42,221	14,941

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

En la Tabla 5 se puede observar que la cantidad de caseínas lácteas puras presentes en la leche entera sin tratar es un 20,343±0,299% que es mucho mayor que en las demás leches, seguida por la leche La Finca con 16,883±0,733%; Vita leche con un 14,8375±0,509%; leche Alpina

14,455±0,493% y la leche que tiene menor contenido de caseínas lácteas es la leche Zuuu con un 12,448±0,651%. Estos valores reflejan que la mejor leche en contenido de proteínas es la leche entera sin tratar, es decir, que en la industria la leche al ser procesada sufre modificaciones en su composición como es el caso de las caseínas lácteas o a la vez estas sufren cambios al ser sometidas a tratamientos térmicos previos a su comercialización.

En el caso de las proteínas de suero la leche que mayor cantidad posee es la leche entera sin tratar con un valor de 10,893±0,207%, seguida por la leche La Finca con un valor de 7,8275±0,328%, Vita leche con un valor de 7,248±0,356%, leche Alpina con un valor de 6,945±0,459% y la leche que menor cantidad de proteínas de suero posee es la leche Zuuu, con 5,725±0,180. Estos valores bajos de proteína pura en las leches comerciales se deben a que todas las leches estudiadas poseen ausencia de varias proteínas esenciales de suero ya que estas son inestables a los tratamientos térmicos (Figura 2), como no es el caso de las caseínas lácteas.

Como se puede observar en la Tabla 6 los valores obtenidos por el método de Dumas mantiene una tendencia similar a las obtenidas por el método de Biuret. La diferencia de los valores pueden deberse al principio base que maneja cada uno de los métodos empleados. Siendo el método Biuret el más sensible a la presencia de grasa en las muestras.

4.3. Electroforesis SDS-PAGE de caseínas lácteas y proteínas de suero

En los últimos años ha aumentado el uso de electroforesis SDS-PAGE para la identificación de proteínas vegetales como animales. Las proteínas de la leche (caseína lácteas y proteínas de suero) han sido caracterizadas mediante diferentes técnicas analíticas entre ellas se encuentran la electroforesis SDS-PAGE 1D y 2D (**Schägger; 2006**). Esta técnica de análisis también es útil para identificar la hidrólisis de proteínas y para la obtención de péptidos. Estudios han descrito que los péptidos bioactivos son cadenas cortas de aminoácidos con actividad similar a las hormonas, que son capaces de regular funciones fisiológicas mediante interacciones con receptores específicos. Para producir una respuesta que provoca un beneficio para la salud. Estos

péptidos se han obtenido mediante la hidrólisis de proteína de pescado, caseínas, proteínas de suero, y albúminas de huevo y están constituidos usualmente de 3 a 16 residuos aminoacídicos (**FitzGerald & Murray ; 2006**).

4.3.1. Electroforesis de caseínas lácteas

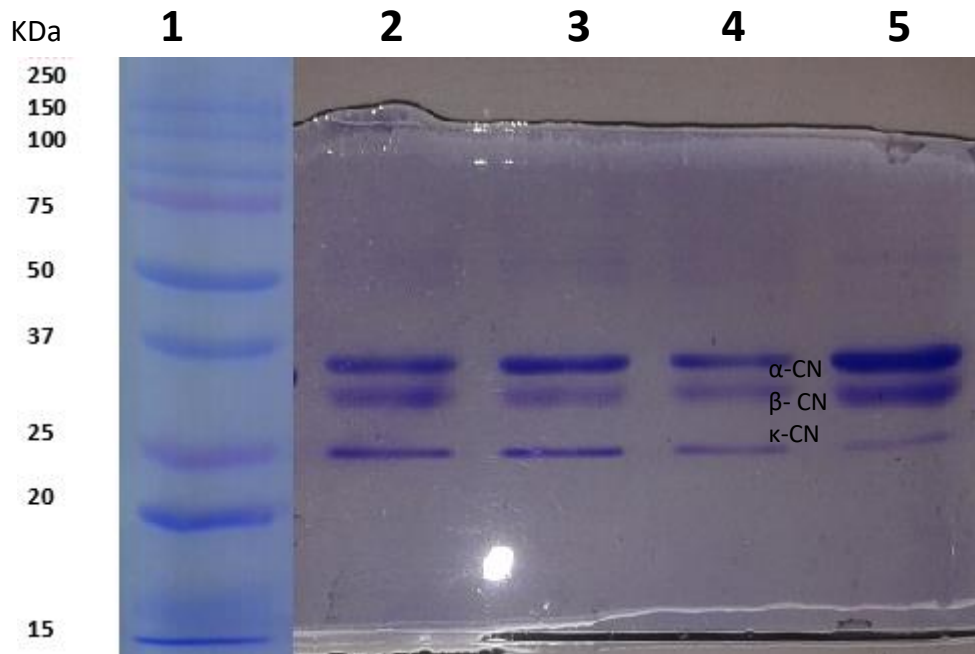


Figura 1. SDS -PAGE. Columna 1: proteína estándar; Columna 2: proteínas de caseína (leche La Finca); columna 3: proteínas de caseína (Vita leche); columna 4 (leche Alpina); columna 5: proteínas de caseína (leche entera sin tratar).

Una vez liofilizadas las fracciones de las caseínas de las diferentes leches comerciales estudiadas, se procedió a analizarlas mediante electroforesis SDS-PAGE (figura 1), la fracción caseínica de la leche esta está compuesta principalmente por α -CN, β -CN, y κ -CN (**Mohanty y col, 2015**), en este estudio se pudo identificar α -CN, β -CN y κ -CN en todas las leches estudiadas, pero se observó que la mayor concentración de caseínas está en la leche entera sin tratar debido a que las bandas son más intensas ver (Figura 1).

En la Figura 1 se puede observar que los pesos moleculares de las distintas caseínas encontradas en la leche coinciden con los valores encontrados en bibliografía en la cual señala que: la α -s1-caseína y α -s2-caseína tienen un

peso molecular en el rango 27-32 y la κ -caseína tiene un peso molecular de 21,26 kDa (Madureira et al; 2007).

4.3.2. Electroforesis de proteínas de suero

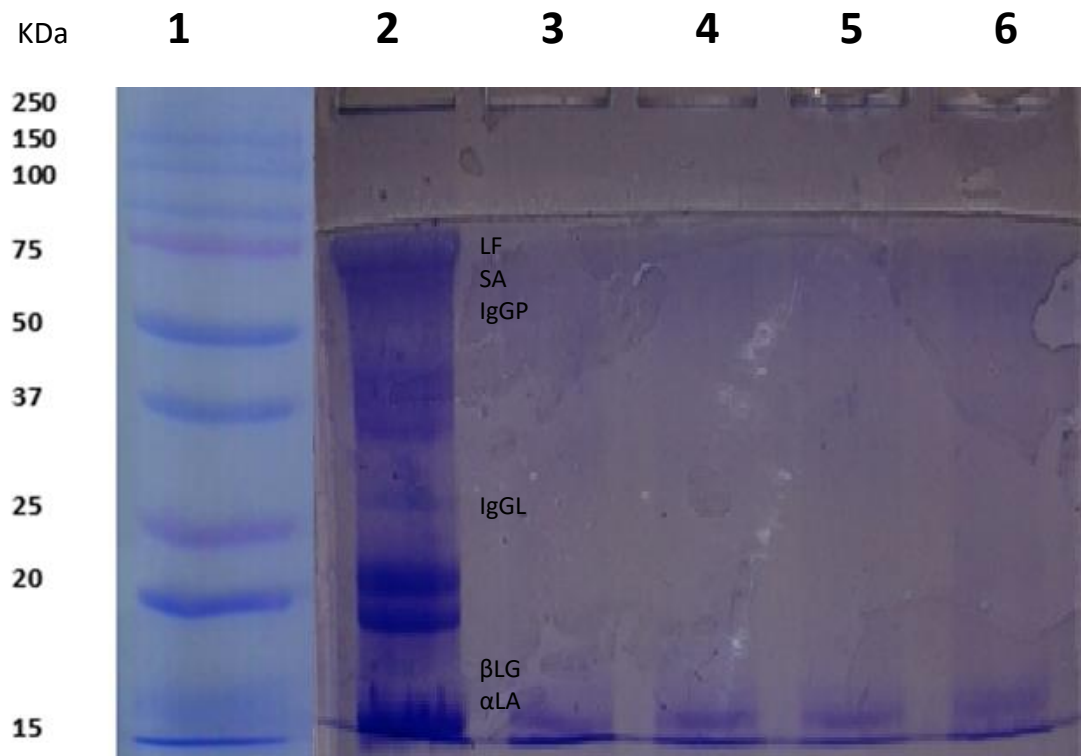


Figura 2. SDS -PAGE. Columna 1: proteína estándar; Columna 2: proteínas de suero (leche Entera sin tratar); columna 3: proteínas de suero (leche Zuu); columna 4 proteínas de suero (leche Alpina); columna 5: proteínas desuero (Vita leche); columna 6: proteínas de suero (leche La Finca).

Luego de ser liofilizado el suero obtenido de la precipitación isoeléctrica de las caseínas lácteas de las diferentes leches comerciales estudiadas, se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE. Las proteínas de suero están compuestas principalmente por: α -lactoalbuminas (α LA), B-lactoglobulinas (β LG), inmunoglobulinas (GP-GL), seroalbúminas (SA), Lactoferrina (LF), (Poveda E, 2013). En este estudio se pudo identificar que la única leche que posee todas estas proteínas α -lactoalbuminas, B-lactoglobulinas, inmunoglobulinas, seroalbúminas, Lactoferrina, es la leche entera sin tratar. Por otra parte las demás leches estudiadas solo poseen dos tipos de proteínas

B-lactoglobulinas y α -lactoalbuminas ver (Figura 2), lo que quiere decir que estas leches contienen muy poca concentración de las proteínas mencionadas.

En la Figura 2 se puede observar que los pesos moleculares de las distintas proteínas de suero encontradas en la leche coinciden con los valores encontrados en bibliografía. En la cual señala que: α -lactoalbúmina (α LA) fue encontrada a un peso molecular de 14,175 kDa mientras que en las leches estudiadas se encuentran en valores de 16 kDa. La β -lactoglobulina (β LG), fue encontrada a un peso molecular de 18,277 kDa mientras que en las leches estudiadas se encuentran valores de 17 kDa. Las inmunoglobulinas (GP-GL) fueron encontradas a un peso molecular de 150,00 kDa las leches estudiadas a valores de de 50 a 75 kDa. Las seroalbúminas (SA) fueron encontradas a un peso molecular de 66,267 kDa y la Lactoferrina (LF), fue encontrada a un peso molecular de 80 kDa y las leches estudiadas a un peso molecular de 75 (Madureira et al; 2007).

4.3.3. Electroforesis de caseínas, proteínas de suero e hidrolizado de caseína de leche entera sin tratar

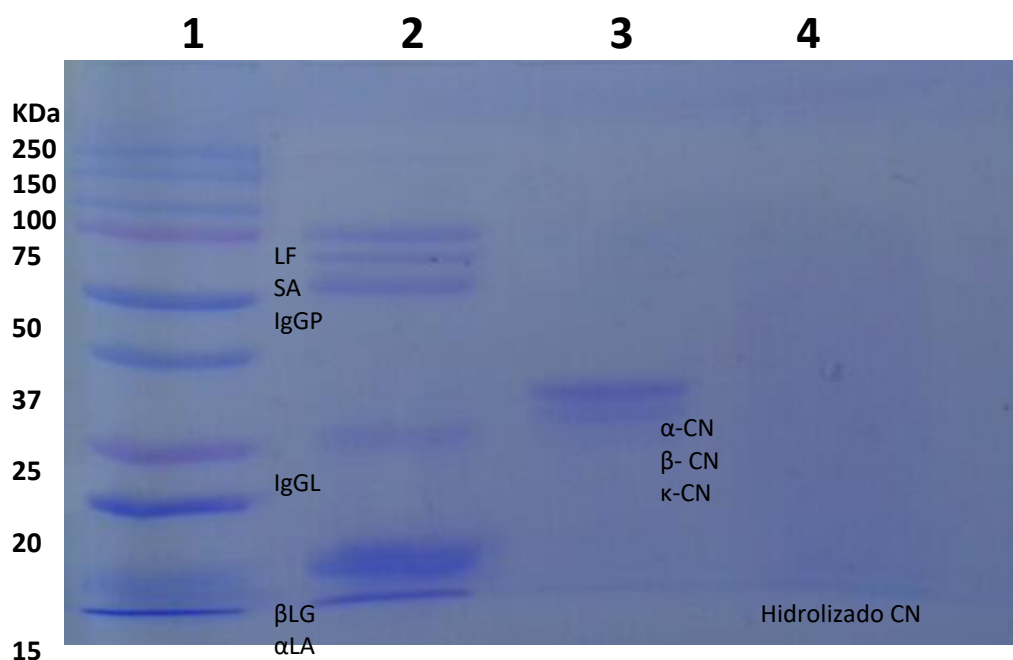


Figura 3. SDS –PAGE de leche entera sin tratar. Columna 1: proteína estándar; columna 2: proteína de suero; columna 3: proteínas de caseína y columna 4: hidrolizado de caseína.

En la Figura 3 se puede observar que la leche entera sin tratar posee todas las caseínas lácteas (columna 3) α -CN, β -CN, y κ -CN (**Mohanty y col, 2015**), y proteínas de suero (columna 2) α -lactoalbuminas (α LA), B-lactoglobulinas (β LG), inmunoglobulinas (GP-GL), seroalbúminas (SA), Lactoferrina (LF) (**Poveda E, 2013**), y en la columna 4 se puede observar que la pepsina porcina hidrolizó por completo a las caseínas lácteas.

En el Ecuador a todas las leches comerciales se les da Temperatura Ultra Alta (UHT) para su comercialización, es por esto que las leches comerciales al ser sometidas a este proceso, presentan una importante disminución del tamaño de las micelas de caseína y poseen bajo porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica al ser comparadas con una leche que no ha sufrido ningún tratamiento antes de su análisis.

Estos porcentajes bajos de contenido de caseínas y proteínas de suero en la leche se puede deber también a la adulteración que esta sufre en su industrialización como es la adición de suero de quesería, adición de tensoactivos, adición de agua, o aditivos que no son especificados en su etiquetado (**Reyes, Bon, Moreno, Rubio, & Valdivia, 2007**), en el caso de la leche entera sin tratar su rendimiento es mayor, debido a que esta leche fue analizada sin que haya tenido ningún proceso industrial, ni la adición de aditivos que normalmente se usa en las industrias láctea para tener una mayor rentabilidad del producto.

4.4. Porcentaje de Inhibición de peroxidación lipídica

4.4.1. Porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática

Las proteínas son necesarias para el crecimiento y desarrollo de nuestro organismo, para el mantenimiento y reparación de tejidos, a la vez son el principal componente estructural de células y tejidos. Las proteínas de leche de vaca han sido posiblemente las proteínas más estudiadas en los últimos años por sus múltiples actividades biológicas como es el caso de la actividad antioxidante. En la actualidad las proteínas y péptidos con actividades

biológicas están constituyendo el grupo de estudio más importante dentro del campo de los alimentos funcionales **(Iwaniak. A, & Minkiewicz; 2007)**.

En la bibliografía se han descrito péptidos bioactivos con diversas actividades biológicas como es el caso de la actividad antioxidante, la cual consiste en la capacidad de secuestrar radicales libres y de formar complejos con iones metálicos que catalizan las reacciones de los radicales, estos péptidos también pueden actuar impidiendo que otras moléculas se unan a especies reactivas del oxígeno **(venéreo, 2002)**.

En bibliografía se ha descrito que los aminoácidos de los fragmentos: f(1-23) de α_1 -caseína bovina hidrolizada con quimosina posee actividad antimicrobiana y actividad inmunomoduladora; los fragmentos f(164-169) y f(183-207) de α_2 -caseína provenientes de caseína bovina hidrolizada con pepsina poseen actividad antimicrobiana y promotor del crecimiento de bifidobacterias; el fragmento f(184-210) de β -caseína proveniente de leche humana hidrolizada con proteinasa posee actividad antimicrobiana; los fragmentos f(18-24), f(30-32) y f(139-146) de K-caseína provenientes de caseína bovina hidrolizada con pepsina posee actividad antimicrobiana; el fragmento f(17-41/42) de Lactoferrina (LF) provenientes de leche bovina hidrolizada con pepsina y quimosina posee actividad antibacteriana, antitumoral y antiinflamatoria; los fragmentos f(1-5) , f(17-31)S-S(109-114), f(61-68)S-S(75-80) de α -lactoalbumina proveniente de leche bovina hidrolizada con quimotripsina poseen actividad antimicrobiana y los fragmentos f(15-20), f(25-40), f(78-83) y f(92-100) de β -lactoglobulina poseen actividad antimicrobiana. **(Fonseca y col; 2009)**.

En la tabla 7 se muestran porcentajes de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática.

Tabla 7. % de Inhibición de peroxidación lipídica *in vitro* de caseínas modificadas con hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática de diferentes leches comerciales del Ecuador.

		% TBARS			
concentraciones (mg/ml)		0,020	0,040	0,100	0,200
BHT (control +)		69,492±0,266	74,576±0,461	77,966±0,705	78,719±0,266
Hidrólisis enzimática	leche 1 (Leche entera si tratar)	33,333±2,397	44,256±0,266	51,601±1,332	55,556±0,267
	leche 2 (Leche Zuuu)	14,878±0,960	21,469±0,461	26,554±0,923	30,885±0,961
	leche 3 (Leche Alpina)	18,832±0,705	24,482±1,483	29,379±1,663	36,723±1,220
	leche 4 (Vita Leche)	19,774±0,705	25,989±1,663	30,697±0,705	37,853±0,461
	leche 5 (Leche La Finca)	25,424±0,461	32,203±0,461	35,970±0,705	40,678±1,845
Temperatura más hidrólisis enzimática	leche 1 (Leche entera si tratar)	45,009±0,533	50,094±0,533	53,484±0,533	58,004±0,266
	leche 2 (Leche Zuuu)	19,209±0,923	25,800±0,266	32,203±0,461	37,665±0,266
	leche 3 (Leche Alpina)	24,482±0,705	30,885±0,266	38,041±1,161	42,373±0,461
	leche 4 (Vita Leche)	25,424±0,461	31,262±0,705	39,736±0,705	46,516±0,960
	leche 5 (Leche La Finca)	31,638±0,461	35,028±0,923	42,750±0,266	46,704±1,864

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

En esta determinación se utilizó Butil hidroxitolueno (BHT) como control positivo, este aditivo es un antioxidante sintético, procedente de la industria petrolera, ampliamente usado en la industria alimentaria. Este compuesto fue ensayado a distintas concentraciones 0,020; 0,040; 0,100; y 0,200 mg/mL encontrándose porcentajes altos de inhibición de peroxidación lipídica usando el método de TBARS con valores entre 69,492% y 78,719%. Además se observó que el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica fue directamente proporcional a las concentraciones ensayadas por ejemplo, a una concentración de 0,200 mg/mL se obtuvo la mayor actividad con 78,719%.

Las caseínas lácteas procedentes de la leche entera sin tratar y leches comerciales fueron sometidas a un proceso de hidrólisis enzimática con pepsina durante 3 horas a 37°C, y se encontró que los hidrolizados de caseínas (CN) de leche entera sin tratar presentaron valores altos de % de inhibición de peroxidación lipídica con el método de TBARS con valores entre 33,333% y 55,556%, también se observó una dosis dependencia, es decir, a mayor concentración mayor actividad antioxidante. La leche entera presentó los valores más altos de inhibición de peroxidación lipídica al ser comparada con los valores de porcentaje inhibición de peroxidación lipídica de las leches comerciales pero a la vez fue más bajo que el control positivo (BHT). La leche de la marca La Finca en comparación a las otras marcas presentó el valor más alto de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica con valores entre 25,424% y 40,678% presentando también una dosis dependencia.

En la Tabla 7 también se puede observar que las caseínas modificadas con temperatura más hidrólisis enzimática dan un porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica más alto que las caseínas modificadas solo con hidrólisis enzimática, ya que estas proteínas al ser sometidas a un tratamiento térmico antes de la hidrólisis enzimática estimula más la formación de compuestos bioactivos como los péptidos antioxidantes. Según **Korhonen y Pihlanto (2003)** estos péptidos contienen una secuencia de 5 a 11 aminoácidos hidrófobos que incluyen prolina, histidina, tirosina o triptófano en la secuencia que son ampliamente distribuidos entre las caseínas. Los valores de % de

inhibición de peroxidación lipídica aplicando un tratamiento térmico antes de la hidrólisis enzimática fueron los siguientes: en la leche entera sin tratar van de 45,009% a 58,004%, por otra parte las diferentes marcas de leche también presentaron un incremento en su % de inhibición de peroxidación lipídica al ser sometidas a un tratamiento térmico antes de ser hidrolizadas por ejemplo la leche de la marca La Finca posee valores que van de 31,638% a 46,704% teniendo también una dosis dependencia al igual que todas las leches analizadas.

La Leche y los productos lácteos, más allá del aspecto nutricional, son fuente importante de compuestos con actividades biológicas (actividad antioxidante) como las caseínas y proteínas de suero una vez que hayan sido liberados por hidrólisis enzimática *in vitro* y/o digestión gastrointestinal *in vivo* (Clare, 2000), la actividad antioxidante que se obtuvo de los péptidos bioactivos también está relacionada con la composición y secuencia de los aminoácidos presentes.

4.4.2. % de inhibición de peroxidación lipídica proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática

Tabla 5. Inhibición de peroxidación lipídica *in vitro* de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática de diferentes leches comerciales del Ecuador.

		% TBARS			
concentraciones (mg/ml)		0,020	0,040	0,100	0,200
Control		69,492±0,266	74,576±0,461	77,966±0,705	78,719±0,266
Hidrólisis enzimática	leche 1 (Leche entera si tratar)	18,079±0,923	25,235±0,705	28,437±1,483	34,840±0,705
	leche 2 (Leche Zuuu)	10,734±0,461	18,079±0,461	21,092±0,960	29,190±5,347
	leche 3 (Leche Alpina)	12,429±1,220	19,774±0,461	22,787±0,705	30,508±0,461
	leche 4 (Vita Leche)	13,371±1,065	21,092±0,960	25,235±0,705	27,495±0,266
	leche 5 (Leche La Finca)	14,313±0,266	19,774±0,461	25,235±0,705	30,885±0,266
Temperatura más hidrólisis enzimática	leche 1 (Leche entera si tratar)	26,930±0,705	29,002±0,705	33,522±0,705	40,866±0,266
	leche 2 (Leche Zuuu)	14,124±0,461	19,209±1,384	26,365±1,483	31,638±0,799
	leche 3 (Leche Alpina)	17,514±0,461	21,469±0,461	26,365±0,960	34,275±1,921
	leche 4 (Vita Leche)	18,832±0,705	23,164±2,011	28,437±0,960	34,087±0,705
	leche 5 (Leche La Finca)	20,904±1,220	25,424±0,461	29,567±1,161	34,087±0,705

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Al igual que las caseínas lácteas en la Tabla 8 se puede observar que las proteínas de suero procedentes de la leche entera sin tratar y leches comerciales fueron sometidas a un proceso de hidrólisis enzimática con pepsina durante 3 horas a 37°C, y se encontró que los hidrolizados de proteínas de suero de la leche entera sin tratar presentaron valores menores que los valores de caseínas lácteas del porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica con el método de TBARS con valores entre 18,079% a 34,719% también se observó una dosis dependencia, es decir, a mayor concentración mayor actividad antioxidante. La leche entera presentó los valores más altos de inhibición de peroxidación lipídica al ser comparada con los valores de porcentaje inhibición de peroxidación lipídica de las leches comerciales pero a la vez fue más bajo que el control positivo (BHT), la leche de la marca La Finca en relación a las otras marcas presentó el valor más alto de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica con valores entre 14,313% a 30,885% presentando también una dosis dependencia.

Las proteínas de suero al ser sometidas primero a un tratamiento térmico antes de ser hidrolizadas con pepsina al igual que las caseínas lácteas aumentaron su porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica por ejemplo la leche entera obtuvo valores más altos que van de 26,930% a 40,886%. De las leches comerciales estudiadas la que presentó el valor de actividad antioxidante más alto fue la leche La Finca con valores que van de 20,904% a 34,087%.

4.5. Análisis de varianza ANOVA para las diferentes caseínas lácteas de diferentes leches comerciales del Ecuador modificadas con hidrólisis enzimática y temperatura más hidrolisis enzimática

4.5.1. Análisis de varianza para la concentración de 0,02 mg/ml de caseínas con sus diferentes tratamientos aplicados (hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%TBARS	12	0,99	0,98	8,01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3855,90	6	642,65	91,46	0,0001
tipos de leche	3762,27	5	752,45	107,08	<0,0001
tratamientos	93,64	1	93,64	13,33	0,0147
Error	35,13	5	7,03		
Total	3891,04	11			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=6,81418

Error: 7,0269 gl: 5

tipos de leche	Medias	n	E.E.	
BHT	69,49	2	1,87	A
leche 1	39,17	2	1,87	B
leche 5	28,53	2	1,87	C
leche 4	22,60	2	1,87	C D
leche 3	21,66	2	1,87	D
leche 2	17,04	2	1,87	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,93417

Error: 7,0269 gl: 5

tratamientos	Medias	n	E.E.	
2,00	35,88	6	1,08	A
1,00	30,29	6	1,08	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 4. Tabla de análisis de varianza ANOVA para el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica, y Test LSD Fisher para las diferentes leches comerciales del Ecuador y tratamientos a una concentración de 0,02 mg/mL de caseína modificada.

En la Figura 4 se puede observar que en el Test LSD Fisher para los diferentes tipos de leche el valor de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de la leche 1 es diferente a las demás y es el más alto, en cambio la leche 5 y leche 4 no son significativamente diferentes, por otra parte la leche 4, leche 3 y leche 2 no son significativamente diferentes.

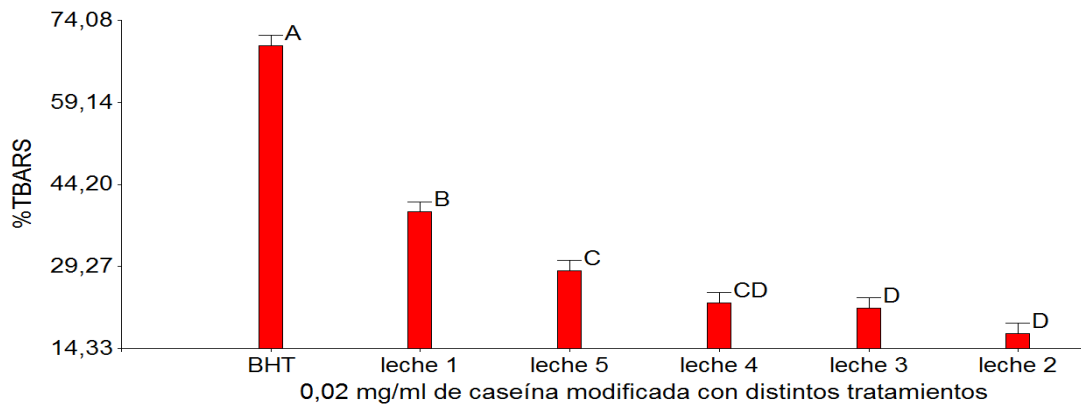


Figura 5. Media de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica y SD: \pm desviación estándar de las diferentes caseínas modificadas con distintos tratamientos de leches comerciales del Ecuador a una concentración de 0,02mg/mL.

4.5.2. Análisis de varianza para la concentración de 0,04 mg/mL de caseínas con sus diferentes tratamientos aplicados (hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%TBARS	12	1,00	0,99	4,28

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3716,68	6	619,45	219,75	<0,0001
tratamientos	50,72	1	50,72	17,99	0,0082
tipos de leche	3665,96	5	733,19	260,10	<0,0001
Error	14,09	5	2,82		
Total	3730,77	11			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,49177

Error: 2,8189 gl: 5

tratamientos Medias n E.E.

2,00	41,27	6	0,69	A
1,00	37,16	6	0,69	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=4,31586

Error: 2,8189 gl: 5

tipos de leche Medias n E.E.

BHT	74,58	2	1,19	A
leche 1	47,18	2	1,19	B
leche 5	33,62	2	1,19	C
leche 4	28,63	2	1,19	D
leche 3	27,68	2	1,19	D E
leche 2	23,63	2	1,19	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 6. Tabla de análisis de varianza ANOVA para el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica, y Test LSD Fisher para las diferentes

leches comerciales del Ecuador y tratamientos a una concentración de 0,04 mg/mL de caseína modificada.

En la Figura 6 se puede observar que el Test LSD Fisher para los diferentes tipos de leche que, los valores de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de la leche 1 es el más alto y al igual que la leche 5 son diferentes a las demás, por otra parte la leche 4 y leche 3 no son significativamente diferentes, a la vez la leche 3 y la leche 2 no son significativamente diferentes.

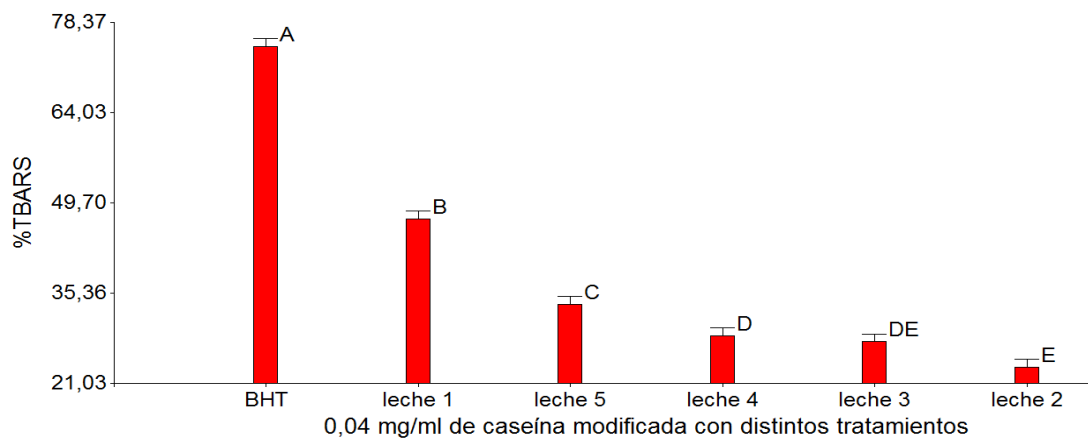


Figura 7. Media de porcentaje de inhibición de peroxidación y SD: \pm desviación estándar de las diferentes caseínas modificadas con distintos tratamientos de leches comerciales del Ecuador a una concentración de 0,04mg/mL.

4.5.3. Análisis de varianza para la concentración de 0,1 mg/ml de caseínas con sus diferentes tratamientos aplicados (hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%TBARS	12	0,99	0,97	6,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3329,24	6	554,87	61,18	0,0002
tipos de leche	3229,18	5	645,84	71,21	0,0001
tratamientos	100,05	1	100,05	11,03	0,0210
Error	45,35	5	9,07		
Total	3374,58	11			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=7,74135

Error: 9,0692 gl: 5

tipos de leche	Medias	n	E.E.	
BHT	77,97	2	2,13	A
leche 1	52,54	2	2,13	B
leche 5	39,36	2	2,13	C
leche 4	35,22	2	2,13	C D
leche 3	35,03	2	2,13	C D
leche 2	29,38	2	2,13	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=4,46947

Error: 9,0692 gl: 5

tratamientos	Medias	n	E.E.	
2,00	47,80	6	1,23	A
1,00	42,03	6	1,23	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Figura 8. Tabla de análisis de varianza ANOVA para el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica, y Test LSD Fisher para las diferentes leches comerciales del Ecuador y tratamientos a una concentración de 0,10 mg/mL de caseína modificada.

En la Figura 8 se puede observar que el Test LSD Fisher para los diferentes tipos de leche, los valores de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de la leche 1 es diferente a las demás y el más alto, en cambio las leches 5, 4, 3 no son significativamente diferentes, por otra parte las leches 4, 3, 2 no son significativamente diferentes.

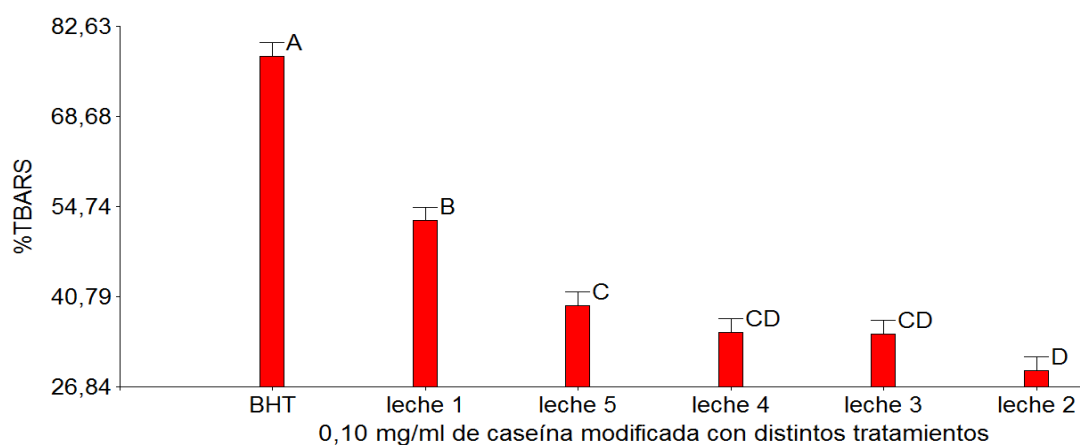


Figura 9. Media de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica y SD: \pm desviación estándar de las diferentes caseínas modificadas con distintos tratamientos de leches comerciales del Ecuador a una concentración de 0,10 mg/mL.

4.5.4. Análisis de varianza para la concentración de 0,20 mg/ml de caseínas con sus diferentes tratamientos aplicados (hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%TBARS	12	0,99	0,98	4,52

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2721,47	6	453,58	91,55	0,0001
tipos de leche	2648,62	5	529,72	106,92	<0,0001
tratamientos	72,85	1	72,85	14,70	0,0122
Error	24,77	5	4,95		
Total	2746,24	11			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=5,72164

Error: 4,9543 gl: 5

tipos de leche	Medias	n	E.E.		
BHT	78,72	2	1,57	A	
leche 1	56,78	2	1,57	B	
leche 5	43,69	2	1,57	C	
leche 4	42,18	2	1,57	C	
leche 3	39,55	2	1,57	C	D
leche 2	34,28	2	1,57	D	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,30339

Error: 4,9543 gl: 5

tratamientos	Medias	n	E.E.	
2,00	51,66	6	0,91	A
1,00	46,74	6	0,91	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 10. Tabla de análisis de varianza ANOVA para el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica, y Test LSD Fisher para las diferentes leches comerciales del Ecuador y tratamientos a una concentración de 0,20 mg/mL de caseína modificada.

En la Figura 10 se puede observar que el Test LSD Fisher para los diferentes tipos de leche, que el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de la leche 1 es diferente y el más alto que las demás leches, por otra parte las leches 5, 4, 3 no son significativamente diferentes, en cambio los valores de las leches 3 y 2 no son significativamente diferentes.

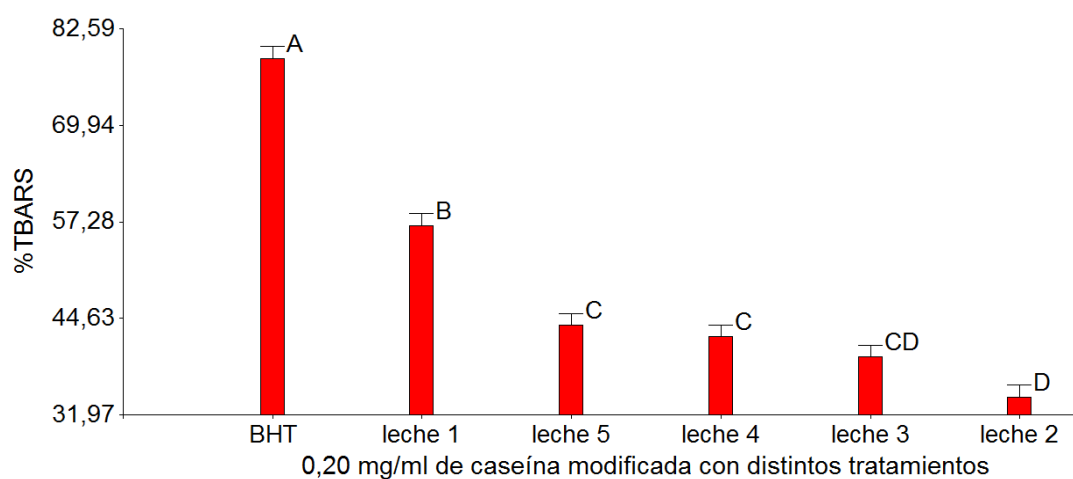


Figura 11. Media de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica y SD: \pm desviación estándar de las diferentes caseínas modificadas con distintos tratamientos de leches comerciales del Ecuador a una concentración de 0,20 mg/mL.

En las Figuras 4, 6, 8 y 10 en el Test LSD Fisher para los diferentes tratamientos, no son significativamente diferentes.

4.6. Análisis de varianza ANOVA para las diferentes proteínas de suero de diferentes leches comerciales del Ecuador modificadas con hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática

4.6.1. Análisis de varianza para la concentración de 0,02 mg/ml de proteínas de suero con sus tratamientos (hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%TBARS	12	1,00	0,99	8,32

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4825,07	6	804,18	178,28	<0,0001
tipos de leche	4753,15	5	950,63	210,74	<0,0001
tratamientos	71,92	1	71,92	15,94	0,0104
Error	22,55	5	4,51		
Total	4847,63	11			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=5,45962

Error: 4,5109 gl: 5

tipos de leche	Medias	n	E.E.	
BHT	69,49	2	1,50	A
leche 1	22,50	2	1,50	B
leche 5	17,61	2	1,50	B C
leche 4	16,10	2	1,50	C
leche 3	14,97	2	1,50	C
leche 2	12,43	2	1,50	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,15211

Error: 4,5109 gl: 5

tratamientos	Medias	n	E.E.	
2,00	27,97	6	0,87	A
1,00	23,07	6	0,87	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 12. Tabla de análisis de varianza ANOVA para el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica, y Test LSD Fisher para las diferentes leches comerciales del Ecuador y tratamientos a una concentración de 0,02 mg/mL de proteínas de suero modificadas.

En la Figura 12 se puede observar que el Test LSD Fisher para los diferentes tipos de leche, que el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero de la leche 1 es mayor que las demás pero posee una leve similitud con la leche 5, por otra parte las leches 5, 4, 3 y 2 posee valores menores pero tienen similitud entre ellas.

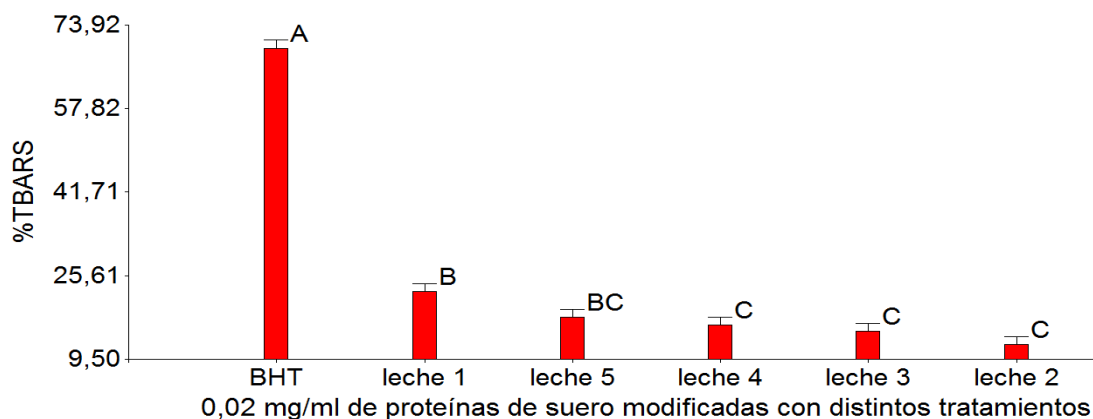


Figura 13. Media de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica y SD: \pm desviación estándar de las diferentes proteínas de suero modificadas con distintos tratamientos de leches comerciales del Ecuador a una concentración de 0,02 mg/mL.

4.6.2. Análisis de varianza para la concentración de 0,04 mg/ml de proteínas de suero con sus tratamientos (hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%TBARS	12	1,00	1,00	4,62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4664,26	6	777,38	380,93	<0,0001
tipos de leche	4647,18	5	929,44	455,44	<0,0001
tratamientos	17,07	1	17,07	8,37	0,0341
Error	10,20	5	2,04		
Total	4674,46	11			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,67220

Error: 2,0407 gl: 5

tipos de leche	Medias	n	E.E.	
BHT	74,58	2	1,01	A
leche 1	27,12	2	1,01	B
leche 5	22,60	2	1,01	C
leche 4	22,13	2	1,01	C D
leche 3	20,62	2	1,01	C D
leche 2	18,64	2	1,01	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,12014

Error: 2,0407 gl: 5

tratamientos	Medias	n	E.E.	
2,00	32,14	6	0,58	A
1,00	29,76	6	0,58	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 14. Tabla de análisis de varianza ANOVA para el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica, y Test LSD Fisher para las diferentes

leches comerciales del Ecuador y tratamientos a una concentración de 0,04 mg/mL de proteínas de suero modificadas.

En la figura 14 se puede observar que el Test LSD Fisher para los diferentes tipos de leche, que el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero de la leche 1 es diferente y mayor que las demás, en cambio las leches 5, 4 y 3 no son significativamente diferentes, por otra parte las leches 4, 3 y 2 no son significativamente diferentes.

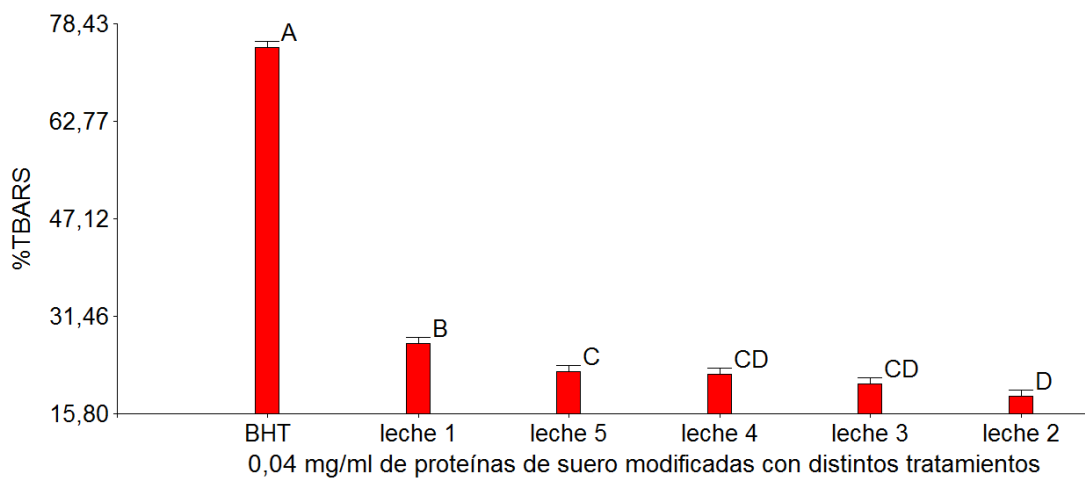


Figura 15. Media de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica y SD: \pm desviación estándar de las diferentes proteínas de suero modificadas con distintos tratamientos de leches comerciales del Ecuador a una concentración de 0,04 mg/mL.

4.6.3. Análisis de varianza para la concentración de 0,10 mg/ml de proteínas de suero con sus tratamientos (hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
§TBARS	12	1,00	1,00	3,88

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4482,36	6	747,06	400,44	<0,0001
tipos de leche	4443,95	5	888,79	476,41	<0,0001
tratamientos	38,41	1	38,41	20,59	0,0062
Error	9,33	5	1,87		
Total	4491,69	11			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,51108

Error: 1,8656 gl: 5

tipos de leche	Medias	n	E.E.	
BHT	77,97	2	0,97	A
leche 1	30,98	2	0,97	B
leche 5	27,40	2	0,97	C
leche 4	26,84	2	0,97	C D
leche 3	24,58	2	0,97	C D
leche 2	23,73	2	0,97	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,02713

Error: 1,8656 gl: 5

tratamientos	Medias	n	E.E.	
2,00	37,04	6	0,56	A
1,00	33,46	6	0,56	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 16. Tabla de análisis de varianza ANOVA para el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica, y Test LSD Fisher para las diferentes leches comerciales del Ecuador y tratamientos a una concentración de 0,10 mg/mL de proteínas de suero modificadas.

En la Figura 16 se puede observar que el Test LSD Fisher para los diferentes tipos de leche, que el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero de la leche 1 es diferente y mayor que las demás, en cambio las leches 5, 4 y 3 no son significativamente diferentes, por otra parte la leches 4, 3 y 2 no son significativamente diferentes.

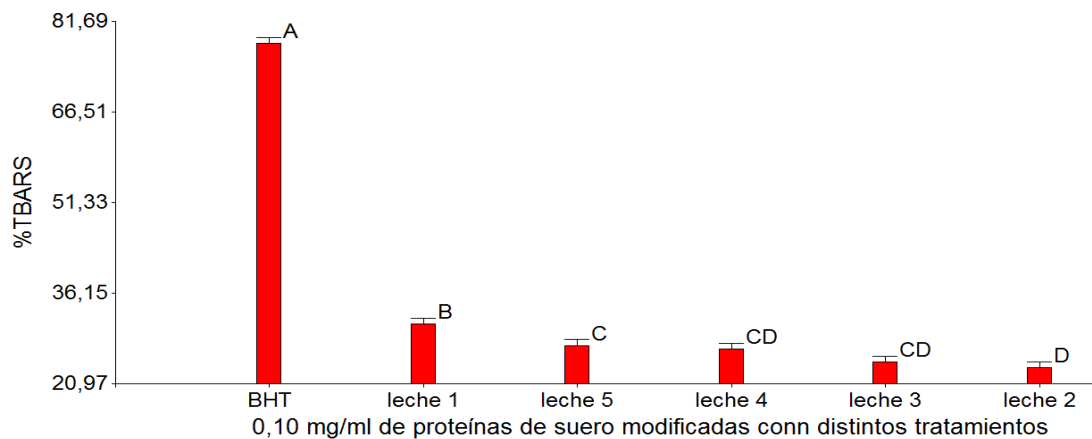


Figura 17. Media de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica y SD: \pm desviación estándar de las diferentes proteínas de suero modificadas con distintos tratamientos de leches comerciales del Ecuador a una concentración de 0,10 mg/mL.

4.6.4. Análisis de varianza para la concentración de 0,20 mg/ml de proteínas de suero con sus tratamientos (hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%TBARS	12	1,00	0,99	4,23

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3627,75	6	604,62	206,50	<0,0001
tipos de leche	3587,29	5	717,46	245,04	<0,0001
tratamientos	40,46	1	40,46	13,82	0,0137
Error	14,64	5	2,93		
Total	3642,39	11			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=4,39858

Error: 2,9279 gl: 5

tipos de leche	Medias	n	E.E.	
BHT	78,72	2	1,21	A
leche 1	37,85	2	1,21	B
leche 5	32,49	2	1,21	C
leche 3	32,39	2	1,21	C
leche 4	30,79	2	1,21	C
leche 2	30,41	2	1,21	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,53952

Error: 2,9279 gl: 5

tratamientos	Medias	n	E.E.	
2,00	42,28	6	0,70	A
1,00	38,61	6	0,70	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 18. Tabla de análisis de varianza ANOVA para el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica, y Test LSD Fisher para las diferentes

leches comerciales del Ecuador y tratamientos a una concentración de 0,20 mg/mL de proteínas de suero modificadas.

En la figura 18 se puede observar que el Test LSD Fisher para los diferentes tipos de leche, que el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero de la leche 1 es diferente y mayor que las demás, en cambio las leches 5, 4, 3 y 2 no son significativamente diferentes.

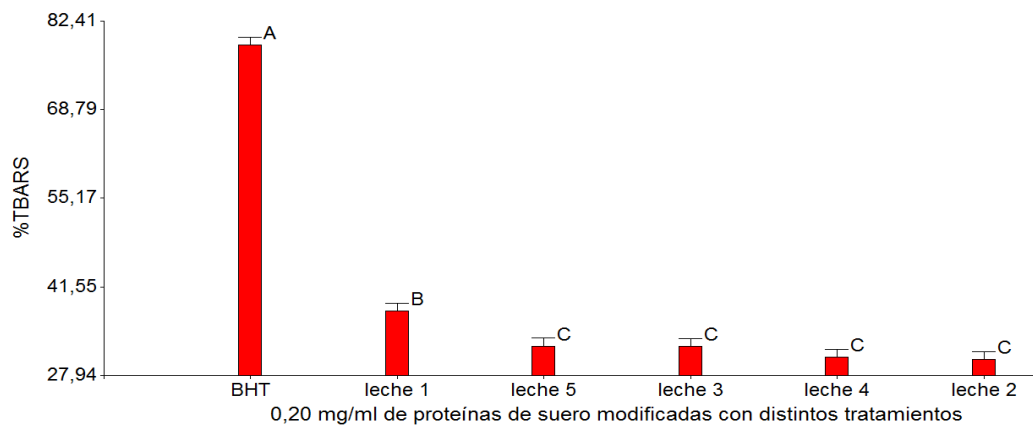


Figura 19. Media de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica y SD: \pm desviación estándar de las diferentes proteínas de suero modificadas con distintos tratamientos de leches comerciales del Ecuador a una concentración de 0,20 mg/mL.

La figura 12, 14, 16 y 18 en el Test LSD Fisher para los tratamientos muestra que, no poseen diferencia significativa, es decir, que a las proteínas de suero al someterlas a un tratamiento térmico antes de la hidrólisis enzimática aumenta su porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica pero en menor cantidad que las caseínas lácteas sometidas a los mismos tratamientos.

4.7. Verificación de hipótesis

El análisis de varianza realizado a la variable de respuesta % de inhibición de peroxidación lipídica en mantequilla mostró que, a un nivel de confianza del 95 %, la Hidrólisis enzimática, Temperatura mas hidrólisis enzimática y la marca de leche del Ecuador no muestran diferencia significativa, en el % de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas.

El análisis de varianza realizado a la variable de respuesta % de inhibición de peroxidación lipídica en mantequilla mostró que, a un nivel de confianza del 95 %, la Hidrólisis enzimática, Temperatura mas hidrólisis enzimática y la marca de leche del Ecuador no muestran diferencia significativa, en el % de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas lácteas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y analizados se rechaza la hipótesis alternativa, según la cual, la Hidrólisis enzimática, Temperatura mas hidrólisis enzimática y la marca de leche del Ecuador afectan significativamente en el % de inhibición de la peroxidación lipídica en mantequilla.

CAPITULO V

5.1. Conclusiones

- Se determinó el contenido proteico de diferentes leches comerciales y una no comercial (leche entera sin tratar) del Ecuador, mediante la obtención de aislados proteicos de caseínas lácteas y proteínas de suero, a continuación obtuvo su rendimiento mediante su peso en base seca, obteniendo los siguientes resultados, la leche entera sin tratar presentó un mayor contenido de caseínas láctea y proteínas de suero, seguido de la leche comercial La Finca, Vita Leche, Leche Alpina y Leche Zuuu.
- Se aisló y caracterizó las proteínas lácteas como caseínas y proteínas de suero en la leche entera sin tratar y leches comerciales, encontrando que todas las leches estudiadas presentaron en su composición α -CN, β -CN, y κ -CN pero en mayor cantidad la leche entera sin tratar. Por el contrario el contenido de estas proteínas en las leches comerciales presentan una variación una de la otra, en el contenido de proteínas de suero se identificó que solo la leche entera sin tratar contiene todas las proteínas séricas como son: α -lactoalbuminas (α LA), B-lactoglobulinas (β LG), inmunoglobulinas (GP-GL), seroalbuminas (SA) y Lactoferrina (LF), en el caso de las leches comerciales solo se encontraron dos de estas cinco proteínas como son: α -lactoalbuminas (α LA) y B-lactoglobulinas (β LG), concluyendo así que estas leches comerciales fueron sometidas a un proceso industrial no adecuado el cual produjo que estas proteínas estén ausentes en la composición final de las leches.
- Se potenció la actividad antioxidante de las caseínas lácteas y proteínas de suero bovinas mediante hidrólisis enzimática, y como resultado se obtuvo que las proteínas lácteas y proteínas de suero de la leche entera sin tratar poseen más % de inhibición de peroxidación lipídica que las leches comerciales pero menor valor al del control positivo (BHT). La leche comercial que más % de inhibición de peroxidación lipídica presentó fue la leche La Finca seguido de: Vita Leche, Leche Alpina y Leche Zuuu, entendiendo así que, la poca cantidad

de caseínas lácteas y ausencia de ciertas proteínas de suero por proceso industriales no adecuados influyen directamente en esta actividad biológica.

- Se incrementó la actividad antioxidante de las proteínas lácteas bovinas mediante la aplicación de un tratamiento térmico antes de ser hidrolizadas y se identificó que las caseínas lácteas y proteínas de suero al ser sometidas a un tratamiento térmico antes de ser hidrolizadas por enzimas, aumenta el % de inhibición de peroxidación lipídica en todas las proteínas lácteas de todas las leches estudiadas, concluyendo así que, si se somete a la leche a un tratamiento térmico adecuado puede ayudar a la formación de péptidos bioactivos con propiedades biológicas.

5.2. Recomendaciones

- Se sugiere que en la incubación de la mantequilla con los péptidos bioactivos durante 1 hora la temperatura de la mantequilla se aumente de 30°C a 40°C ya que la mantequilla a 30°C aún se encuentra en estado sólido.
- Se recomienda extender el estudio de las proteínas de leche bovina ya que en los últimos años, estas proteínas han sido una de las proteínas más estudiadas por sus múltiples actividades biológicas que presentan al ser sometidas a distintos tratamientos tecnológicos.
- Se recomienda que a la leche en general no se le dé un tratamiento térmico muy brusco o la adición de materias primas ajenas a la leche, los cuales produce una degradación de las proteínas y por ende escasa actividad biológica.
- Se sugiere a las autoridades competentes tener más control y vigilancia a las empresas distribuidoras de leche, en la recolección, procesamiento y distribución de la leche, ya que las leches estudiadas poseen valores mínimos de contenido de proteína y valores bajos a los recomendados por normas.
- Consumir alimentos de todo tipo que estén frescos y no procesados ya que, las empresas por aumentar sus ingresos adulteran sus productos.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias bibliográficas

- Abuja P, R. Albertini. (2001). Los metodos Para El Seguimiento de estrés oxidativo, la peroxidación de lípidos y Resistencia a la oxidación-De Las lipoproteínas. Clin. Chim. Acta, 306 pp. 1-17.
- Brandford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding Analytical Biochemistry, 72 248- 249.
- Calderón. A, García. F, Martínez. G. (2006). Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. Rev MVZ Córdoba. 2006; 11(1):1-16.
- Clare, D. A., & Swaisgood, H. E. (2000). Bioactive Milk Peptides: A Prospectus1. Journal of Dairy Science, 83(6), 1187-1195. doi: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74983-6](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74983-6).
- Cristóbal DD, K. Weiler. (2003). Proteínas y péptidos bioactivos a partir de las fuentes de Alimentos. Las Aplicaciones de Bioprocesos utilizados en el aislamiento y la Recuperación. Curr. Pharm. Des. pp. 1309-23.
- Delgado, C., M. Rosegrant, H. Steinfeld, S. Ehui & C. Courbois (1999). Livestock to 2020: The Next Food Revolution. Washington: IFPRI, Rome: FAO & Nairobi: ILRI.
- FitzGerald RJ, H. Meisel. (2003). Hidrolizados de Proteínas de la leche y péptidos bioactivos. Adv. Chem Dairy., pp. 675-698.
- FitzGerald RJ, BA Murray, DJ Walsh. (2004). Péptidos hipotensores de Proteínas de la leche. J. Nutr., 134, pp. 980-988.
- FitzGerald RJ, Murray BA. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. Int J Dairy Technol.59:118-25.
- Foltz. M, Meynen. E.E, Bianco. V, Van Platerink. C, Koning. T.M.M.G, Kloek. J, (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotripeptide-enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation J Nutr, 137, pp. 953–958.
- Fonseca. J, Isidra. R, A. Pilosof. (2009), funcionalidad de componentes lácteos, proyecto de investigación de subproductos lácteos. Pag (318-320).

- Gobbetti M, L. Stepaniak, M. De Angelis, A. Corsetti, R. DiCagno. (2002). Péptidos bioactivos latentes en Proteínas de la leche: la activation proteolítica y la Importancia en el Procesamiento de Productos Lácteos. Crit. Rev. Sci Food. Nutr., 42 pp. 223-239.
- Gobbetti M, F. Minervini, CG Rizzello. (2004). La angiotensina I enzima convertidora de inhibidor y péptidos bioactivos antimicrobianos. Int. J. Dairy Technol., 57, pp. 172-188.
- Gonzáles LIJ, Medina GAL. 2005. Determinación de cloruros en leche pasteurizada consumida en el estado de Mérida. Venezuela y su incidencia en el punto crioscopico. INHRR; 36(2): 2-17.
- Guzmán-Chozas M, Vicario I, Guillén-Sans R. Spectrophotometric profiles of off-flavor aldehydes by using their reactions with 2-thiobarbituric acid. J. Agric. Food Chem. 1997; 45(7): 2452-2457.
- Hata. Y, Yamamoto. M, Ohni. M, Nakajima. K, Nakamura. Y, Takano. T. (1996). Placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects Am J Clin Nutr, 64 , pp. 767–771.
- Huppertz. T, 2009. Enzymatic cross-linking of milk proteins: effects on structure, stability and functionality. International Dairy Journal. 2009: 442-442.
- Guyomar´H. F, Mahieux. O, Renan. M, Chatriot. M, Gamberre. V, Famelart. M,H. (2007). Changes in the acid gelation of milk as affected by heattreatment and alkaline pH conditions. Lait. 87:119-137.
- Halliwell B. (2000). La peroxidación lipídica, Antioxidantes y Las diseases Cardiovasculares. Cardiovasc. Res., 47 pp. 410-418.
- Halliwell B., M. Whiteman. (2004). Medición de Especies reactivas y el Daño oxidativo in vivo y en Cultivos celulares. Br. J. Pharmacol., 142, pp. 231-255.
- Herman, 2001 L. Herman Determinación del origen animal de alimentos crudos por PCR específico de la especie Journal of Dairy Research, 68 (03) (2001), pp. 429 a 436. Korhonen, A. Pihlanto. (2003). Alimentos Derivados de péptidos bioactivos. Oportunidades Para El diseño de Futuros Alimentos. Curr. Pharm. Des., 9, pp. 1397-08.

- INEN. (1984). Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 0016. Leche determinación de proteínas: Instituto Nacional Ecuatoriano de Normalización.
- Iwaniak. A, & Minkiewicz. P, (2007). Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. *Acta Scientiarum Technologia Alimentaria*. 6(3), 5-15.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003b). Bioactive peptides: Novel applications for milk proteins. *Applied Biotechnology, Food Science and Policy*, 1, 133–144
- Korhonen H, A. Pihlanto (2003). Food-derived bioactive peptides opportunities for designing future foods *Curr. Pharm.* pp. 1297–1308.
- Korhonen. H (2009). Milk-derived peptides: From science to applications *J Funct Foods*, 1 , pp. 177–187.
- Lahov, E., & Regelson, W. (1996). Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: Casecidin, isracidin peptides. *Food and Chemical Toxicology*, 34(1), 131-145. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915\(95\)00097-6](http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915(95)00097-6).
- Laemmli U. Cleavage of structural proteins during assembly of the heat bacteriophage T4. *Nature*. (1970) 227: 680-685.
- Madureina. A, R. Pereira, C.I. Pintado, M.E. Gomes, A.M.P. & Malcata, F.X, 2007. Bovine whey proteins – overview on the biological activities. *Food Research International*. 40:1197-1211.
- Magarinos H. (2000). *Naturaleza y características de la leche. Una guía para la pequeña y mediana empresa. Producción y Servicios Incorporados S.A. Mixco, Guatemala*, p 96.
- Mohanty DP, P. Tripathy, S. Mohapatra, DP Samantaray. (2014). Evaluación potencial bioactivo de Péptido antibacteriano Producido por *Lactobacillus* Aislado de la leche y de los Productos Lácteos. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* pp. 72-80.
- Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S., & Sahu, P. S. (2015). Milk derived bioactive peptides and their impact on human health. A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Doi.06-005.

- Nakano, T. y Ozimek, L. 1999. Determination of sialic acid by the thiobarbituric acid reaction in sweet whey and its fractions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 47: 2613-2616.
- O'Farrell, PH. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* (1975) 250: 4007-4021.
- Pinto, C. M.; Casadini, V. S.; Brito, C. C.; Molina, C. H. e Israel, A. L. 1991. Detección de sólidos totales de suero de quesería en leche pasteurizada y leche en polvo por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. *Alimentos*. 16:23-31.
- Poveda E, E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista chilena de nutrición*, 40, 397-403.
- Robert P.R., Zaloga G.P. (1994) Dietary bioactive peptides. *New Horizons*, 2:237-243
- Rojano B, Gavira A, Saez J,. (2008). Determinacion de la actividad antioxidante de un modelo de peroxidacion lipidica de mantequilla inhibida por el isopintanol. *Facultad de Química farmacéutica*,15,212-218.
- Reyes, J., Bon, F., Moreno, J., Rubio, C., & Valdivia, A. (2007). Pasteurized milk adulteration cheese whey in Aguascalientes city, México. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 2, 23-34.
- Schägger, H. (2006). Protocol: Tricine-SDS-PAGE, *Nat. Protoc.*: 1(1), 16 - 22.
- Secretaría de Salud. (1998). Ley General de Salud. Reglamento de la Ley General de Salud en materia de control sanitario, de actividades, establecimientos, productos y servicios. 15ª Ed. México: Porrúa, p. 173-238
- Yamamoto N, M. Ejiri, S. Mizuno. (2003). Péptidos biogénicas y su uso potencial *Curr. Pharm. Des.*, pp. 1345-55.
- Woolfe y Primrose, (2004) M. Woolfe, S. Primrose Forense alimentos: utilizando la tecnología del ADN para combatir la descripción errónea y el fraude *Tendencias en Biotecnología*, 22 (5) (2004), pp. 222-226.

Anexos

Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica para el control BHT, Caseínas lácteas y proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática y temperatura más hidrólisis enzimática.

Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas modificadas con hidrólisis enzimática

Tabla 6. Cálculo de *porcentaje* de inhibición de peroxidación lipídica del control BHT

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,054	0,053	0,054	69,492	70,056	69,492	69,492	0,266
0,040	0,047	0,044	0,043	73,446	75,141	75,706	74,576	0,960
0,100	0,039	0,036	0,043	77,966	79,661	75,706	77,966	1,620
0,200	0,038	0,039	0,038	78,531	77,966	78,531	78,343	0,266

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Tabla 7. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática de leche entera sin tratar

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,112	0,121	0,121	36,723	31,638	31,638	33,333	2,397
0,040	0,099	0,098	0,099	44,068	44,633	44,068	44,256	0,266
0,100	0,084	0,084	0,089	52,542	52,542	49,718	51,601	1,332
0,200	0,079	0,078	0,079	55,367	55,932	55,367	55,556	0,266

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Tabla 8. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Zuuu

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,153	0,149	0,150	13,559	15,819	15,254	14,878	0,960
0,040	0,140	0,139	0,138	20,904	21,469	22,034	21,469	0,461
0,100	0,130	0,128	0,132	26,554	27,684	25,424	26,554	0,923
0,200	0,123	0,124	0,120	30,508	29,944	32,203	30,885	0,960

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Tabla 9. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Alpina

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,145	0,144	0,142	18,079	18,644	19,774	18,832	0,705
0,040	0,130	0,135	0,136	26,554	23,729	23,164	24,482	1,483
0,100	0,129	0,124	0,122	27,119	29,944	31,073	29,379	1,663
0,200	0,115	0,111	0,110	35,028	37,288	37,853	36,723	1,220

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Tabla 10. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Vita Leche

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,139	0,138	0,141	21,469	22,034	20,339	21,281	0,705
0,040	0,130	0,128	0,135	26,554	27,684	23,729	25,989	1,663
0,100	0,121	0,123	0,124	31,638	30,508	29,944	30,697	0,705
0,200	0,111	0,109	0,110	37,288	38,418	37,853	37,853	0,461

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Tabla 11. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Leche LA Finca

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,131	0,132	0,133	25,989	25,424	24,859	25,424	0,461
0,040	0,121	0,120	0,119	31,638	32,203	32,768	32,203	0,461
0,100	0,115	0,113	0,112	35,028	36,158	36,723	35,970	0,705
0,200	0,101	0,105	0,109	42,938	40,678	38,418	40,678	1,845

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas modificadas con temperatura más hidrólisis enzimática

Tabla 12. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática de leche entera sin tratar

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,096	0,098	0,098	45,763	44,633	44,633	45,009	0,533
0,040	0,087	0,089	0,089	50,847	49,718	49,718	50,094	0,533
0,100	0,081	0,083	0,083	54,237	53,107	53,107	53,484	0,533
0,200	0,074	0,075	0,074	58,192	57,627	58,192	58,004	0,266

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Tabla 13. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Leche Zuuu

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,141	0,145	0,143	20,339	18,079	19,209	19,209	0,923
0,040	0,131	0,132	0,131	25,989	25,424	25,989	25,800	0,266
0,100	0,120	0,119	0,121	32,203	32,768	31,638	32,203	0,461
0,200	0,110	0,111	0,110	37,853	37,288	37,853	37,665	0,266

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Tabla 14. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Leche Alpina

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,135	0,134	0,132	23,729	24,294	25,424	24,482	0,705
0,040	0,123	0,122	0,122	30,508	31,073	31,073	30,885	0,266
0,100	0,110	0,112	0,107	37,853	36,723	39,548	38,041	1,161
0,200	0,101	0,103	0,102	42,938	41,808	42,373	42,373	0,461

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Tabla 15. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Vita Leche

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,132	0,133	0,131	25,424	24,859	25,989	25,424	0,461
0,040	0,120	0,123	0,122	32,203	30,508	31,073	31,262	0,705
0,100	0,107	0,105	0,108	39,548	40,678	38,983	39,736	0,705
0,200	0,093	0,097	0,094	47,458	45,198	46,893	46,516	0,960

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Tabla 16. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de caseínas lácteas modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Leche La Finca

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,120	0,121	0,122	32,203	31,638	31,073	31,638	0,461
0,040	0,117	0,115	0,113	33,898	35,028	36,158	35,028	0,923
0,100	0,101	0,101	0,102	42,938	42,938	42,373	42,750	0,266
0,200	0,090	0,098	0,095	49,153	44,633	46,328	46,704	1,864

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática

Tabla 17. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática de leche entera sin tratar

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,143	0,145	0,147	19,209	18,079	16,949	18,079	0,923
0,040	0,131	0,132	0,134	25,989	25,424	24,294	25,235	0,705
0,100	0,123	0,129	0,128	30,508	27,119	27,684	28,437	1,483
0,200	0,115	0,114	0,117	35,028	35,593	33,898	34,840	0,705

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Tabla 18. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Leche Zuuu

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,157	0,158	0,159	11,299	10,734	10,169	10,734	0,461
0,040	0,146	0,145	0,144	17,514	18,079	18,644	18,079	0,461
0,100	0,138	0,139	0,142	22,034	21,469	19,774	21,092	0,960
0,200	0,131	0,133	0,128	25,989	24,859	27,684	26,177	1,161

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Tabla 19. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Leche Alpina

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,153	0,158	0,154	13,559	10,734	12,994	12,429	1,220
0,040	0,142	0,141	0,143	19,774	20,339	19,209	19,774	0,461
0,100	0,135	0,137	0,138	23,729	22,599	22,034	22,787	0,705
0,200	0,124	0,123	0,122	29,944	30,508	31,073	30,508	0,461

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Tabla 20. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Vita Leche

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,156	0,152	0,152	11,864	14,124	14,124	13,371	1,065
0,040	0,142	0,138	0,139	19,774	22,034	21,469	21,092	0,960
0,100	0,134	0,132	0,131	24,294	25,424	25,989	25,235	0,705
0,200	0,128	0,128	0,129	27,684	27,684	27,119	27,495	0,266

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Tabla 21. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Leche La Finca

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,151	0,152	0,152	14,689	14,124	14,124	14,313	0,266
0,040	0,143	0,142	0,141	19,209	19,774	20,339	19,774	0,461
0,100	0,131	0,134	0,132	25,989	24,294	25,424	25,235	0,705
0,200	0,124	0,122	0,121	29,944	31,073	31,638	30,885	0,705

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con temperatura más hidrólisis enzimática

Tabla 22. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática de leche entera sin tratar

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,129	0,128	0,131	27,119	27,684	25,989	26,930	0,705
0,040	0,124	0,127	0,126	29,944	28,249	28,814	29,002	0,705
0,100	0,118	0,119	0,116	33,333	32,768	34,463	33,522	0,705
0,200	0,105	0,104	0,105	40,678	41,243	40,678	40,866	0,266

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Tabla 23. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Leche Zuuu

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,151	0,152	0,153	14,689	14,124	13,559	14,124	0,461
0,040	0,140	0,143	0,146	20,904	19,209	17,514	19,209	1,384
0,100	0,134	0,129	0,128	24,294	27,119	27,684	26,365	1,483
0,200	0,120	0,123	0,120	32,203	30,508	32,203	31,638	0,799

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Tabla 24. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Leche Alpina

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,145	0,146	0,147	18,079	17,514	16,949	17,514	0,461
0,040	0,140	0,139	0,138	20,904	21,469	22,034	21,469	0,461
0,100	0,131	0,132	0,128	25,989	25,424	27,684	26,365	0,960
0,200	0,121	0,115	0,113	31,638	35,028	36,158	34,275	1,921

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Tabla 25. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Vita Leche

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,145	0,144	0,142	18,079	18,644	19,774	18,832	0,705
0,040	0,139	0,131	0,138	21,469	25,989	22,034	23,164	2,011
0,100	0,125	0,129	0,126	29,379	27,119	28,814	28,437	0,960
0,200	0,117	0,115	0,118	33,898	35,028	33,333	34,087	0,705

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Tabla 26. Cálculo de porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de proteínas de suero modificadas con hidrólisis enzimática de la leche de marca Leche La Finca

Concentración (mg)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	TBARS 1	TBARS 2	TBARS 3	Promedio de TBARS	Desviación estándar
0,020	0,142	0,137	0,141	19,774	22,599	20,339	20,904	1,220
0,040	0,131	0,132	0,133	25,989	25,424	24,859	25,424	0,461
0,100	0,125	0,122	0,127	29,379	31,073	28,249	29,567	1,161
0,200	0,115	0,117	0,118	35,028	33,898	33,333	34,087	0,705

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Elaborado por: Xavier Guzmán

Protocolo de investigación

