

Detección de suero de quesería en leches ultrapasteurizadas mexicanas mediante la cuarta derivada del espectro de absorción

Rennet whey solids detection in Mexican ultrapasteurized milk using fourth derivative absorption spectrum

Acacia Ramírez Ayala* Salvador Vega y León* Guadalupe Prado Flores*
Rey Gutiérrez Tolentino* Cuauhtémoc Pérez González**

Abstract

Presence of rennet whey solids in ultrapasteurized milk (UHT) commercialized in Mexico City was determined using fourth derivative of absorption spectrum method, which allows to know the variation in whey protein/total protein ratio (WP/TP). The quantification of WP/TP ratio was used as an indicator of adulteration with rennet whey solids. The method was standardized to evaluate the accuracy, linearity and repeatability by rennet whey addition in concentrations between 0-15%, in raw milk. Thirty samples of skim ultrapasteurized milk were analyzed during September, October and November; found values were compared to the ones of raw milk added with rennet whey solids (0-15%, in levels of 2.5%). A marginal difference was found in the WP/TP ratio for the 0% concentration between the two types of milk, while the rest of the concentrations showed a high significance ($P < 0.01$). Values above 13.5% of WP/TP showed rennet whey solids addition; 36.7% of the UHT milk samples were between 5% and 12% positive to rennet whey solids addition. The results indicated that fourth derivative of the absorption spectrum of the WP/TP ratio was a sensitive indicator to rennet whey solids additions.

Key words: RENNETH WHEY, WHEY PROTEIN/TOTAL PROTEIN RATIO, FOURTH DERIVATIVE OF UV ABSORPTION SPECTRUM, UHT MILK, ADULTERATIONS.

Resumen

Se determinó la presencia de suero de quesería en leches ultrapasteurizadas (UHT) comercializadas en la Ciudad de México mediante el método de la cuarta derivada del espectro de absorción, el cual permite conocer la variación de la relación proteínas de suero/proteína total (PS/PT). La cuantificación de la relación PS/PT se utilizó como indicador de la adulteración con suero de quesería. El método fue estandarizado evaluando la exactitud, linealidad y repetibilidad mediante la adición de suero en concentraciones entre 0%-15% a leche cruda. Se analizaron 30 muestras de leche ultrapasteurizada descremada durante septiembre, octubre y noviembre; los valores encontrados se contrastaron con los de leche cruda adicionada con suero de quesería (0%-15%, en niveles de 2.5%). Se encontró una diferencia marginal en la relación PS/PT para la concentración 0% entre los dos tipos de leche, mientras que el resto de las concentraciones mostró una significancia alta ($P < 0.01$). Valores por encima de 13.5% de PS/PT expresaron adición de suero; 36.7% de las muestras de leche UHT fueron positivas a la adición de suero entre 5% y 12%. Los resultados indicaron que la cuarta derivada del espectro de absorción de la relación PS/PT fue un indicador sensible a adiciones de suero de quesería.

Palabras clave: SUERO DE QUESERÍA, RELACIÓN PROTEÍNAS DE SUERO/PROTEÍNAS TOTALES, CUARTA DERIVADA DEL ESPECTRO DE ABSORCIÓN UV, LECHE UHT, ADULTERACIONES.

Recibido el 13 de septiembre de 2006 y aceptado el 15 de noviembre de 2007.

*Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, 04960, México, D.F.

**Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, 04960, México, D. F.

Introduction

Technologies of concentration by membranes as well as ultrafiltration, that have been developed by the dairy industry, have made possible the elaboration of new products as whey protein concentrates, that may be used as modifiers in milk.^{1,2} In Mexico, importation of these concentrates has been growing in the past years; in 1996, 51 328 tons were imported, and by 2004, 66 816 tons of whey were reached with a value of 68 079 dollars. This product has been imported mainly from the United States and European Union³ (EU) with the aim of using it as a mean to lower costs and increase profitability in the production of “dairy products” of inferior quality and low prices.⁴

Milk as a processed product may reach the consumer in different presentations and in any of them, adulteration may exist with different purposes, one of them is to obtain better yield in the final product. Therefore, nowadays special attention has been given to detection of whey that can be added in a fraudulent way to fluid milk, specially ultrapasteurized milk, which consume has increased in Mexico and other countries.^{5,8}

The incorporation of solids from whey constitutes a clear violation to the current national and international regulations. In countries of the EU as well as in Latin America, the adulteration of fluid milk with rennet whey solids keeps growing,⁹ for this reason researches in this sense are still being done. Likewise, the presence of rennet whey in fluid milk represents a serious problem and causes economical loss in national producers as well as the industries that produce products from fresh milk. Likewise, it is a deception for consumers to offer them milk adulterated with whey at the same price of a product containing exclusively non grease solids coming from milk.

To detect milk adulterated with rennet whey several methods have been developed, that are differentiated by sensitivity and complexity of the analysis. Many of them only provide light indications, but not definite proof,^{10,11} like electrophoresis with denaturalizing agents, which is used in identification and quantification of dairy proteins, with the benefit of real estimative estimations; nevertheless, statistical rigor quantification requires greater resolution equipment, with automated programs, like capillary electrophoresis.

Among the current methods, measurement of spectroscopic response of the aromatic amino acids tryptophan (Trp) and tyrosine (Tyr) have been proposed, responsible of specific absorption signals at 274.5 and 278 nm, respectively. The analytic fundament of the method consists in the measurement of the ratio Trp/

Introducción

Tecnologías tanto de concentración por membranas como de ultrafiltración, que han sido desarrolladas por la industria láctea, han hecho posible la elaboración de nuevos productos como los concentrados de proteínas de suero, que pueden ser utilizados como adulterantes en la leche.^{1,2} En México, la importación de estos concentrados ha ido en aumento en los últimos años; en 1996 se importaron 51 328 toneladas, y para 2004 se alcanzaron 66 816 toneladas de lactosueros con valor de 68 079 dólares. Este producto se ha importado principalmente de Estados Unidos y de la Unión Europea³ (UE) con el fin de utilizarlo como medio para bajar costos y aumentar la rentabilidad en la elaboración de “productos lácteos” de menor calidad y bajos precios.⁴

La leche como producto procesado puede llegar al consumidor en diferentes presentaciones y en cualquiera de ellas puede existir adulteración con diversos propósitos, uno es la obtención de mayor rendimiento en el producto final. Por lo anterior, en la actualidad se ha dado atención especial a la detección de lactosueros que se pueden adicionar de forma fraudulenta a la leche fluida, en especial a la leche ultrapasteurizada, cuyo consumo ha aumentado en México y en otros países.⁵⁻⁸

La incorporación de sólidos procedentes de suero constituye una clara violación a la reglamentación vigente nacional e internacional. Tanto en países de la UE como en América Latina, la adulteración de leche fluida con suero de quesería va en aumento,⁹ por esta razón continúan realizándose investigaciones en este sentido. Asimismo, la presencia de agregados de suero de quesería en leche fluida representa un problema grave y causa pérdidas económicas tanto para los productores nacionales como para los industriales que elaboran sus productos a partir de leche fresca. Asimismo, es un engaño a los consumidores ofrecerles leche adulterada con suero a un precio tal como si se tratara de un producto que contiene exclusivamente sólidos no grasos provenientes de la leche.

Para detectar leche adulterada con suero de quesería se han desarrollado diversos métodos, que se diferencian por la sensibilidad y complejidad del análisis. Muchos de ellos proporcionan sólo ligeras indicaciones, pero no pruebas definitivas,^{10,11} como la electroforesis con agentes desnaturalizantes, que se emplea en la identificación y cuantificación de proteínas lácteas, con el beneficio de estimaciones cualitativas reales; sin embargo, la cuantificación con rigor estadístico requiere equipos de mayor resolución, con programas automatizados, como la electroforesis capilar.

Entre los métodos actuales se ha propuesto la medi-

Tyr of whey (0.59), which is different from the same ratio for the total protein of caseins (0.19). Therefore, such ratio gives notice of the natural proportion of aromatic amino acids present in milk or dairy products and, in its case, if it has been modified with fraudulent additions or by technological treatments.¹³ The partial proximity and superposition of the spectroscopic signals of Trp and Tyr can be resolved with the derivation models of the absorption spectrum and the selection of fourth derivative, since it expresses enough resolution at maximum and minimum absorption in the presence of the implementation of analytic equipment. In this way, the quotient between the minimum of Trp at 294 nm ($\delta^4A/\delta\lambda^4_{294nm}$) and the maximum correspondent to Trp and Tyr ($\delta^4A/\delta\lambda^4_{283nm}$) is lineally related with the content of whey proteins and caseins in mixtures that contain different proportion of the two protein types.

The Codex Committee of milk and dairy products has admitted the standardization of the protein content in powder milk, as long as protein ratio of whey/caseins is not affected by the standardization process; for that matter, only "retains" obtained by means of ultrafiltration from the milk that contains caseins and proteins of whey in the same ratio that the genuine milk can be used.¹⁴

Therefore, the aim of this work consisted in the application of a spectroscopic analytic method for the determination of the ratio whey protein/total protein (WP/TP), that allowed to establish a natural interval and would be capable of detecting possible fraudulent additions of whey in ultrapasteurized milk.

Material and methods

Samples

The N-acetyl tryptophana,* tyrosine and phenylalanine** esters were used as model compound models to study the UV absorption spectrum of the aromatic amino acids Trp and Tyr, with the aim to obtain an approximation to the chemical environment of these amino acid residues in milk proteins.

To establish the WP/TP ratio, samples of protein calibrate of whey in total protein at 5%, 10%, 15%, 20%, 25% and 30% were prepared, mixing a casein standard* in sodium hydroxide 0.1 M, pH 6.12 and a solution of bovine seroalbumin (SA), α -lactalbumin (α -La) and β -lactoglobulin (β -Lg) in 12:5:1 proportion, respectively.¹⁵

The exactitude of the UV-4th SD in the WP/TP ratio mainly depends on the availability of reference samples NISECAS 0, 15, 20, 25 and 100,** with WP/TP ratio of 0, 15, 20, 25 and 100%, respectively.

Thirty samples of ten brands of ultrapasteurized

ción de la respuesta espectroscópica de los aminoácidos aromáticos triptófano (Trp) y tirosina (Tyr), que son responsables de señales de absorción específica a 274.5 y 278 nm, respectivamente. El fundamento analítico del método consiste en la medición de la relación Trp/Tyr de las proteínas del suero (0.59), que es diferente de la misma relación para la proteína total de caseínas (0.19). Por lo tanto, dicha relación da cuenta de la proporción natural de los aminoácidos aromáticos presentes en la leche o productos lácteos y, en su caso, si ha sido modificada con adiciones fraudulentas o por tratamientos tecnológicos.¹³ La cercanía y superposición parcial de las señales espectroscópicas de Trp y Tyr pueden ser resueltas con los modelos de derivación de los espectros de absorbencia y la elección de la cuarta derivada, ya que expresa una resolución suficiente en los máximos y mínimos de absorbencia frente a la implementación en los equipos analíticos. De esta manera, el cociente entre el mínimo del Trp a 294 nm ($\delta^4A/\delta\lambda^4_{294nm}$) y el máximo correspondiente a Trp y Tyr ($\delta^4A/\delta\lambda^4_{283nm}$) está relacionado linealmente con el contenido de proteínas de suero y caseínas en mezclas que contienen diferente proporción de los dos tipos de proteína.

El Comité del Codex de leche y productos lácteos ha admitido la estandarización del contenido de proteína de la leche en polvo, siempre y cuando la relación proteínas de suero/caseínas no sea afectada por el procedimiento de estandarización; por tal motivo sólo pueden utilizarse "retenidos" obtenidos mediante la ultrafiltración de la leche que contenga caseínas y proteínas de suero en la misma relación que la leche genuina.¹⁴

Por ello, el objetivo de este trabajo consistió en la aplicación de un método analítico espectroscópico para la determinación de la relación proteína de suero/proteína total (PS/PT), que permitiera establecer un intervalo natural y fuera capaz de detectar posibles adiciones fraudulentas de suero en leche ultrapasteurizada.

Material y métodos

Muestras

Los N-acetil ésteres de triptófano,* tirosina y fenilalanina** se utilizaron como compuestos modelo para estudiar el espectro de absorción UV de los aminoácidos aromáticos Trp y Tyr, con el fin de obtener una aproximación al entorno químico de estos residuos aminoacídicos en las proteínas lácteas.

Para establecer la relación PS/PT se prepara-

*Aldrich, 857726, Estados Unidos de América.

**Sigma, Estados Unidos de América, A-6751 y A- 4251, respectivamente.

skimmed milk of best selling in Mexico City (three samples per brand) were obtained during September, October and November. Samplings were from different lots.

As negative control, authentic cow milk samples were used, collected during milking, in presence of the researcher. As positive control, mixtures of authentic fresh milk, added with whey commercially known as WPC-34 which protein content was between 34% and 36% were used.

Sample preparations

Ultrapasteurized skimmed milk samples, reference samples and calibrated mixtures (30 μL) were denaturalized with 6 M HCL-guanidine and 0.1 M, pH 6.12 sodium hydroxyde. The vials (5 mL) were put in an ultrasound bath during 20 minutes, and the absorption spectrum was immediately measured. All samples were analyzed by duplicate. The absolute values $\delta^4 A / \delta \lambda^4$ at the corresponding wavelengths at different selected maximums and minimums were registered.

Measurement conditions of derivative of UV absorption spectrum

For the conditions of derivative of UV absorption spectrum and sample preparation, the studies of Meisel¹² and Mirelles *et al.*¹⁵ were taken as reference with slight differences in absorption response. The absorption spectra of the reference samples and of UHT milk were registered and the fourth derivative between 250 and 310 nm, velocity of 1200 nm min⁻¹ was determined, using a spectrometer.***

Analytical characteristics of the method

Previous to the application of UV-4th SD for the determination of the WP/PT ratio in ultrapasteurized milk samples, standardization of the proposed method was performed. The linearity response by linear regression analysis, the repeatability with relative standard deviation and the reproducibility by means of the variation coefficient was estimated.

Quantification

The absolute values $\delta^4 A / \delta \lambda^4$ at the corresponding wavelengths at different maximums and minimums in the calibrated samples with percentages of WP/PT of 5%, 10%, 15%, 20%, 25% and 30% and the samples of NISECAS reference were registered. The coefficient $(\delta^4 A / \delta \lambda^4_{294\text{nm}}) / (\delta^4 A / \delta \lambda^4_{283\text{nm}}) \times 100$ was correlated with the ratio WP/PT, by means of linear regression analysis

ron muestras de calibrado de proteína de suero en proteína total al 5%, 10%, 15%, 20%, 25% y 30%, mezclando una solución de caseína estándar* en hidróxido de sodio 0.1 M, pH 6.12 y una solución de seroalbúmina bovina (SA), α -lactoalbúmina (α -La) y β -lactoglobulina (β -Lg) en la proporción 12:5:1, respectivamente.¹⁵

La exactitud de la UV-4 DS en la relación PS/PT depende en gran medida de la disponibilidad de muestras de referencia que tengan diferente relación, para lo cual se utilizaron las muestras NISECAS 0, 15, 20, 25 y 100,** con relación PS/PT de 0, 15, 20, 25 y 100%, respectivamente.

Se obtuvieron 30 muestras de diez marcas de leche ultrapasteurizada descremada de mayor venta en la Ciudad de México (tres muestras por marca), durante septiembre, octubre y noviembre. Las tomas de muestras fueron de lotes diferentes.

Como testigo negativo se usaron muestras de leche auténtica de vaca, recolectadas durante el ordeño, en presencia del investigador. Como testigo positivo se prepararon por sextuplicado, mezclas de leche fresca auténtica, adicionadas con suero de quesería denominado comercialmente WPC-34, cuyo contenido proteínico estuvo entre 34% y 36%.

Preparación de muestras

Las muestras de leche descremada ultrapasteurizada, muestras de referencia y mezclas de calibración (30 μL) se desnaturalizaron con HCl-guanidina 6 M e hidróxido de sodio 0.1 M, pH 6.12. Los viales (5 mL) se colocaron en un baño de ultrasonido durante 20 minutos, e inmediatamente se midió su espectro de absorción. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Se registraron los valores absolutos de $\delta^4 A / \delta \lambda^4$ a las longitudes de onda correspondientes a los diferentes máximos y mínimos seleccionados.

Condiciones de medición de la derivada del espectro de absorción en el UV

Para las condiciones de medición de la derivada del espectro de absorción en el UV y la preparación de muestras, se tomaron como referencia los estudios de Meisel¹² y Miralles *et al.*¹⁵ con diferencias menores de respuesta en las absorbencias. Los espectros de absorción de las muestras de referencia y de leche UHT se registraron y se determinó la cuarta derivada entre 250 y 310 nm, velocidad de 1 200 nm min⁻¹ empleando un espectrómetro.***

*Sigma, Estados Unidos de América.

**NIZO Food Research, Ede, Holanda.

***Beckman Du ®-600, Estados Unidos de América.

Statistical analysis

In order to obtain the equation of the straight of the calibration standard curve between the absolute values of the fourth derivative of the absorption spectrum at different wavelengths ($\delta^4A/\delta\lambda^4$), against whey protein ratio/total protein WP/TP of the calibration mixtures (5%-30%), a simple linear regression analysis was used. As dependant variable $\delta^4A/\delta\lambda^4$ was selected and WP/TP as independent variable.

The obtained results from the raw milk samples and UHT were submitted to a variance analysis of one factor, followed by Tukey test for comparison of the means of the WP/TP ratio in each milk type. To compare the mean quotient WP/TP with the variation of the different percentages of incorporation of whey among the two types of milk, Student's t test was used. The SPSS version 8.5 for Windows program was used.

Results

Compound model concentration and wavelength selection

The concentrations to be managed in the analytical determination taking into consideration the molar extinction coefficients of Trp and Tyr were explored, as well as the ratio between Trp/Tyr in milk corresponds to 0.59 and in whey to 0.19. The estimations of 0.105 mM for the Trp and 0.5 mM for Tyr were found and maximums and minimums in the fourth derivative of the absorption spectrum were obtained.

The zero order spectra presented an overlapping for the maximums of the N-acetyl-esters of Trp and Try, while the fourth derivative spectra showed separate signals for the peptides and aromatic amino acids.

The Tyr showed maximum absorbency at 276 nm, 283 nm and 293 nm, and minimums at 278 nm and 287 nm. The Trp showed maximum absorbency at 283 nm and 289 nm and minimums at 285 nm and 294 nm.

Figure 1 shows the spectrum superposition of the fourth derivative of an UHT milk sample and the compound model. The three maximums 276 nm (a), 283 nm (b) and 289 nm (c) and the three minimums at 278 nm (d), 287 nm (e) and 294 nm (f) that appear in the milk spectrum, correspond to the contribution of Try (a,d), of Trp (c,f) or both (b,e).

Analytical characteristics of the UV-4th SD method

To establish the linearity of absorbance compared with

Características analíticas del método

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

Cuantificación

Se registraron los valores absolutos $\delta^4A/\delta\lambda^4$ a las longitudes de onda correspondientes a los diferentes máximos y mínimos en las muestras de calibrado con porcentajes de PS/PT de 5%, 10%, 15%, 20%, 25% y 30% y las muestras de referencia NISECAS. El cociente $(\delta^4A/\delta\lambda^4_{294})/(\delta^4A/\delta\lambda^4_{283}) \times 100$ fue correlacionado con la relación de PS/PT, mediante un análisis de regresión lineal.

Análisis estadístico

Para obtener la ecuación de la recta de la curva estándar de calibración entre los valores absolutos de la cuarta derivada de los espectros de absorción a diferentes longitudes de onda ($\delta^4A/\delta\lambda^4$), contra la relación de proteínas del suero/proteína total (PS/PT) de las mezclas de calibración (5%-30%), se utilizó un análisis de regresión lineal simple. Se seleccionó como variable dependiente $\delta^4A/\delta\lambda^4$ y como variable independiente PS/PT.

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

Resultados

Concentración de compuestos modelo y selección de longitud de onda

Se exploraron las concentraciones a manejar en la determinación analítica tomando en cuenta los coeficientes de extinción molar del Trp y de la Tyr, así como la relación entre Trp/Tyr en la leche corresponde a 0.59 y en el suero a 0.19. Las estimaciones encontradas fueron 0.105 mM para el Trp y 0.5 mM para la Tyr y se obtuvieron los máximos y mínimos en la cuarta derivada del espectro de absorción.

different volumes of milk, volumes between 30 μL and 170 μL were taken; subsequently, 2 mL with NaOH 0.1 M, pH 6.12 and HCL-guanidine 6 M were completed, determining the fourth derivative of absorption spectrum at 283 and 294 nm. The ratio $(\delta^4 A / \delta \lambda^4_{294\text{nm}}) / (\delta^4 A / \delta \lambda^4_{283\text{nm}})$ was constantly kept with a volume of 30 μL , which allowed the use of less quantity of reactive in the studies described by Meisel¹² and Miralles *et al.*¹⁵

The exactness in the WP/TP ratio determination was obtained establishing a calibrated straight with the casein and whey protein samples with a WP/PT ratio of 5%, 10%, 15%, 20%, 25% and 30%.

The result of the simple regression analysis for WT/TP determination in the calibrated and NISE-CAS samples is shown in Table 1. The regression coefficient, the value of the slant and the independent variable represented by the quotient WP/TP are shown. The exactitude mean of the method, calculated as the quotient between the found value for the calibrating samples and theoretical value, was of 103.56%.

The repeatability of the method was performed in different days, by means of the calibration samples and

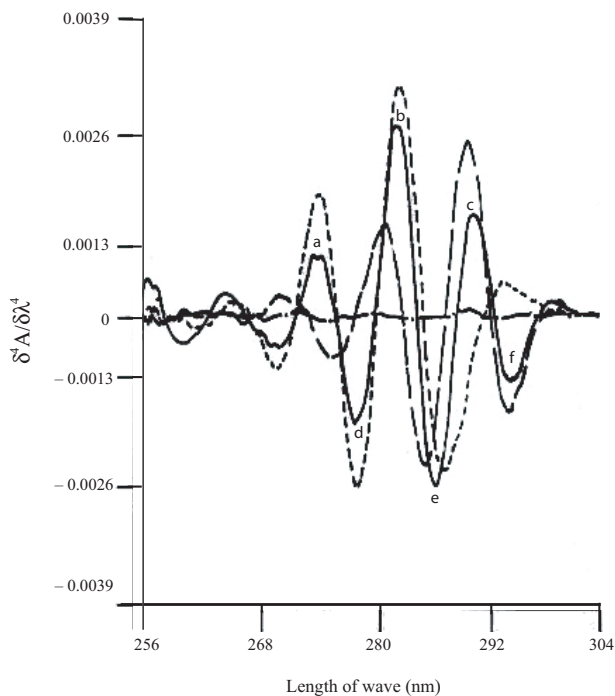


Figura 1: Espectros UV de la cuarta derivada de una muestra de leche UHT desnatada (—), de los N-acetil ésteres de Trp (0.105 mM) (---), Tyr (0.5 mM) (· · ·), y de Phe (1.05 mM) (- · - ·) que se usaron como compuestos modelo. Máximos a 276 nm (a), 283 nm (b), y 289 nm (c) y mínimos a 278 nm (d), 287 nm (e) y 294 nm (f).

Figure 1: UV spectra of the fourth derivative of UHT skimmed milk sample (—), of the N-acetyl esters of Trp (0.105 mM) (---), Tyr (0.5 mM) (· · ·), and of Phe (1.05 mM) (- · - ·) that were used as compound models. Maximums at 276 nm (a), 283 nm (b), and 289 nm (c) and minimums at 278 nm (d), 287 nm (e) and 294 nm (f).

Los espectros de orden cero presentaron un solapamiento para los máximos de los N-acetil-ésteres de Trp y Tyr, mientras que los espectros de la cuarta derivada mostraron señales separadas para los péptidos con aminoácidos aromáticos.

La Tyr presentó máximos de absorbencia a 276 nm, 283 nm y 293 nm, y mínimos a 278 nm y 287 nm. El Trp presentó máximos de absorbencia a 283 nm y 289 nm y mínimos a 285 nm y 294 nm.

La Figura 1 muestra la superposición del espectro de la cuarta derivada de una muestra de leche UHT y de los compuestos modelo. Los tres máximos 276 nm (a), 283 nm (b) y 289 nm (c) y los tres mínimos a 278 nm (d), 287 nm (e) y 294 nm (f) que aparecen en el espectro de la leche, corresponden a la contribución de la Tyr (a, d), del Trp (c, f) o de ambos (b, e).

Características analíticas del método de UV-4 DS

Para establecer la linealidad de la absorbencia frente a distintos volúmenes de leche, se tomaron volúmenes entre 30 μL y 170 μL , se completaron posteriormente hasta 2 mL con NaOH 0.1 M, pH 6.12 y HCl-guanidina 6 M, determinándose la cuarta derivada del espectro de absorción a 283 y 294 nm. La relación $(\delta^4 A / \delta \lambda^4_{294}) / (\delta^4 A / \delta \lambda^4_{283})$ se mantuvo constante con un volumen de 30 μL , lo que permitió utilizar menor cantidad de reactivos que en los estudios descritos por Meisel¹² y Miralles *et al.*¹⁵

La exactitud en la determinación de la relación PS/PT se obtuvo estableciendo una recta de calibrado con las muestras de caseína y proteínas de suero con una relación de PS/PT de 5%, 10%, 15%, 20%, 25% y 30%.

El resultado del análisis de regresión lineal simple para la determinación PS/PT en las muestras de calibrado y en las muestras NISECAS se aprecia en el Cuadro 1. Se muestra el coeficiente de regresión, el valor de la pendiente y la variable independiente representada por el cociente PS/PT. La exactitud media del método, calculada como el cociente entre el valor encontrado para las muestras de calibrado y su valor teórico, fue de 103.56%.

La repetibilidad del método se realizó en diferentes días, mediante el análisis de las mezclas de calibración y una muestra de leche ultrapasteurizada-descremada por sextuplicado. La repetibilidad del método expresada como la desviación estándar relativa (RSD) fue de 2.3%.

En el Cuadro 2 se presentan los resultados de la determinación cuantitativa de la relación PS/PT de muestras de leche cruda auténtica y UHT adicionales de suero de quesería, en proporciones de 2.5% al 15%.

Cuadro 1

ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL DE LA RELACIÓN PS/PT PRESENTE EN LAS MUESTRAS DE CALIBRADO Y EN LAS MUESTRAS NISECAS MODELO $Y_n = a + bx$
 LINEAR REGRESSION ANALYSIS OF THE WP/TP RATIO PRESENT IN CALIBRATED SAMPLES AND NISECAS SAMPLES MODEL $Y_n = a + bx$

<i>Samples</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	R^2
Calibrated samples (n = 20)	57.320	0.510	0.986
NISECAS samples (n = 20)	40.396	0.234	0.995

$Y_n = a + bx$; a: regression coefficient, b: slant, x: % PS/PT

Cuadro 2

VALORES MEDIOS Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE PS/PT MEDIANTE UV-4^a DS EN UNA MUESTRA DE LECHE UHT Y UNA MUESTRA DE LECHE CRUDA CON ADICIÓN DE SUERO WPC-34 ENTRE 2.5% Y 15% DE SUERO EN LECHE, EXPRESADO EN PROTEÍNA
 MEAN VALUES AND STANDARD DEVIATION OF WP/TP BY UV-4^a SD IN UHT MILK SAMPLE AND A RAW MILK SAMPLE WITH WHEY ADDITION WPC-34 BETWEEN 2.5% AND 15% OF WHEY IN MILK, PROTEIN EXPRESSED

<i>Whey addition (protein %)</i>	<i>WP/TP ratio (%)</i>			
	<i>Raw milk</i>		<i>UHTmilk</i>	
	<i>Mean</i>	<i>Stand dev</i>	<i>Mean</i>	<i>Stand dev</i>
0	12.4 ^a	± 1.06	14.4 ^b	± 1.69
2.5	13.5 ^{ab}	± 0.94	16.3 ^{ab}	± 0.73
5	14.4 ^{ab}	± 1.10	17.4 ^a	± 0.96
10	15.8 ^{bc}	± 1.19	18.9 ^{ac}	± 0.77
12.5	17.5 ^{cd}	± 0.83	20.1 ^c	± 0.91
15	19.1 ^d	± 1.81	23.5 ^d	± 1.87

n = 6

Different letters in same column indicate significant difference (P < 0.01)

Stand dev: Standard deviation

a sample of skimmed ultrapeaturized milk by sextuplet. The repeatability of the method expressed as the relative standard deviation (RSD) was of 2.3%.

Table 2 shows the results of the quantitative determination of the WP/TP ratio, from authentic raw milk and UHT samples with whey rennet added in proportions of 2.5% to 15%.

The increase observed in the WP/TP ratio was greater for UHT milk than for raw milk. Student's t test allowed to define a marginal difference between WP/TP ratio in 0% concentration between raw milk and UHT milk. For the rest of the concentrations a high significance was found (P < 0.01), which meant

El incremento observado en la relación PS/PT fue mayor para la leche UHT que para la leche cruda. La prueba t de Student permitió definir una diferencia marginal entre la relación PS/PT en la concentración a 0% entre la leche cruda y la leche UHT. Para el resto de las concentraciones se encontró una significancia alta (P < 0.01), lo que significó que valores por encima de 13.5% de PS/PT podrían ser indicativos de adición de suero a la leche, en un nivel de 5%.

Cuantificación de la relación de proteínas de suero/proteína total en leches UHT comerciales

En cuanto a las concentraciones de suero de quesería

Cuadro 3
PORCENTAJE DE SUERO EN POLVO DETECTADO EN MUESTRAS DE
LECHE ULTRAPASTEURIZADA COMERCIAL
PERCENTAGE OF WHEY POWDER DETECTED IN COMMERCIAL
ULTRAPASTEURIZED MILK SAMPLES

<i>Milk brands UHT</i>	<i>Samples (% p/v, n = 3)</i>			<i>Average</i>
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	
1	5.50	4.90	12.10	7.50
2	2.80	1.80	7.10	3.90
3	0.70	2.50	1.30	1.50
4	7.30	0	0	1.30
5	6.30	7.00	1.70	5.00
6	10.50	3.50	6.10	6.70
7	11.30	4.40	3.00	6.23
8	3.80	4.70	4.80	4.43
9	3.90	6.40	4.10	7.80
10	7.70	1.80	4.30	4.60

that values over 13.5% of WP/TP might be indicative of whey addition to milk, in a level of 5%.

Quantification of whey proteins/total protein ratio in commercial UHT milks

In relation to the rennet whey concentrations determined by the fourth derivative absorption spectrum from ten brands of UHT milk analyzed, 36.7% of the samples were positive at least in two occasions during the sample taking period (Table 3). In nine brands, whey presence was detected; that is, 90% of the studied samples had rennet whey. Only brand 4 showed no whey added in repetitions two and three. In the positive milk brands, the adulteration level was greater in samples one and three. The adulteration level greater than 10% was estimated in 10% of the samples during September, October and November, period in which total solids are less, this provokes industries to resort to the addition of rennet whey, in order to standardize total protein content in milk, to obtain products with constant protein content.¹⁷

Discussion

In order to select the length of wave for the spectroscopic analysis, Meissel¹², Lüthi-Peng and Puhan¹⁶ used the same minimum/maximum ratio, to quantify whey proteins with its corresponding maximums and minimums of 282 and 296 nm, respectively; while in this study the wavelengths used were 283 and 294nm, similar to the registered by Miralles *et al.*¹⁵

determinadas por la cuarta derivada del espectro de absorción de las diez marcas de leche UHT analizadas, 36.7% de las muestras fueron positivas por lo menos en dos ocasiones durante el periodo de toma de muestras (Cuadro 3). En nueve marcas se detectó la presencia de suero; es decir que 90% de las muestras estudiadas tenían suero de quesería. Sólo la marca 4 no presentó agregado de suero en las repeticiones dos y tres. En las marcas de leche positivas, el nivel de adulteración fue mayor en las tomas de muestras uno y tres. El nivel de adulteración mayor al 10% se estimó en 10% de las muestras durante septiembre, octubre y noviembre, periodo en el cual los sólidos totales son menores, lo que provoca que las industrias recurran a la adición de suero de quesería para estandarizar el contenido de proteínas totales en la leche, para obtener productos con contenido de proteína constante.¹⁷

Discusión

Con el fin de seleccionar la longitud de onda para el análisis espectroscópico, Meissel¹² y Lüthi-Peng y Puhan¹⁶ usaron la misma relación mínimo/máximo, para cuantificar las proteínas de suero con sus correspondientes máximos y mínimos de 282 y 296 nm, respectivamente, mientras que en este estudio las longitudes de onda utilizadas fueron 283 y 294 nm, similar a lo registrado por Miralles *et al.*¹⁵

Quantification of whey proteins/total protein ratio in commercial UHT milks

The values obtained after the problem samples analysis, expressed a WP/TP mean ratio of 14.2 % (n = 30). Such value was different to the registered by Miralles *et al.*¹⁵ of 18.1 ± 2.3% in UHT skimmed milks. In this work and according to the values recorded in Table 2, it was established that percentages greater than 13.5 WP/TP indicated whey addition.

Urban *et al.*,⁹ using the electrophoresis technique (SDS-PAGE), found that 50% (n = 96) of the ultrapasteurized milk commercialized in the City of Mexico, presented adulteration with rennet whey, violating the established in the health Mexican legislation,¹⁷ that discards the use of whey even during rainy season when the protein content diminishes.

The natural ratio of whey proteins/total protein may vary for different factors, Lüthi-Peng and Puhan¹⁶ found values for raw cow milk (n = 34) among 12.7% and 21%, using a spectroscopic method, value that coincides with the one obtained in this study for raw cow milk (12.43%). Coulon *et al.*¹⁹ reviewed the genetic physiological and dietary factors, that affect the casein proportion in total protein of milk, and showed that there are genetic variations of β -Lg, being the most common the ones called A and B, which differ in two amino acids. The variant A has valine in position 118, and aspartate in position 64, while variant B has alanine and glycine, respectively.

The genetic variant of β -Lg is the principal factor affecting the ratio casein/protein in milk, while factors related with diet have less influence. The WP/TP ratio found by those authors was of 16.8% in milk with β -Lg BB presence, of 18.4% in milk with β -Lg AB and 19.6% in milk with β -Lg AA. Therefore, although this factor has influence for each cow, it is not detectable in milk which precedes from great quantity of mixtures as the ones studied.^{18,19}

Consequently, it is considered that to evaluate the natural ratio of whey proteins/caseins, a "normal" interval of this ratio should be established, which would include all the possible intervals.

Meisel¹² and Miralles *et al.*¹⁵ have found controversial data in fat content and WP/TP ratio. While the first reported that in the fourth derivative of the absorption spectrum there was no influence of fat content, Miralle, on the other hand, when working with whole UHT milk found differences in the relative standard deviation, when comparing it with skimmed milks. The industrial ultrapasteurization procedures do not affect WP/TP ratio.¹⁵

The Codex Committee of milk and dairy products recommends that whey protein/casein ratio should not be affected by the standardization process, which

Cuantificación de la relación de proteínas de suero/proteína total en leches UHT comerciales

Los valores obtenidos tras el análisis de las muestras problema expresaron una relación PS/PT media de 14.2% (n = 30). Dicho valor fue diferente al registrado por Miralles *et al.*¹⁵ de 18.1 ± 2.3% en leches UHT descremadas. En este trabajo y de acuerdo con los valores registrados en el Cuadro 2, se estableció que los porcentajes mayores a 13.5 PS/PT indicaban adición de suero.

Urbán *et al.*,⁹ usando la técnica de electroforesis (PAGE-SDS), encontraron que 50% (n = 96) de la leche ultrapasteurizada comercializada en la Ciudad de México, presentaba adulteración con suero de quesería, contraviniendo lo establecido en la legislación sanitaria mexicana,¹⁷ que descarta el uso de lactosuero aun en época de lluvias cuando disminuye el contenido de proteína.

La relación natural de proteínas de suero/proteína total puede variar por diversos factores; Lüthi-Peng y Puhan¹⁶ encontraron valores para leche cruda de vaca (n = 34) entre 12.7% y 21 %, utilizando un método espectroscópico, valor que coincide con el obtenido en este estudio para leche cruda de vaca (12.43%). Coulon *et al.*¹⁹ revisaron los factores genéticos, fisiológicos y dietéticos que afectan la proporción de caseína en la proteína total de la leche, y mostraron que existen variantes genéticas de la β -Lg, siendo las más comunes las llamadas A y B, que difieren en dos aminoácidos. La variante A tiene valina en la posición 118, y aspartato en la posición 64, mientras que la variante B tiene alanina y glicina, respectivamente.

La variante genética de la β -Lg es el principal factor que afecta la relación caseína/proteína en la leche, mientras que los factores ligados a la dieta tienen una influencia menor. La relación PS/PT encontrada por esos autores fue de 16.8% en la leche con presencia de β -Lg BB, de 18.4% en la leche con β -Lg AB y 19.6% en la leche con β -Lg AA. Por tanto, aunque este factor tiene influencia por cada vaca, no puede ser detectable en leche que procede de grandes mezclas como las muestras estudiadas.^{18,19}

Por lo anterior, se considera que para evaluar la relación natural de proteínas de suero/caseínas, habría que establecer un intervalo "normal" de esta relación, que incluyera todos los intervalos que pudieran darse.

Meisel¹² y Miralles *et al.*¹⁵ han encontrado datos controvertidos en el contenido de grasa y la relación PS/PT. Mientras que el primero señaló que en la cuarta derivada del espectro de absorción no hubo influencia del contenido graso, Miralles, en cambio, al trabajar con leche entera UHT encontró diferen-

is why it has proposed limits for the whey proteins/caseins ratio in evaporated milks, sweetened condensed, powder, cheese and powder skin.¹⁴

In conclusion, the WP/TP ratio determination through the fourth derivative absorption spectrum allowed to detect rennet whey additions in 36.7% of the UHT samples of milk analyzed. It was detected that 56.7% of the studied samples showed less than 5% of rennet whey addition, which demonstrated the fraudulent use of this sub product according to the established by current national legislation.

The analytical model proposed to eliminate the rennet whey additions in UHT milks was justified for its analytical characteristics, for the quantitative appraisal observed and for the statistical study performed.

The method offers the following advantages: *a*) it is faster and non destructive, since proteins are not altered; *b*) it is possible to obtain results from a great number of samples with high efficiency; *c*) may be applied to dairy products that contain hydrolyzed proteins, and *d*) adapts to any protein mixture.

Referencias

1. Bordin G, Cordeiro R, De la Calle B, Rodriguez AR. Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2001; 928:63-76.
2. Atra Ramadan, Vatai Gyula, Bekassy-Molinar Erika, Balint Ad Agnes. Investigation of ultra and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *J Food Eng* 2005; 67:325-332.
3. Secretaría de Economía/Sistema de Información Comercial de México (SIC-M). En Boletín de Leche. México (DF): Secretaría de Economía, 2005.
4. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA). Tendencias y oportunidades de desarrollo de la red de leche en México. Boletín Informativo. México (DF): FIRA, 2001; 23: 81-93.
5. Wolfshoon-Pombo AF, Moreira-Furtado MAM. Detection of adulteration of pasteurized milk with whey by determination of the casein-bound phosphorus and protein nitrogen content. *Z. Lebensm Unters Frosch* 1989; 188:16-21.
6. Sorensen HH. The liquid milk market. *Bull IDF* 1992; 280: 46-64.
7. Recio I, Garcia Risco MR, Lopez Fandino R, Olano A, Ramos M. Detection of rennet whey solids in UHT milk by capillary electrophoresis. *Int Dairy J* 2000; 10: 3.
8. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Boletín de Leche. México (DF): Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2005; Enero-Junio.
9. Urbán G, Pérez N, Pérez J, Fresán C, González C, Vega S *et al.* Detección de adulteración con suero de quesería

en la desviación estándar relativa, al compararla con leches descremadas. Los procedimientos industriales de ultrapasteurización no afectan la relación PS/PT.¹⁵

El Comité del Codex de leche y productos lácteos recomienda que la relación proteínas de suero/caseínas no debe ser afectada por el procedimiento de estandarización, por lo que ha propuesto límites para la relación de proteínas de suero/caseínas en leches evaporadas, condensadas edulcoradas, en polvo, queso y nata en polvo.¹⁴

En conclusión, la determinación de la relación PS/PT a través de la cuarta derivada del espectro de absorción permitió detectar adiciones de suero de quesería en 36.7% de las muestras de leche UHT analizadas. Se detectó que 56.7% de las muestras estudiadas presentó menos de 5% de adición de suero de quesería, lo que demostró el empleo fraudulento de dicho subproducto conforme a lo que establece la legislación nacional vigente.

El modelo analítico propuesto para estimar las adiciones de suero de quesería en leches UHT quedó justificado por sus características analíticas, por las apreciaciones cuantitativas encontradas y por el estudio estadístico realizado.

El método ofrece las siguientes ventajas: *a*) es más rápido y no fue destructivo, ya que las proteínas no son alteradas; *b*) es posible obtener resultados de gran número de muestras con alta eficiencia; *c*) puede aplicarse a productos lácteos que contienen proteínas hidrolizadas, y *d*) se adapta a cualquier mezcla de proteínas.

en leches fluidas mexicanas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). *Rev Salud Anim* 2002; 24: 60-64.

10. Olieman C, Van den Bedem JW. A sensitive HPLC method detecting and estimating rennet whey solids in skim milk powder. *Neth Milk Dairy J* 1983; 37: 27-36.
11. Benítez E, Ponce P, Noa M. Detección de suero de quesería en leche en polvo por HPLC de filtración por gel (GFC-HPLC). *Rev Salud Anim* 2001; 23:27-31.
12. Meisel H. Application of fourth derivative spectroscopy to quantitation of whey protein and casein in total milk protein. *Milchwissenschaft* 1995; 50:247-251.
13. Miralles B, Ramos M, Amigo L. Influence of proteolysis of milk on the whey protein to total protein ratio as determined by capillary electrophoresis. *J Dairy Sci* 2003; 86: 2813-2817.
14. Codex Committee on Milk and Milk Products (CCMMP). First session codex inform, Rome, International Dairy Federation (IDF). 1994.
15. Miralles B, Bartolome B, Ramos M, Amigo L. Determination of whey protein to total protein ratio in UHT milk using fourth derivative spectroscopy. *Int Dairy J* 2000; 10: 191-197.
16. Lüthi-Peng QQ, Puhán Z. The 4th derivative spectro-

- scopic method for the rapid determination of protein and casein in milk. *Milchwissenschaft* 1999; 50: 247-251.
17. Puhan Z. Protein standardization as an international issue. *Bull IDF*. 1996; 311, 5-6.
18. Miralles B. Detección de caseinato y suero de leche en productos lácteos mediante técnicas electroforéticas,

cromatográficas y espectroscópicas (tesis doctoral), Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid, 2001.

19. Coulon JB, Hurtand C, Remond B, Vérité R. Factors contributing to variation in the proportion of casein in cow's milk true protein: a review of recent INRA experiments. *J Dairy Res* 1998; 65:375-387.