

Cartagena de Indias, 22 de Abril de 2013

Señores:

Comité de Investigaciones y Proyectos de Grado

Programa de Ingeniería de Alimentos

Universidad de Cartagena

Cordial saludo.

Dando cumplimiento a la reglamentación de la facultad de ingeniería y como requisito principal para optar al título de Ingeniero de alimentos los abajo firmantes, ponemos a su consideración el proyecto de grado titulado **“EVALUACIÓN DE RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO”**.

Agradeciendo su atención.

Atentamente,

YAJAIRA JIMENEZ FARAK

COD 0110710036

YENIFER ARROYO CASTELLON

COD 0110710040

Cartagena de Indias, 22 de Abril de 2013

Señores:

Comité de Investigaciones y Proyectos de Grado

Programa de Ingeniería de Alimentos

Universidad de Cartagena

Cordial saludo.

Mediante la presente me permito comunicarles que el proyecto de grado titulado **“EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAÍDO DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO”**, del cual soy director, ha sido revisado por mi persona y cuenta con mi aprobación.

Agradezco su atención.

Atentamente,

Luis Enrique Guzmán Carrillo

Ingeniero de Alimentos

**EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA
EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO**

**YENNIFER PAOLA ARROYO CASTELLON
YAJAIRA NADINME JIMENEZ FARAK**

Monografía para optar el título profesional en Ingeniería de Alimentos

Director

LUIS ENRIQUE GUZMAN CARRILLO



**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE INGENIERIA
PROGRAMA DE INGENIERIA DE ALIMENTOS
CARTAGENA
2013**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma del jurado

Firma del Jurado

Cartagena de indias D. T y C, 20 de Mayo de 2013

DEDICATORIA

Gracias Dios por estar siempre conmigo para darme la fuerza que necesitaba cada vez que me sentía débil e incapaz de lograr este triunfo.

A mis padres; Ángela, Carlos e Ibis, porque siempre estuvieron dándome ánimo para alcanzar un triunfo más en mi vida, porque con su amor y paciencia me han impulsado a seguir adelante aunque el camino este lleno de sacrificio.

A mis tíos; Rafa y Lupe porque estuvieron incondicionalmente en mis luchas y dificultades.

A mi familia en general porque gracias a su apoyo y consejos he podido realizar mis sueños.

A mi director de tesis por sus conocimientos y apoyo incondicional.

A mi novio Daniel porque desde que apareciste en mi camino has sido mi apoyo incondicional, por su corazón generoso y unido a mi causa.

A mi amiga Jennifer por su valioso apoyo e invaluable motivación para llevar a cabo la culminación de esta etapa de nuestras vidas.

Y a mis amigos que de una u otra manera contribuyeron a mi formación como profesional y en otros aspectos de mi vida.

Yajaira Jiménez Farak

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo de grado el cual representa la culminación de una experiencia enriquecedora y grandes esfuerzos.

Hoy le doy gracias a Dios por ser mi padre, amigo y compañero incondicional, por no abandonarme y mantenerme en las adversidades y por darme fuerza y valor para lograr esta meta.

A mis padres Ana Emilia Castellón y Yuri Arroyo por su amor y apoyo incondicional y por brindarme todo lo que hoy en día soy, Gracias.

A mi tía Luz Estela Castellón por su apoyo y comprensión, siempre empeñada en que lograra una superación.

A mi hermana Melisa Arroyo por demostrarme su cariño y apoyo en todo momento.

A mi Director de Tesis Luis Enrique Guzmán Carrillo por su colaboración y apoyo incondicional y por estar con nosotras cuando más lo necesitamos, un abrazo con respeto y gratitud.

A mi amiga Yajaira Jiménez por su comprensión a lo largo de nuestro propósito, para hacer realidad este hermoso sueño, Gracias.

A mi novio José Aguilar, por su confianza y motivación, dándome una voz de aliento para seguir adelante en mis metas, pero sobretodo su amor para construir sueños, que día a día son realidades en mi vida.

A todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en el logro de mi meta.

Jennifer Arroyo Castellón

AGRADECIMIENTOS

Las autoras ofrecen sus más sinceros agradecimientos a:

Dios por permitirnos culminar esta etapa de nuestras vidas, porque a pesar de todas las dificultades durante el proceso siempre nos guió por el camino correcto.

La universidad de Cartagena por el soporte institucional dado para la realización de este trabajo y a los docentes y directivos de la Facultad de ingeniería por sus acertadas asesorías.

Luis Enrique Guzmán Carrillo, Ingeniero de Alimentos y director de la Tesis, por su asesoramiento científico y estímulo para seguir creciendo intelectualmente, por su decidido aporte y colaboración en la realización del presente trabajo.

La empresa PROLECA que no dudo en facilitarnos constantemente el Lactosuero Dulce Fresco para llevar a cabo nuestras pruebas de laboratorio.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación.

Yajaira y Jennifer.

CONTENIDO

	PAG
1. RESUMEN	14
2. INTRODUCCIÓN	15
3. MARCO TEÓRICO	16
3.1. Lactosuero	16
3.1.1. Definición y Obtención.	16
3.1.2. Tipos de Lactosuero	16
3.1.2.1. Lactosuero dulce	16
3.1.2.2. Lactosuero Ácido	17
3.1.3. Composición del Lactosuero	17
3.1.4. Proteínas del Lactosuero	18
3.1.4.1. Albúminas	19
3.1.4.2. Alfa Lactoalbúmina	19
3.1.4.3. Beta Lacto globulina	19
3.1.4.4. Globulina	20
3.1.4.5. Proteasa – Peptonas	20
3.1.4.6. Proteínas Menores	20
3.2. Alfa Lactoalbúmina	22
3.2.1. Estructura primaria, secundaria y terciaria	23
3.2.2. Estabilidad de la Proteína	24
3.2.3. Purificación de la Alfa Lactoalbúmina	24
3.3. Cromatografía	25
3.3.1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	26
3.3.1.1. Cromatografía de Adsorción	27
3.3.1.2. Cromatografía de Reparto.	28
3.3.1.3. Cromatografía de Intercambio Iónico	28
3.3.1.4. Cromatografía de Exclusión por Tamaño	28

3.3.1.5.	Cromatografía de Fase Normal	29
3.3.1.6.	Cromatografía de Fase Reversa.	29
4.	ANTECEDENTES	31
4.1.	Proceso para separar selectivamente la alfa Lactoalbúmina a partir de las proteínas del suero.	31
5.	JUSTIFICACIÓN	32
6.	OBJETIVOS	33
6.1.	Objetivo General	33
6.2.	Objetivos Específicos.	33
7.	METODOLOGÍA	34
7.1.	Tipo de Estudio	34
7.1.1.	Alcance	34
7.1.2.	Corte	34
7.1.3.	Localización	34
7.2.	Variables del Proceso	35
7.2.1.	Variable Dependiente	35
7.2.2.	Variable Independiente	35
7.3.	Plan de Trabajo	35
7.3.1.	Etapa 1	35
7.3.2.	Etapa 2	35
7.3.3.	Etapa 3	35
7.3.4.	Etapa 4	35
7.3.5.	Etapa 5	35
7.4.	Obtención de la Materia Prima	35
7.5.	Materiales	35
7.5.1.	Equipos	35
7.5.2.	Reactivos	36
7.6.	Pruebas	36
7.6.1.	Análisis y Calidad del Lactosuero.	36

7.6.2. Análisis Fisicoquímico del Lactosuero	36
7.7. Procedimiento Experimental	37
7.7.1. Determinación de la concentración inicial del lactosuero	38
7.7.2. Extracción por Evaporación del Lactosuero y Determinación de las concentraciones ideales	38
7.7.3. Verificación de la pureza y Evaluación de la alfa lactoalbúmina	39
7.7.3.1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC	39
7.8. Diseño Experimental	40
7.9. Presentación y Análisis de Resultados	41
7.9.1. Análisis Fisicoquímico	41
7.9.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución	43
7.9.3. Análisis de Varianza de un solo Factor	55
8. CONCLUSIONES	61
9. RECOMENDACIONES	62
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS.	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Composición típica del suero

Figura 2 Lactosuero

Figura 3 Esquema de un Cromatógrafo de Líquidos

Figura 4 Selección de tipos de Cromatografía de Líquidos

Figura 5 Modelo proceso Evaluación de rendimiento de la α -LA extraída del lactosuero dulce evaporado

Figura 6 Cromatograma Estándar 1

Figura 7 Cromatograma Estándar 2

Figura 8 Cromatograma Estándar 3

Figura 9 Cromatograma Estándar 4

Figura 10 Curva de Calibración Estándar

Figura 11 Cromatograma Muestra inicial A

Figura 12 Cromatograma Muestra inicial B

Figura 13 Media Concentración Vs. Tiempo

Figura 14 Media concentración Vs. Tiempo. Mejores resultados de acuerdo a la temperatura de evaporación

Figura 15 Cromatograma Muestra 1A

Figura 16 Cromatograma Muestra 1B

Figura 17 Cromatograma Muestra 2A

Figura 18 Cromatograma Muestra 2B

Figura 19 Cromatograma Muestra 9A

Figura 20 Cromatograma Muestra 9B

Figura 21. Ecuación Supuesto Igualdad de Varianza

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Composición media del lactosuero

Tabla 2 Contenido de la α - La en la leche de vaca

Tabla 3 Análisis fisicoquímico

Tabla 4 Parámetros para la elución de las proteínas del suero por la RP – HPLC.

Tabla 5 Datos Iniciales

Tabla 6 estandarización de las muestras

Tabla 7 concentración y área de estándar

Tabla 8 Resultados muestras evaluadas por cromatografía

Tabla 9 Media de las muestras evaluadas por cromatografía

Tabla 10 Resumen ANOVA

Tabla 11 Análisis De Varianza

Tabla 12 Supuestos de Igualdad de Varianza

1. RESUMEN

El estudio fue realizado con la finalidad de evaluar el rendimiento de la alfa lactoalbúmina obtenida del lactosuero evaporado. Para la extracción de la alfa lactoalbúmina se utilizó Lactosuero Dulce Fresco, debido a que este tiene un contenido de materia seca un poco mayor en comparación al Lactosuero Ácido.

Las diferentes muestras fueron de 500 ml cada una con un contenido de materia seca de 20, 30 y 40 % en peso y a unas temperaturas de 50, 60 y 70°C para cada una de las anteriores durante 1 hora, para propiciar el precipitado en el cual se encontraba contenida la proteína (α - LA)

Luego de este proceso se tomó el precipitado y se preparó la muestra para su posterior análisis por medio de la técnica HPLC; con una relación 1 a 1 de la fase móvil, obteniendo así las concentraciones finales de la alfa lactoalbúmina contenida en cada muestra previamente tratada.

Se confrontaron los resultados de las 9 muestras más la muestra inicial y se determinó cuál tuvo mayor rendimiento, estableciendo las variables ideales para obtener un mejor resultado.

2. INTRODUCCIÓN

La Nanotecnología es una de las industrias emergentes más importantes en todo el mundo. Al igual que todas las nuevas tecnologías, la nanotecnología trae consigo nuevos beneficios, así como posibles nuevos riesgos (Castillo & Watkins, 2010)

En la actualidad, el vínculo existente entre la Nanotecnología y la Ingeniería de Alimentos ha aumentado de manera significativa debido a sus diversas aplicaciones en las diferentes áreas del sector Alimentario; como el desarrollo de nuevos materiales funcionales, el procesamiento en micro y nano escala, el desarrollo de nuevos productos y el diseño de métodos para la seguridad alimentaria y la bioseguridad. (Blundell & Thurlby 1987; Aguilera 2005)

Los nanotubos utilizados en la industria alimentaria están formados por la proteasa del *Bacillus licheniformis*, la cual actúa sobre la alfa lactoalbúmina procedente del lactosuero dulce. La extracción de la alfa lactoalbúmina es posible mediante la separación selectiva por precipitación de las diversas proteínas del suero por un tratamiento térmico de bajo costo seguido de la recuperación de las otras proteínas que permanecen en solución en el suero residual (Railland & Barbier, 1988); No obstante el método de concentración por evaporación, permite obtener concentrados de proteínas de buena solubilidad pero con un bajo rendimiento.

3. MARCO TEORICO

3.1. LACTOSUERO

3.1.1. Definición y obtención

El lactosuero es definido como la sustancia líquida obtenida por separación del coagulo de la leche en la elaboración del queso, precipitación de la caseína o productos similares mediante la separación de la cuajada, después de la coagulación de la leche. La coagulación se obtiene mediante la acción de enzimas del cuajo (Gonzales, 2011), y está compuesto principalmente de proteínas hidrosolubles (lactoalbúmina y lacto globulina), lactosa, minerales y vitaminas que constituyen aproximadamente el 90% del volumen de la leche y contiene la mayor parte de los compuestos hidrosolubles de ésta. A pesar que en la actualidad es un material contaminante por su alto contenido orgánico, no hacer uso del lactosuero como alimento es un desperdicio de nutrientes, pues este contiene un poco más del 25 % de las proteínas de la leche, cerca del 8% de la materia grasa y cerca del 95 % de la lactosa.(Villacis, 2011).

3.1.2. Tipos de lactosuero

Existen varios tipos de lactosuero dependiendo principalmente de la eliminación de la caseína, el primero denominado dulce, está basado en la coagulación por la renina a pH 6,5. El segundo llamado ácido resulta del proceso de fermentación o adición de ácidos orgánicos o ácidos minerales para coagular la caseína como en la elaboración de quesos frescos (Parra, 2009).

3.1.2.1. Lactosuero dulce

El suero dulce, se genera al elaborar el queso mediante el uso de enzimas proteolíticas o “cuajo”, las cuales actúan sobre las caseínas de la leche y las “cortan” o “rompen”, haciendo que estas se desestabilicen y precipiten, todo esto

bajo condiciones específicas de temperatura (15-50°C), pH levemente ácido (5,9-6,6) producto de la incorporación de cultivos lácteos y iones calcio. La principal enzima utilizada para realizar esto, es la quimosina o renina. Esta enzima es propia del aparato digestivo de los rumiantes, por eso, antiguamente esta enzima se obtenía a partir del estómago de estos animales. Actualmente esta enzima es producida a partir de síntesis bioquímica evitando usar el estómago de terneros como materia prima. Por otro lado como se mencionó anteriormente, está el suero “ácido”. (Franchi, 2010)

3.1.2.2. Lactosuero ácido

Este suero se genera mediante la precipitación ácida de la caseína. Esta precipitación se realiza disminuyendo el pH de la leche a un valor de 4,5 a 4,6. A este pH, se alcanza el punto isoeléctrico de la mayoría de las caseínas presentes; en este punto, la carga eléctrica neta de la proteína es igual a cero, lo cual produce que la micela de caseína se desestabilice y precipite, dejando en solución solamente las proteínas de tipo séricas. (Franchi, 2010)

3.1.3. Composición del lactosuero

En la tabla 1 se exponen los porcentajes de cada uno de los parámetros que componen el lactosuero, donde están incluidos el agua, extracto seco, lactosa, proteínas, grasa y sales minerales (Guerrero, 2012)

Tabla 1. Composición media del lactosuero

PARÁMETRO	SUERO DULCE	SUERO ÁCIDO
Agua	93-95%	93-95%
Extracto seco	5-7%	5-7%
Lactosa	4.5-5.3%	3.8-5.2%
Proteínas	0.6-1.1%	0.2-1.1%
Grasa	0.1-0.4%	0.1-0.5%
Sales minerales	0.5-0.7%	0.5-1.2%

En la tabla 1 se observa el contenido de materia seca presente en el lactosuero dulce y ácido. Fuente: (Guerrero, 2012)

3.1.4. Proteínas del suero

Reciben este nombre el conjunto de sustancias nitrogenadas que no precipitan cuando el pH de la leche se lleva a 4,6, pH que corresponde al punto isoeléctrico (pH) de la caseína bruta. Por esto se les denomina también proteínas solubles. Se encuentran en el suero que se separa del coágulo obtenido por la adición del cuajo. (Veisseyre, 1988).

La función primaria de las proteínas lácteas es el aporte suficiente de aminoácidos esenciales y de nitrógeno orgánico. (Aranceta, 2005) Entre las proteínas del suero se permiten distinguir cuatro grandes fracciones: albuminas, globulinas, fracción proteasas-peptonas y proteínas menores. (Veisseyre, 1988).

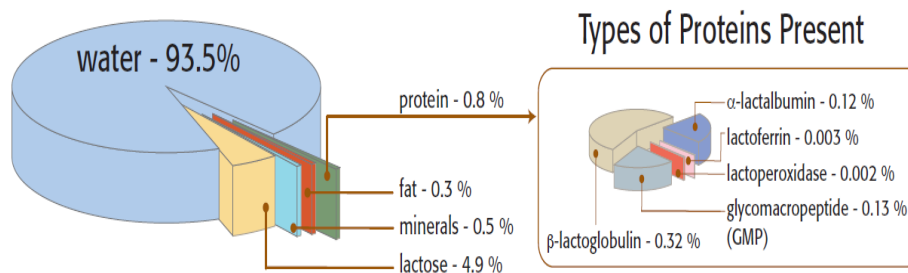
3.1.4.1. Albuminas

Es la fracción más importante, pues representa el 75% de las proteínas del suero lácteo y el 15% de las proteínas de la leche. Comprende fundamentalmente tres constituyentes: α -lactoalbumina, la β -lactoglobulina y la seroalbumina. (Arancete, 2005).

3.1.4.2. α -lactoalbumina

Proteína muy soluble en agua a pH 6, pero mucho menos soluble en la zona de pH 4-4,6. Representa el 25% de la fracción de “albuminas”. La proteína interviene en la biosíntesis de la lactosa, de la cual se sabe que está bajo el control de tres enzimas, una de ellas sintetiza dos subunidades proteicas A y B (Arancete, 2005).

Fig. 1 Composición típica del suero



En la Fig. 1 se observa la composición típica del lactosuero incluyendo un desglose de las proteínas presentes en el mismo. Fuente: Approximate Distrinution of... (2008)

3.1.4.3. β -lactoglobulina

Proteínas cuya solubilidad en agua pura es nula. Solamente la presencia de sales permite asegurar una cierta solubilidad. La β -lactoglobulina es una molécula muy

compacta cuya cadena está fuertemente plegada. Es particularmente apta para formar polímeros, cuya complejidad es función del pH (Arancete, 2005).

3.1.4.4. Globulinas

Representa el 10 al 12% de las proteínas solubles. Las globulinas de la leche presentan una actividad inmunológica importante. Por esto se las llama a menudo inmunoglobulinas, cuya actividad inmunológica puede caracterizarse haciéndolas reaccionar con los antígenos apropiados. Las inmunoglobulinas desempeñan un papel fundamental en la trasmisión de inmunidad de la madre al recién nacido durante los primeros días de vida post-uterina (Arancete, 2005).

3.1.4.5. Proteasa - Peptonas

Es la fracción de las proteínas de la leche que no precipitan por calentamiento a 95°C durante 30 minutos seguida de acidificación a pH 4,6. Representan aproximadamente el 10% de las proteínas del suero lácteo. Es muy heterogénea y no está aun perfectamente definida (Arancete, 2005).

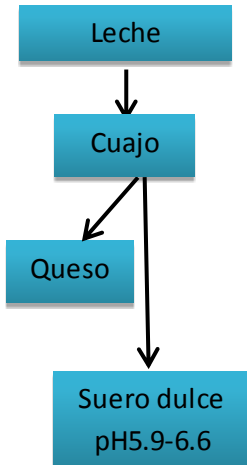
3.1.4.6. Proteínas menores

Agrupar un cierto número de proteínas que se encuentran en la leche en pequeña cantidad y son difíciles de clasificar.

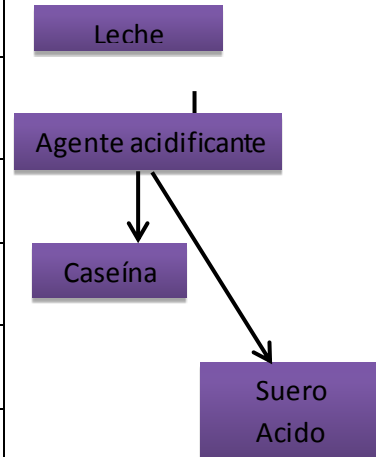
Las proteínas del suero tienen efectos saludables como ser antimicrobianos, regulan la flora bacteriana, regular el sistema inmune, son antihipertensivos, entre otros; además que sus aminoácidos regulan los procesos anabólicos y catabólicos de los nutrientes, optimizando la composición corporal. (Arancete, 2005).

Fig. 2 Lactosuero

Suero 80 – 90% del volumen de la leche



Tipos de suero		
Constituyente	Suero dulce (%)	Suero ácido (%)
Sólidos	6.4	6.5
Agua	93.6	93.5
Grasa	0.05	0.04
Proteína	0.55	0.55
NNP	0.18	0.18
Lactosa	4.8	4.9
Minerales	0.5	0.8
Ca	0.043	0.12
P	0.040	0.065
Na	0.050	0.50
K	0.16	0.16
Cl	0.11	0.11
ácido láctico	0.05	0.4



Fuente: (M.A et al -2001).

3.2. ALFALACTOALBUMINA (α -LA)

La α -lactoalbumina es por orden de importancia, la segunda proteína del suero y tiene actividad biológica, ya que es parte constitutiva del sistema enzimático requerido para la síntesis de la lactosa. De hecho, la leche de algunos animales que no presentan estas proteínas tampoco contiene lactosa. No tienen grupo sulfhídrico libre, pero si cuatro disulfuro provenientes de enzimas, lo que la hace tener 2,5 veces más azufre que la caseína. (Eugene *et al.*, 2000).

Tienen una estructura global compacta con cuatro disulfuros y se desnaturaliza a 63° C, pero se devuelve a su estado natural con el enfriamiento. Es insoluble a pH entre 4 y 5,5, a un lado y a otro lado de esta zona, la molécula sufre modificaciones de conformación, rápida o lenta, reversibles o no, que conducen a diversas formas polimerizadas. (Eugene *et al.*, 2000).

La alfalactoalbúmina como proteína individual, tiene una función biológica importante y se encuentra en todas las leches que contienen lactosa; la molécula de α LA tiene cuatro (4) puentes disulfuro y es globular (Swaisgood, 1982)

Tabla 2 Contenido de α LA en la leche de vaca

Proteína	Gr/100gr de proteína	Peso molecular aprox.
α LA)	3,1 – 4,6	14,000

Fuente: Swaisgood, 1982

La α -LA es una proteína de la leche unida a un ion calcio el cual es muy importante desde varios puntos de vista; primero que todo la α -LA realiza una importante función en la secreción de las células mamarias, ella es una de los dos componentes de la síntesis de la lactosa, la cual cataliza el último paso en la biosíntesis de la lactosa en la glándula mamaria, el otro componente de este sistema es la galactosiltransferasa (GT) la cual está implicada en el procesamiento

de proteínas en varias secreciones de la célula, por los grupos galactosiltransferasa de la galactosa hacia glicoproteínas que contiene N-acetilglucosamina. En la glándula mamaria lactante la especificidad de la GT es modulada por la interacción de la α -LA, la cual incrementa su afinidad y especificidad para glucosa. (Hill, *et al.*, 2001).

3.2.1. Estructura primaria, secundaria y terciaria.

En la mayoría de los casos la α -LA incluida en humanos, bovinos, cerdos, cabras, camellos, equinos y conejos contiene 123 aminoácidos residuales. La α -LA de la rata contiene 17 residuos de carbono terminal adicionales; la α -LA es similar en secuencia a la familia de los lisosomas, pero exhibe actividad en células líticas de alrededor de 10^{-6} de la actividad específica de la lisosima del huevo blanco de gallina, la cristalografía de rayos X ha mostrado que la estructura tridimensional de la α -LA es muy similar a las lisosómicas.

La α -LA nativa consta de dos dominios, un largo dominio α helicoidal y un pequeño dominio α laminar, los cuales están conectados por un átomo de calcio de lazo curvado; el dominio α helicoidal está compuesto de tres principales α hélices mayores (residuos 5 – 11, 23 – 24, y 86 – 98) y dos cortas hélices (residuos 10 – 20 y 115 – 118) el pequeño dominio está compuesto de una serie de curvaturas, y una pequeña lamina α plegada trío solitario antiparalela tres veces trenzada (residuos 41 – 44, 47 – 50 y 55 – 56) y una corta hélice (tres residuos por vuelta) y un hidrogeno dentro de la cadena del lazo curvado que contiene 10 átomos, (residuos 77 – 80). Los dominios están divididos por una profunda grieta entre ellos, al mismo tiempo los dos dominios son agarrados por un puente de cisteína entre los residuos 73 – 91 formando la curva de enlace ion calcio, un segundo puente importante disulfuro 66 – 77 que conecta también a los dos dominios; sobre todo a la estructura de la α -LA está estabilizada por cuatro puentes disulfuros (6 – 120, 61 – 77, 73 – 91 y 28 – 111). (Imafidon, *et al.*, 1997).

3.2.2. Estabilidad de la Proteína

La unión del catión al fuerte sitio del calcio incrementa la estabilidad de la α -LA. De diferentes exploraciones de datos calorimétricos, el enlazamiento del calcio se mueve de la transición térmica a muy alta temperatura por más de 40°C. El enlazamiento de iones sodio, sorprendentemente el enlazamiento del ion Zinc a la α -LA recargada de calcio disminuye la estabilidad térmica, causa agregación e incrementa su susceptibilidad para la digestión de la proteasa. Los resultados también mostraron que la α -LA está parcialmente desdoblada y en estado parcialmente agregado en presencia de altas concentraciones de ion Zinc. En ausencia de ion calcio, pero en presencia de concentraciones fisiológicas de iones de magnesio, sodio y de potasio, la transición térmica en la α -LA ocurre en la región de 30 a 45°C. Esto podría estar relacionado a alguna regulación de la temperatura de la estabilidad de la α -LA y a la función en la glándula mamaria (Imafidon, *et al.*, 1997).

3.2.3. Purificación de Alfalactoalbúmina

El material de partida para el enriquecimiento y purificación de la alfa lacto albumina suele ser suero de leche. Muchos de los procesos y métodos industriales que se han informado, se han examinado de forma exhaustiva (Imafidon, *et al.*, 1997). Sin embargo, muchos de estos métodos de purificación se han trabajado a escala de laboratorio, su ampliación a escala piloto y escala industrial no ha sido difícil, si no decepcionante (Gesán, *et al.*, 1999). No obstante esto se puede lograr mediante un tratamiento térmico de bajo costo que consiste en concentrar el suero hasta un contenido seco de 10% a 40, y se acidifica a un pH de menos de 4, dicho tratamiento térmico se lleva a cabo a una temperatura no superior a 75°C, preferiblemente de 45 a 75°C, durante una duración de 15 segundos a 1 hora permitiendo la precipitación de la proteína. (Rialland & Barbier, 1988).

MÉTODO DE SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA ALFA-LACTOALBÚMINA

3.3. CROMATOGRAFIA

Se designa con el nombre de cromatografía a un grupo de métodos de separación de mezclas complejas aplicable también a la determinación de las cantidades de los constituyentes de éstas. Etimológicamente la palabra “Cromatografía” significa “escritura en color” y fue adoptada por Mikhail Tswett, botánico ruso que desarrollo la cromatografía en el año 1905, consiguiendo la separación de las materias colorantes de las hojas verdes: las dos clorofilas (verdes), el caroteno (rojo) y la xantofila (amarilla) (Walleng *et al.*, 2001).

Esta técnica de separación de sustancias se basa en las diferentes velocidades con que se mueve cada una de ella a través de un medio poroso, arrastradas por un disolvente en movimiento. (Walleng *et al.*, 2001).

Los componentes esenciales de un sistema cromatográfico son los siguientes: una fase fija o estacionaria, constituida generalmente por un sólido granular finamente dividido; una fase móvil, que puede ser un gas o un líquido y los sustratos o solutos, dos o más sustancias que hay que separar. (Walton & Reyes, 2005).

Las aplicaciones de la Cromatografía han aumentado en forma explosiva en los últimos cincuenta años debido no solo al perfeccionamiento de nuevos y diversos tipos de técnicas cromatográficas, sino también a las necesidades crecientes de los científicos de mejores métodos para la caracterización de mezclas complejas. (Skoog; Jaimes; Crouch, 2010)

3.3.1. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION O HIGH PERFORMACE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

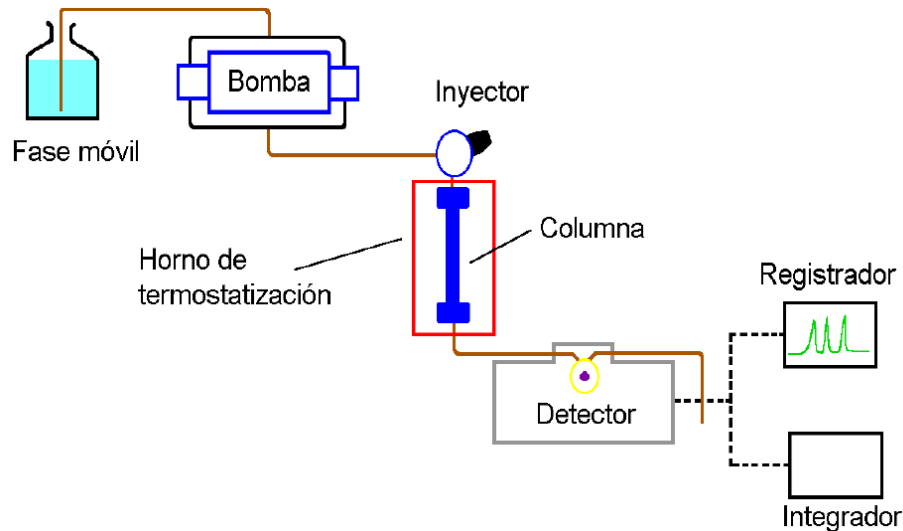
Es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil; es una de las técnicas más utilizadas actualmente debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para automatizarla, su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles, pero sobre todo, su amplia aplicabilidad a sustancias que son importantes en la industria, muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Esta técnica es utilizada para la identificación, cuantificación y aislamiento de los componentes de una mezcla (Walleng *et al.*, 2001).

En la Cromatografía Líquida la fase móvil consiste en un fluido (gas, líquido, o fluido supercrítico) que arrastra a la muestra con un flujo constante de presión proporcionado por una bomba, hasta llegar al punto donde es introducida la muestra. Siguiendo el flujo de presión la lleva a una columna donde se encuentra la fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido (Walleng *et al.*, 2001).

Los componentes de la mezcla interaccionan de distinta forma con la fase estacionaria y con la fase móvil. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando.

Después de haber pasado los componentes por la fase estacionaria y haberse separado, pasan por un detector que genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo del compuesto.

Fig. 3 Esquema de un Cromatógrafo de líquidos



En la Fig. 3 se muestra un claro ejemplo del funcionamiento de un cromatógrafo de líquidos. Fuente: Skoog et al., 2010

Clasificación de la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)

Los diferentes tipos de cromatografía líquida se pueden clasificar de diferentes maneras, pero la forma más habitual de clasificación es realizada en base a la naturaleza de la fase estacionaria, ya que es esta la que impone fundamentalmente el mecanismo de separación; de este modo se pueden enumerar cuatro tipos de técnicas:

3.3.1.1. Cromatografía de Adsorción (Líquido - Sólido)

La fase estacionaria es una adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción. Las únicas fases que se utilizan en HPLC Líquido – sólido son la Sílice y la Alúmina, siendo la primera la que se prefiere para la mayoría, cuando no todas, las aplicaciones debido a su mayor capacidad de carga y a su mayor diversidad de presentaciones. (Walton & Reyes, 2005).

3.3.1.2. Cromatografía de Reparto/Adsorción – Fase unida Químicamente

La cromatografía de reparto ha llegado a ser el tipo de cromatografía de líquidos más ampliamente utilizado.

La separación en este caso, se basa en un reparto del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

La cromatografía de reparto se puede subdividir en cromatografía líquido – líquido y cromatografía de fase unida químicamente. La diferencia entre estas técnicas radica en la forma en que se retiene la fase estacionaria sobre las partículas soporte del relleno. En líquido – líquido, la fase estacionaria líquida se retiene sobre la superficie del soporte por adsorción física. En fase unida químicamente, la fase estacionaria se une químicamente a la superficie del soporte. (Walton & Reyes, 2005).

3.3.1.3. Cromatografía de Intercambio Iónico

La cromatografía de intercambio iónico (IC) para la que a menudo se utiliza el término abreviado Cromatografía Iónica, se da cuando la fase estacionaria presenta en su superficie grupos ionizados capaces de retener selectivamente a iones de signo contrario que circulan en la fase móvil. (Walton & Reyes, 2005).

3.3.1.4. Cromatografía de Exclusión por Tamaño

También conocida como Cromatografía de Penetrabilidad sobre Geles o de filtración sobre geles, es una técnica que se aplica particularmente a especies de elevado peso molecular. La fase estacionaria en este caso, es un material poroso de tamaño de poro controlado, que permite la entrada de ciertas moléculas de manera selectiva, dejando fuera otras de mayor tamaño. (Walton & Reyes, 2005).

El mecanismo de retención en los dos primeros casos es similar, variando únicamente el tipo de interacciones que se producen y cuál de ellas es la

predominante; de tal forma se realiza otra división de los dos primeros tipos de cromatografía atendiendo a la polaridad de la fase estacionaria:

3.3.1.5. Cromatografía de Fase Normal N. P. C., Normal – Phase Chromatography

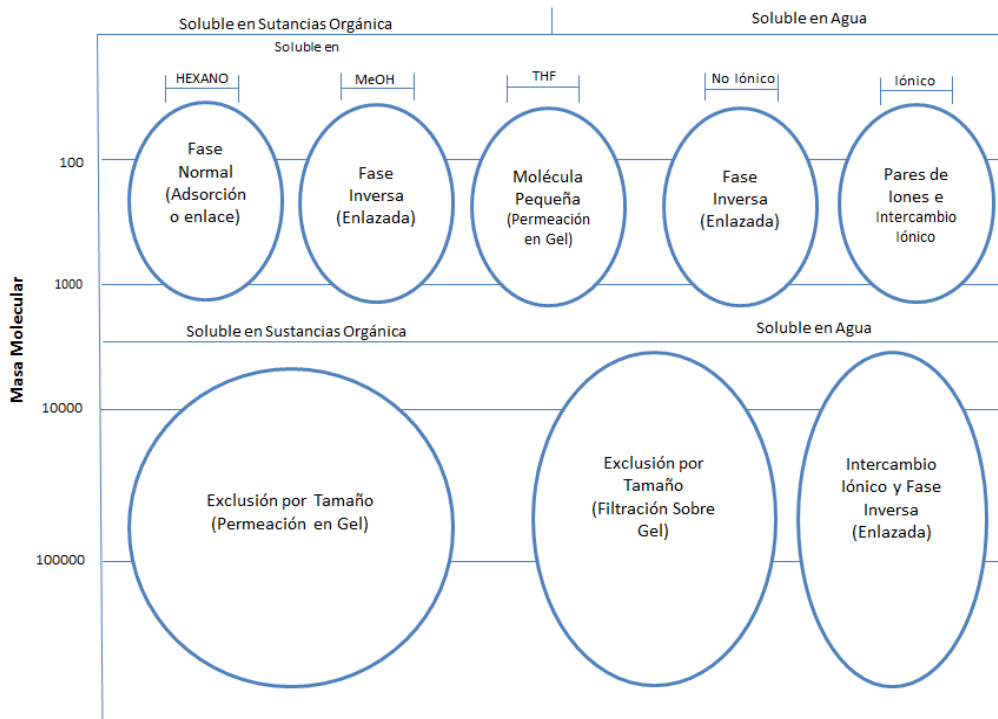
La fase estacionaria presenta puntos activos de alta polaridad y las interacciones que se producen con el soluto son específicas del grupo activo. La fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente (sílice o columna), o bien, un soporte al que se unen químicamente moléculas orgánicas que presentan grupos funcionales de alta polaridad, se usa una fase móvil no polar.

Estas fases retienen compuestos polares preferentemente a compuestos no polares. (Christian, 2009)

3.3.1.6. Cromatografía de Fase Reversa R.P.C., Reversed – Phase Chromatography

La fase estacionaria tiene una naturaleza apolar (cadenas hidrocarbonadas, grupos fenilo) y las interacciones que se producen son inespecíficas (efecto solvofobo) y la fase móvil polar, por ejemplo; metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, agua o con frecuencia, una mezcla de agua con uno de los disolventes orgánicos. El disolvente orgánico se llama modificador. El contenido de agua se hace variar para ajustar la polaridad. Para los componentes ácidos se usa metanol y para los básicos acetonitrilo (Skoog; Jaimes; Crouch, 2010). La HPLC fase Inversa, se usa para separar compuestos orgánicos.

Fig. 4 Selección de tipos de cromatografía de líquidos.



En la **Fig. 3** se pone de manifiesto que los distintos procedimientos que utilizan la cromatografía de líquidos tienden a ser complementarios en lo que se refiere a sus campos de aplicación. Por consiguiente, en lo que toca a solutos con masas moleculares superiores a 10.000 se utiliza a menudo la cromatografía de exclusión por tamaño, aunque ahora también es posible tratar estos compuestos mediante cromatografía de fase inversa. En el caso de especies iónicas de masa molecular más pequeña, se suele utilizar la cromatografía de intercambio iónico. Los métodos de fase inversa se aplican a las especies poco polares pero no iónicas. (Skoog; Holler; Crouch, 2010).

Según estudios anteriores las RP – HPLC conduce a una mejor separación de las proteínas del suero de la leche en comparación con la cromatografía de exclusión por tamaño y la cromatografía de intercambio iónico. (Giraldo *et al.*, 2010).

4. ANTECEDENTES

4.1. PROCESO PARA SEPARAR SELECTIVAMENTE LA ALFA-LACTALBÚMINA A PARTIR DE LAS PROTEÍNAS DE SUERO

Estudios anteriores hacen referencia a un procedimiento para la separación de la α -lactoalbúmina a partir de las proteínas del suero, por ejemplo mediante precipitación por el calor, o por reacción con polielectrolitos con el fin de formar agregados de proteína. Otros métodos emplean otros agentes precipitantes tales como carboximetilcelulosa, ácido poliacrílico, poli fosfatos o laurilsulfato de sodio (Rialland & Barbier, 1988). Sin embargo, estos procesos no permiten a las diversas proteínas separarse individualmente del suero para luego ser recuperadas, debido a que es muy difícil eliminar el agente precipitante empleado en dichos métodos; por lo tanto no presentan una buena solubilidad. El método de concentración por evaporación, permite obtener concentrados de proteínas de buena solubilidad (Rialland & Barbier, 1988).

Estudios realizados por Railland & Barbier en 1988 observaron que era posible separar selectivamente por precipitación la alfa-lactoalbúmina de las diversas proteínas del suero por un tratamiento térmico de bajo costo, este tratamiento es seguido por la recuperación de las otras lacto-proteínas que permanecen en solución en el suero residual.

5. JUSTIFICACIÓN

El lactosuero es un subproducto que se obtiene durante la fabricación del queso, contiene proteínas que se emplean en la industria de alimentos por sus propiedades nutricionales, funcionales y nutracéuticas (Swaisgood, 1982). De él se pueden extraer diferentes proteínas hidrosolubles como son la beta lactoglobulina y la alfa lactoalbumina; esta última resulta de gran importancia en la industria alimentaria debido a que con ella se pueden formar fibras nanotubulares por auto-ensamble de moléculas parcialmente hidrolizadas. La hidrólisis es necesaria para la tendencia de la alfa lactoalbumina al auto-ensamble (Graveland *et al.*, 2004).

Los nanotubos fabricados de la proteína láctica son formados por auto-ensamble de la hidrólisis parcial de moléculas. La capacidad de la alfa lactoalbumina, de formar nanotubos por auto-ensamble se podría ofrecer a la industria alimentaria como una novedad y un ingrediente importante para la gelificación y el encapsulado. Esta proteína es utilizada actualmente como un ingrediente en preparados para lactantes; los principales productores de alfa lactoalbumina, afirman que es la única proteína con capacidad de formar nanotubos la cual se puede utilizar como ingrediente para una gama más amplia de aplicaciones (Graveland *et al.*, 2004).

La funcionalidad de un nanotubo es la de servir como vehículo para encapsular moléculas como vitaminas o enzimas para su protección, los nanotubos; además, pueden ser usados para incrementar la viscosidad de los alimentos y para gelificación (Graveland *et al.*, 2005).

La realización de este proyecto permitirá la posibilidad de extraer la alfa lactoalbumina presente en el lactosuero, por el método de evaporación, evaluando el rendimiento de dicha proteína, coadyuvando la aplicación de ésta a la formación de fibras nanotubulares (Graveland *et al.*, 2005).

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el rendimiento obtenido al extraer la alfa lactoalbúmina presente en el lactosuero por evaporación.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la concentración de la alfa lactoalbúmina presente en el lactosuero.
- Extraer la alfa-lactoalbúmina presente en el lactosuero por el método de evaporación.
- Determinar las condiciones ideales de concentración y temperatura para la extracción de la alfa lactoalbúmina por evaporación.
- Verificar la pureza de la alfa lactoalbúmina extraída del lactosuero.
- Evaluar la calidad y rendimiento de la alfa lactoalbúmina obtenida al evaporar el lactosuero por el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

7. METODOLOGIA

7.1. TIPO DE ESTUDIO

El presente proyecto de investigación es de tipo experimental, en el cual se tendrán en cuenta las diferentes concentraciones del lactosuero para determinar la temperatura y el tiempo ideal a la cual se debe someter la materia prima, y extraer la alfa lacto albúmina de una manera fácil y efectiva obteniendo así un mayor rendimiento.

Es exploratorio ya que se analizará en el tiempo, la temperatura a la cual se somete el lactosuero para obtener mayor cantidad de dicha proteína, sin que se vean afectadas sus propiedades, y de esta manera poder aplicarlo a la nanotecnología, obteniendo así resultados positivos, teniendo un control regular, medible y que se pueda percibir de manera precisa; contando con valores que nos permitan dar soporte a la investigación.

7.1.1. ALCANCE

El presente proyecto es de alcance exploratorio, ya que las distintas variables serán medidas y observadas en el tiempo.

7.1.2. CORTE

De corte lineal ya que se medirá el grado de ganancia o pérdida de las distintas variables.

7.1.3. LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO

El estudio será realizado en las plantas piloto de la facultad de Ingeniería ubicadas en la Universidad de Cartagena sede Piedra de Bolívar y Laboratorios de La Universidad de Córdoba.

7.2. VARIABLES DEL PROCESO

7.2.1. VARIABLE DEPENDIENTE: Concentración de la alfa lactoalbúmina y evaluación del rendimiento de dicha proteína.

7.2.2. VARIABLE INDEPENDIENTE: el proceso de evaporación del lactosuero como método de extracción y sus variables (tiempo y temperatura).

7.3. PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo de este proyecto se consta de 5 etapas.

7.3.1. Etapa 1: Recolección del lactosuero, evaluación fisicoquímica del mismo.

7.3.2. Etapa 2: Concentración del lactosuero a un contenido de materia seca del 10 al 40 % en peso (4 muestras diferentes más la inicial).

7.3.3. Etapa 3: Se lleva a cabo el tratamiento térmico para cada tipo de muestra a diferentes temperaturas.

7.3.4. Etapa 4: Recuperación de la proteína por el método de precipitado.

7.3.5. Etapa 5: Evaluación del rendimiento de la alfa lactoalbúmina obtenida de los diferentes tipos de muestra por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

7.4. OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA

La materia prima necesaria para la elaboración de la investigación será proporcionada por una empresa productora de productos lácteos, Suero dulce láctico fresco derivado de la producción de queso costeño.

7.5. MATERIALES

- Pipeta
- Bureta

- Erlenmeyer
- Capsula de Níquel

7.5.1. EQUIPOS

- Potenciómetro
- Baño de maría
- Estufa
- Evaporador
- Cromatógrafo

7.5.2. REACTIVOS

- Fenolftaleína
- NAOH
- Acetato de Nitrilo
- NaCL Grado Analítico
- Estándar albúmina (patrón)

7.6. PRUEBAS

7.6.1. Análisis y calidad del lactosuero

El análisis de los alimentos es la disciplina que se ocupa del desarrollo, uso y estudio de los procedimientos analíticos para evaluar las características de los alimentos y de sus componentes. Esta información es crítica para el entendimiento de los factores que determinan las propiedades de los alimentos, así como la habilidad para producir alimentos que sean consistentemente seguros, nutritivos y deseables para el consumidor.

En la tabla 3 se muestra las diferentes pruebas que serán realizadas para determinar la calidad del lactosuero.

7.6.2. Análisis fisicoquímico del Lactosuero

Tabla 3 Análisis fisicoquímico

PRUEBA	EQUIPOS Y REACTIVOS	DESCRIPCIÓN	MARCO LEGAL
Determinación de pH	Potenciómetro (marca Hanna, modelo HI 9126)	Se realizara la medición del pH usando un potenciómetro previamente calibrado que se basa en la medición electrolítica de la actividad de los iones hidrógenos presentes en una muestra.	NTC 399
Prueba de acidez	Solución de fenolftaleína 0.5% Solución de NaOH 0.1N Pipeta aforada Bureta de 10 ml Erlenmeyer	La acidez se determinara a través de valoración ácido base por neutralización, utilizando una solución de hidróxido de sodio 0.1N, expresando los resultados en ácido láctico.	NTC 4978 de 2001
Determinación de solidos totales	Pipeta Capsula de níquel de 5 cm de diámetro Gasa Baño de maría Estufa Desecador	Los sólidos totales serán determinados por medio de desecación en estufa de aire forzada a 100 °C	NTC 4979 de 2001

La Tabla 3 muestra el estudio fisicoquímico aplicado para la caracterización del lactosuero.

Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013

7.7. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

7.7.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DEL LACTOSUERO

Se tomará una cantidad conocida de muestra la cual se pesará previamente antes de evaporar sobre una estufa hasta que seque completamente, luego, dicha muestra se llevará al desecador y se tomará el peso de la muestra final.

Los resultados serán expresados en % Peso / Volumen

$$\% \text{ sólidos totales} = (b + a) / P \times 100$$

7.7.2. EXTRACCIÓN POR EVAPORACIÓN DEL LACTOSUERO Y DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES IDEALES.

La alfa lactoalbúmina se obtendrá por medio de un tratamiento térmico del lactosuero concentrado previamente, a un contenido de materia seca del 20 al 40% en peso (20, 30 y 40%, de 500 ml cada una.); acidificación: pH entre 3 a 3,5. (Rialland & Barbier, 1988). El tratamiento térmico se lleva a cabo a una temperatura no superior a 76°C con una duración de 15 segundos a 1 hora, (temperatura: 50, 60 y 70 °C para cada tipo de muestra concentrada), para precipitar la alfa lactoalbúmina de forma selectiva. Este tratamiento térmico es seguido por la recuperación de la misma en forma de un precipitado, terminando las otras proteínas en forma residual. (Rialland & Barbier, 1988)

7.7.3. VERIFICACIÓN DE LA PUREZA Y EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTO ALBÚMINA

7.7.3.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN EN FASE REVERSA Ó RP – HPLC

Preparación de la Fase Móvil A: Se preparó una solución de Cloruro de Sodio 0,15M, pesando 8.775 gr de Cloruro de Sodio y se completó hasta 1L

Preparación de la Fase Móvil B: Consistió en Acetato de Nitrilo.

La corrida de la muestra se realizó según la tabla 4

Tabla 4. Parámetros para la elución de las proteínas del suero por la RP – HPLC, la columna CLC ODS-C18.

Tiempo (Min)	A(%)	B(%)
0 – 3	64	36
3 – 27	52	48
27 – 30	100	0

A: 0.15 M NaCl, pH: 2.5

B: Acetonitrilo 100%

Tiempo de corrida total: 30 min/muestra

Preparación de Estándar: Se pesó 100 miligramos de alfa lactoalbúmina en un balón aforado de 10 ml y se completó volumen con fase móvil. De esta última se prepararon soluciones seriadas de 1000, 2000, 5000 y 10.000 mg/l para realizar la curva de calibración.

Condiciones Cromatográficas:

Columna: C18, 5 Micrómetro de diámetro de 150 por 4,6

Fase Móvil A: NaCl 0.15M

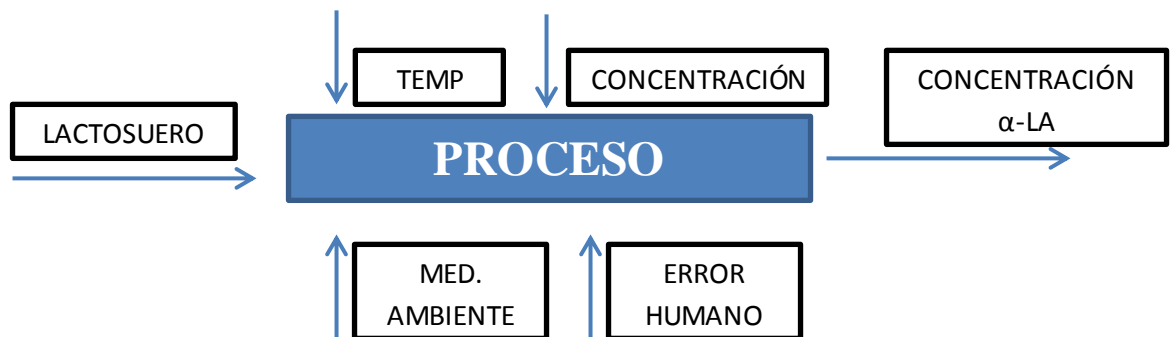
Fase Móvil B: Acetonitrilo

Detector: 280 Nanómetro

Volumen de Inyección: 20 Micro litros

7.8. DISEÑO EXPERIMENTAL

Fig. 5 Modelo proceso Evaluación de rendimiento de la Alfa Lactoalbúmina extraída del Lactosuero dulce evaporado



Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.

La prueba ANOVA es una prueba paramétrica; y como tal, requiere una serie de supuestos para poder ser aplicada correctamente; sirve, no solo para estudiar las dispersiones o varianzas de los grupos, sino para estudiar sus medias y la posibilidad de crear subconjuntos con medias iguales.

Para la elaboración del diseño experimental del proyecto titulado “Evaluación de rendimiento de Alfa Lactoalbúmina extraída del lactosuero dulce evaporado” se cuenta con una hipótesis nula y una hipótesis alternativa denominadas H_0 y H_1 , respectivamente.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8 = \mu_9$$

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5 \neq \mu_6 \neq \mu_7 \neq \mu_8 \neq \mu_9$; donde μ hace referencia a la concentración de alfa lactoalbúmina

La Hipótesis Nula ó H_0 dice que cualquier modificación que se lleve a cabo en las variables controlables van a dar como resultado un mismo valor y la Hipótesis Alternativa ó H_1 afirma que tanto la concentración como la temperatura inicial aplicadas durante el proceso van a afectar directamente a mi concentración de alfa lactoalbúmina final.

TEMPERATURA	1	2	3
50	28493,8749	27831,0462	28492,4255
60	27865,377	26926,9901	28438,6733
70	35352,5336	28265,5406	27774,8305

Tabla 5. Datos Iniciales

7.9. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Con el análisis de este estudio se presentan los resultados de la investigación en la evaluación del rendimiento de la α - La extraída del lactosuero evaporado, dichos resultados se obtuvieron mediante la cromatografía líquida de alta resolución, los resultados se plantean a partir de 9 muestras a diferentes temperaturas y concentraciones, de esta manera se determina la más estable y eficiente.

7.9.1. ANALISIS FISICOQUIMICO

Muestra Inicial: pH= 6.58

Acidez= 0,09% ac. Láctico

Solidos totales: 6 gr/L (100%)

Las muestras restantes se estandarizaron de la siguiente manera:

Tabla 6. Estandarización de las muestras

MUESTRA	pH	%solidos totales	Temperatura °C
1	3.31	40	70
2	3.30	40	50
3	3.31	40	60
4	3.26	30	70
5	3.31	30	50
6	3.30	30	60
7	3.34	20	70
8	3.28	20	50
9	3.32	20	60

En la tabla 6 se muestra las condiciones a las cuales se establecieron las diferentes muestras para su posterior evaluación cromatográfica.

Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013

7.9.2. Cromatografía Líquida de alta Resolución

Concentración de alfa lactoalbúmina contenida en la muestra inicial

C α -La Mi: 43231,3822 mg/L

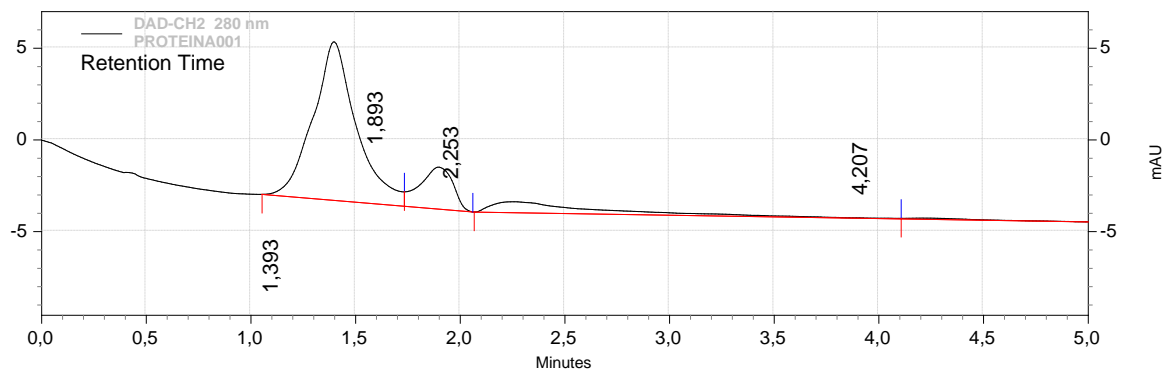
Fig. 6: Cromatograma Estándar 1

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTEINA001.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 25/03/2013 14:15:32

Printed: 27/03/2013 9:12:54



Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013

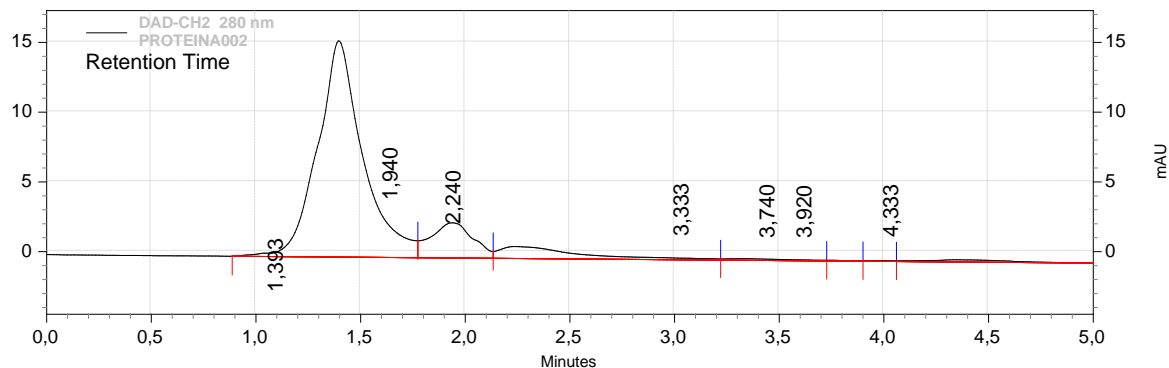
Fig.7: Cromatograma Estándar 2

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTEINA002.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 25/03/2013 14:53:56

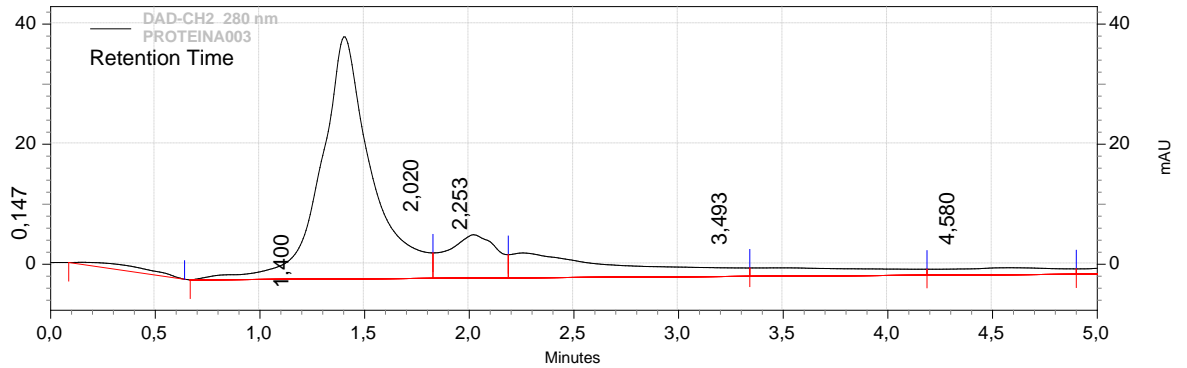
Printed: 27/03/2013 9:16:19



Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013

FIG. 8: Cromatograma Estándar 3

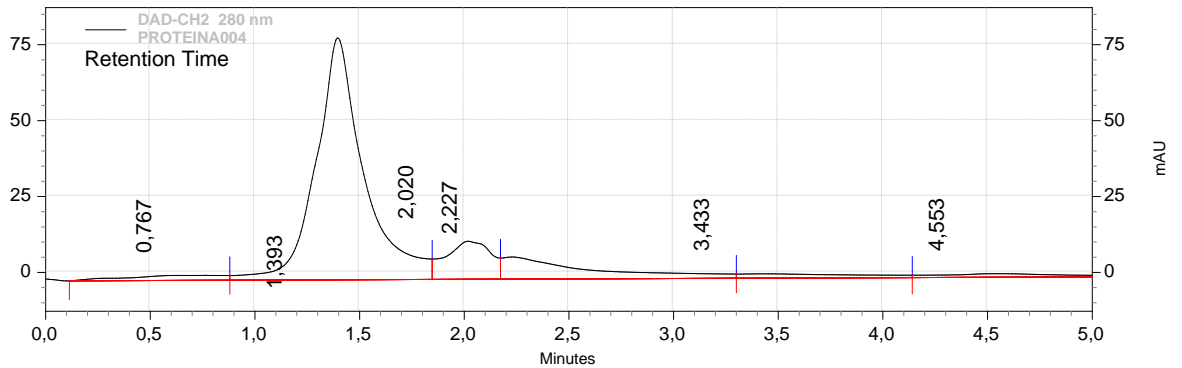
Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTEINA003.dat
Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met
Acquired: 25/03/2013 15:27:22
Printed: 27/03/2013 9:18:10



Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013

FIG. 9: Cromatograma Estándar 4

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTEINA004.dat
Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met
Acquired: 25/03/2013 16:01:21
Printed: 27/03/2013 9:19:39



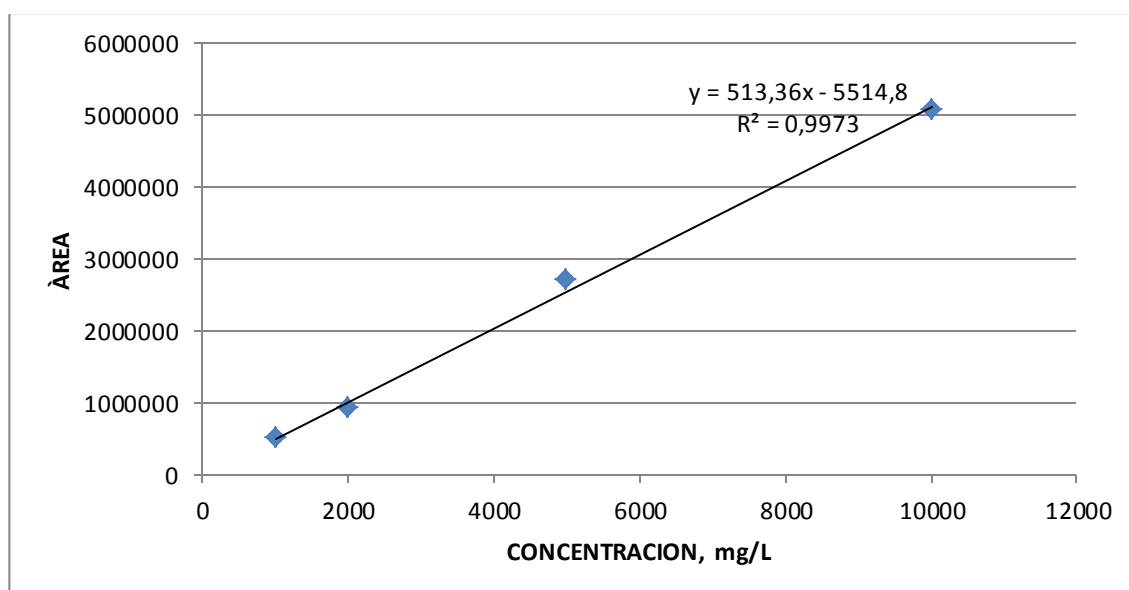
Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013

Tabla 7. Concentración y área de estándar

CONCENTRACION (mg/L)	AREA
1000	500981
2000	932727
5000	2715171
10000	5069479

En la tabla 7 se observa las concentraciones establecida por la muestra estándar para luego con estos resultados llevar a cabo la gráfica de la curva de calibración y poder determinar la ecuación correspondiente a la concentración de alfa lactoalbúmina. Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013

Fig. 10: Curva de Calibración Estándar



Se observa en la fig. 1 la curva de calibración la cual ayuda a determinar la ecuación de concentración de acuerdo al área. Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013

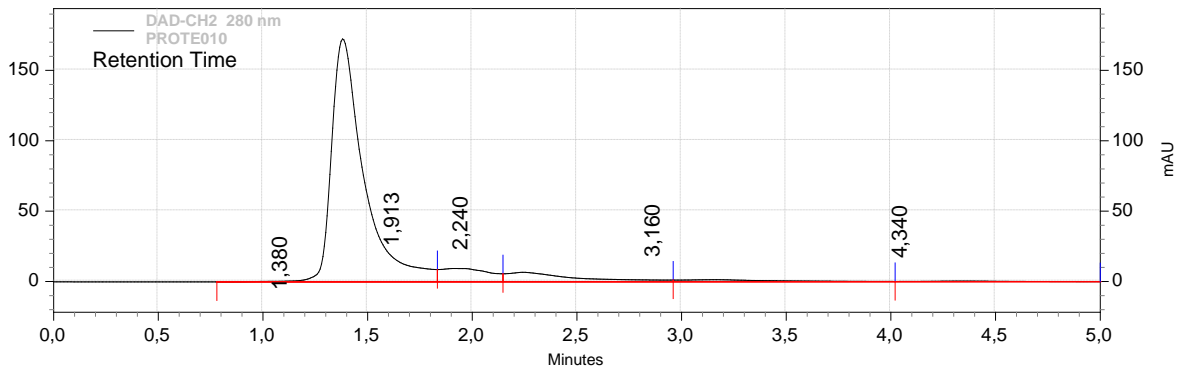
Debido a que el área bajo la curva observada en los cromatogramas es directamente proporcional a la concentración, se puede deducir la siguiente ecuación:

$$X = \frac{y - 5514,8}{513,36}$$

Donde y = Área bajo la curva; X = concentración de α -La

FIG. 11: Cromatograma Muestra Inicial A

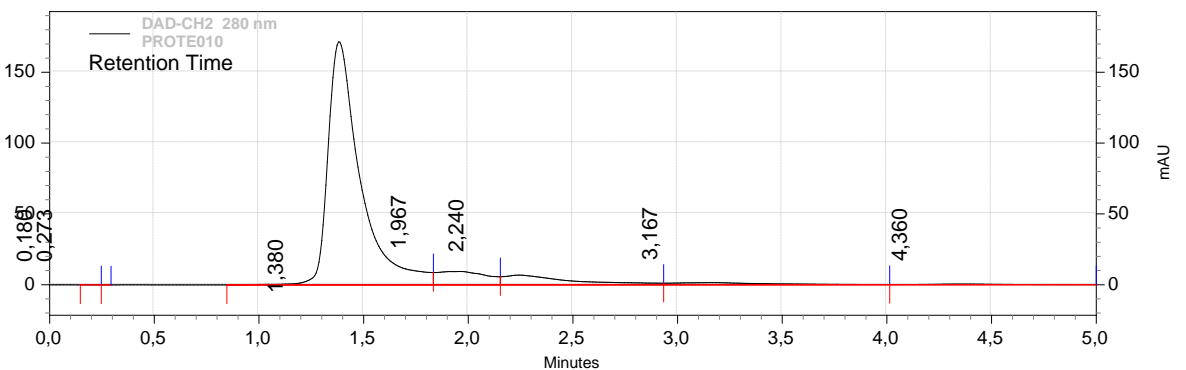
Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE010-Rep1.dat
Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met
Acquired: 26/03/2013 12:53:52
Printed: 27/03/2013 9:43:00



Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013

FIG. 12: Cromatograma Muestra Inicial B

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE010-Rep2.dat
Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met
Acquired: 26/03/2013 13:00:16
Printed: 27/03/2013 9:43:51



Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013

Tabla 8. Resultados de muestras evaluadas por Cromatografía

MUESTRA	AREA	CONCENTRACION MUESTRA (mg/L)	F. DILUCION		MEDIA Y DESVIACIÓN	% ERROR	
MUESTRA 1 ^a	6069701	11835,6	35506,8089	MEDIA	35352,5	CV	0,62
MUESTRA 1B	6016908	11732,8	35198,2583	SD	218,2		
MUESTRA 2 ^a	4881535	9520,8	28562,5307	MEDIA	28493,9	CV	0,34
MUESTRA 2B	4858041	9475,1	28425,2192	SD	97,1		
MUESTRA 3 ^a	4780933	9324,9	27974,5587	MEDIA	27865,4	CV	0,55
MUESTRA 3B	4743571	9252,1	27756,1952	SD	154,4		
MUESTRA 4 ^a	4828386	9417,3	28251,8995	MEDIA	28265,5	CV	0,07
MUESTRA 4B	4833054	9426,4	28279,1818	SD	19,3		
MUESTRA 5 ^a	4750603	9265,8	27797,294	MEDIA	27831,0	CV	0,17
MUESTRA 5B	4762153	9288,3	27864,7984	SD	47,7		
MUESTRA 6 ^a	4600063	8972,5	26917,4576	MEDIA	26927,0	CV	0,05
MUESTRA 6B	4603325	8978,8	26936,5225	SD	13,5		
MUESTRA 7 ^a	4741661	9248,3	27745,0321	MEDIA	27774,8	CV	0,15
MUESTRA 7B	4751858	9268,2	27804,6289	SD	42,1		
MUESTRA 8 ^a	4861660	9482,1	28446,3705	MEDIA	28492,4	CV	0,23
MUESTRA 8B	4877420	9512,8	28538,4804	SD	65,1		
MUESTRA 9 ^a	4861951	9482,7	28448,0713	MEDIA	28438,7	CV	0,05
MUESTRA 9B	4858735	9476,4	28429,2753	SD	13,3		
MUESTRA 10 ^a	7410947	14448,6	43345,7686	MEDIA	43231,4	CV	0,37
MUESTRA 10B	7371804	14372,3	43116,9959	SD	161,8		

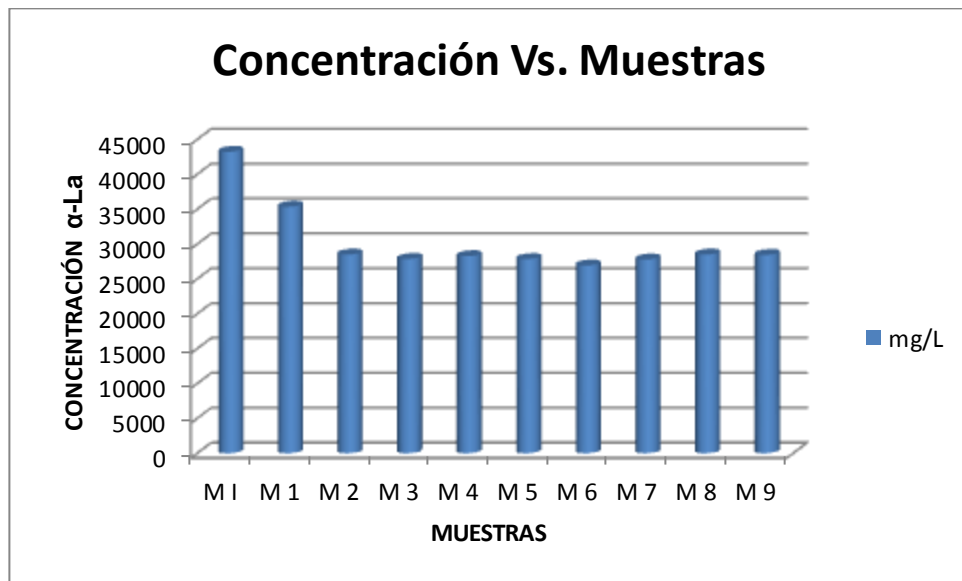
En la tabla 8 se observan los resultados de la cromatografía líquida de alta resolución. Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013.

Tabla 9. Media de las muestras evaluadas por Cromatografía

MUESTRA	mg/L
MUESTRA 1	35352,5336
MUESTRA 2	28493,8749
MUESTRA 3	27865,377
MUESTRA 4	28265,5406
MUESTRA 5	27831,0462
MUESTRA 6	26926,9901
MUESTRA 7	27774,8305
MUESTRA 8	28492,4255
MUESTRA 9	28438,6733
MUESTRA 10	43231,3822

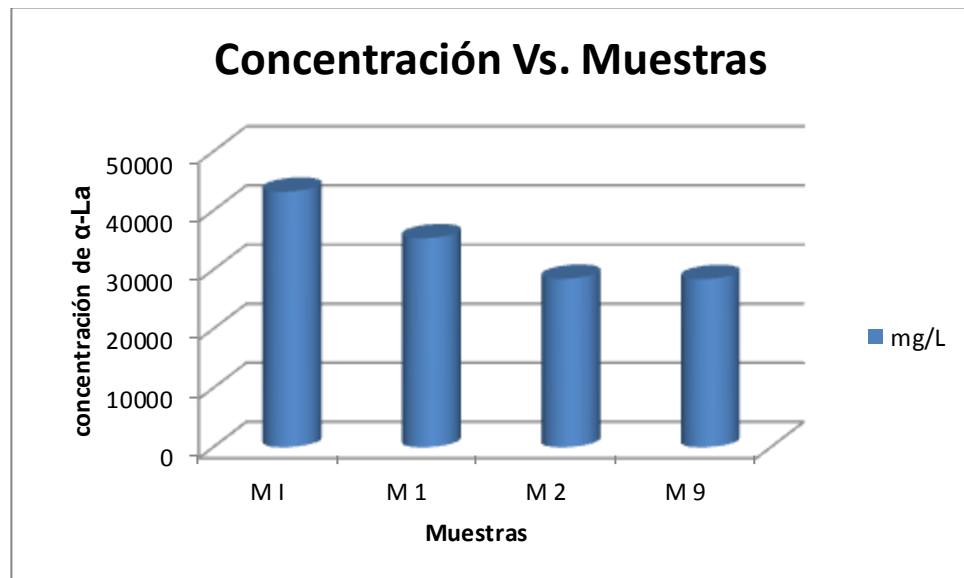
En la tabla 9 podemos observar las medias de concentraciones de cada tipo de muestra. Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013.

Fig. 13. Media de Concentración Vs. Muestras.



En la fig. 13 podemos observar la gráfica de la concentración inicial vs. La concentración obtenida por muestras. Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013.

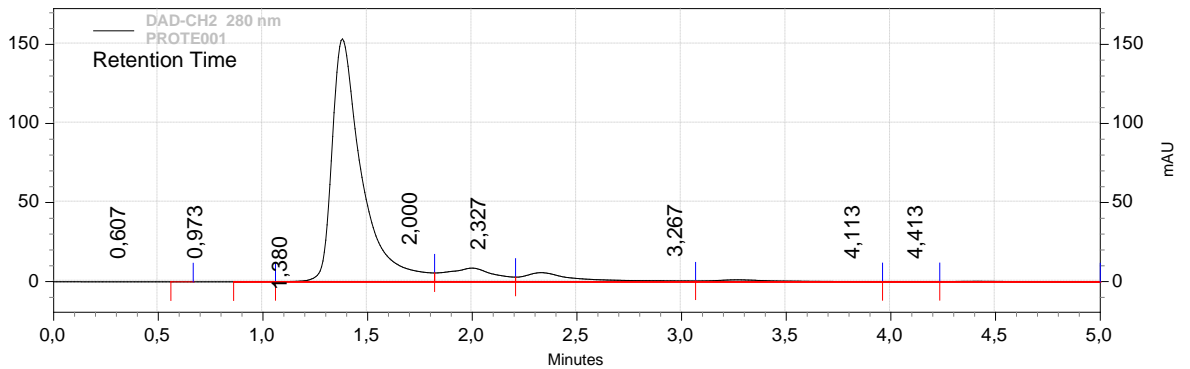
Fig. 14. Media de Concentración Vs. Muestras. Mejores resultados de acuerdo a la temperatura de evaporación.



En la fig. 14 se muestra un resumen con las muestras que obtuvieron mejores resultados de acuerdo a las condiciones a las cuales fueron sometidas. Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013.

FIG. 15: Cromatograma Muestra 1A

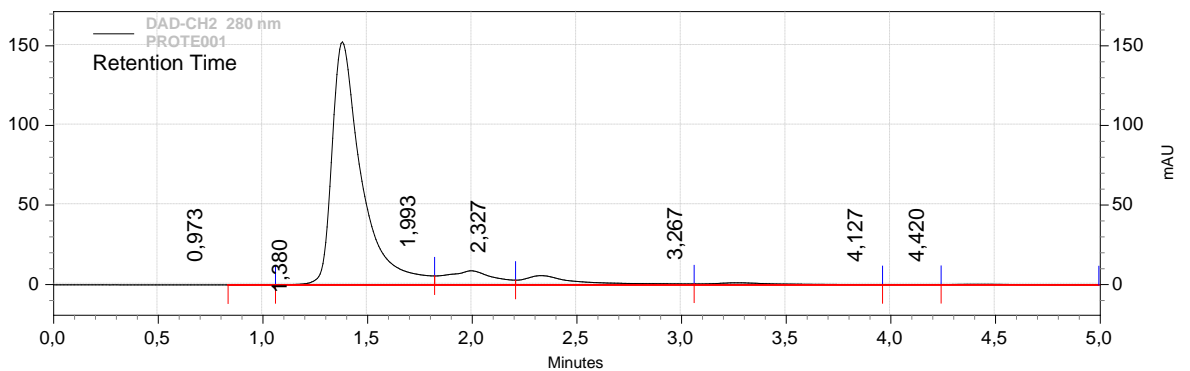
Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE001-Rep1.dat
Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met
Acquired: 26/03/2013 10:58:51
Printed: 27/03/2013 9:25:01



Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013.

FIG. 16: Cromatograma Muestra 1B

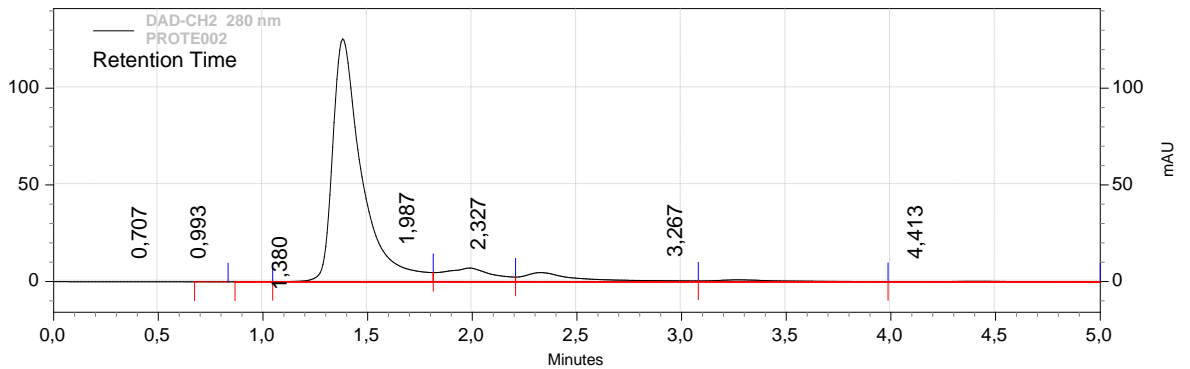
Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE001-Rep2.dat
Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met
Acquired: 26/03/2013 11:05:14
Printed: 27/03/2013 9:26:09



Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013.

FIG. 17: Cromatograma Muestra 2A

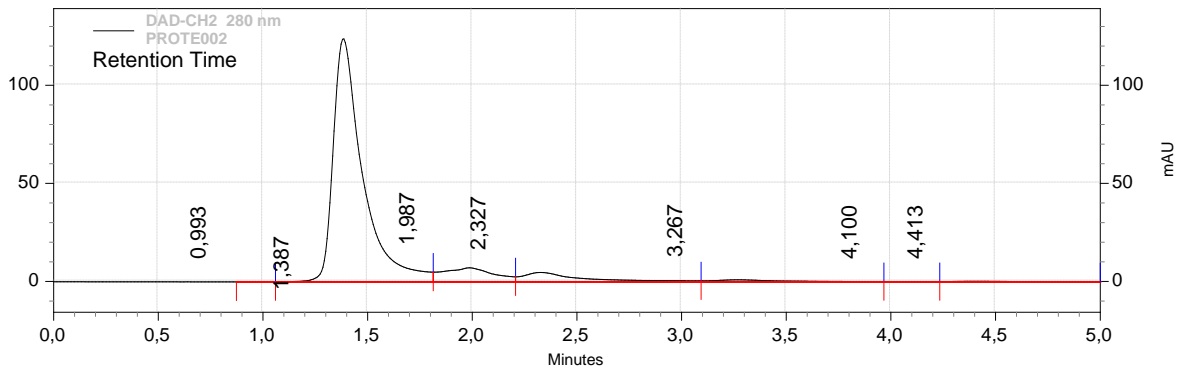
Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE002-Rep1.dat
Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met
Acquired: 26/03/2013 11:11:39
Printed: 27/03/2013 9:27:03



Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013.

FIG. 18: Cromatograma Muestra 2B

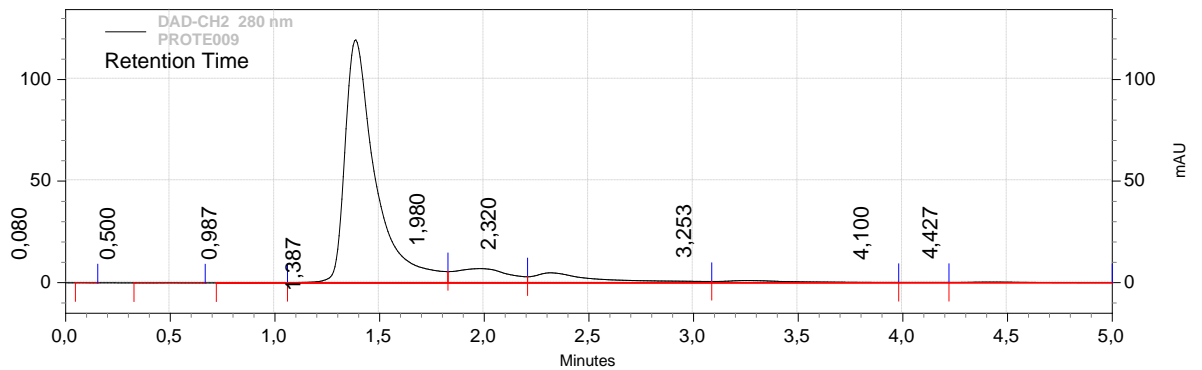
Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE002-Rep2.dat
Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met
Acquired: 26/03/2013 11:18:07
Printed: 27/03/2013 9:28:00



Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013.

FIG. 19: Cromatograma Muestra 9A

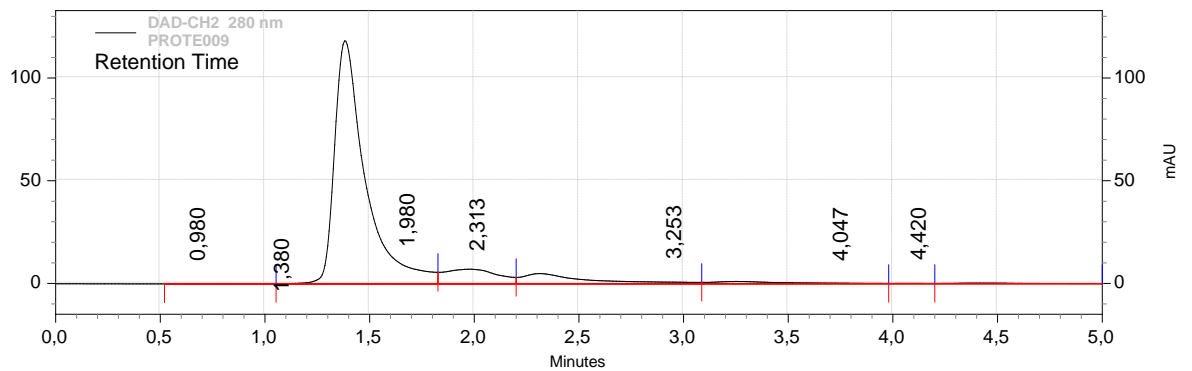
Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE009-Rep1.dat
Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met
Acquired: 26/03/2013 12:41:03
Printed: 27/03/2013 9:40:50



Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013.

FIG. 20: Cromatograma Muestra 9B

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE009-Rep2.dat
Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met
Acquired: 26/03/2013 12:47:28
Printed: 27/03/2013 9:41:50



Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013.

7.9.3. ANALISIS DE VARIANZA DE UN SOLO FACTOR

Tabla 10. Resumen ANOVA

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	91711,7855	30570,59517	17248953,79
Columna 2	3	83023,5769	27674,52563	466303,3761
Columna 3	3	84705,9293	28235,30977	159753,191

En la tabla 10 se muestra el resumen del Método ANOVA para la realización del diseño experimental. Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013

Tabla 11. Análisis de Varianza

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	14155255,49	2	7077627,743	1,187852919	0,36761185	5,14325285
Dentro de los grupos	35750020,71	6	5958336,785			
Total	49905276,2	8				

En la tabla 11 podemos observar el Analisis de Varianza aplicado para este estudio. Fuente: Arroyo & Jiménez, 2013

Para verificar la hipótesis nula, es necesario calcular el F_0 el cual hace referencia al punto porcentual de distribución. Si $F_0 < F_{\text{tabla}}$ se acepta la hipótesis nula.

De acuerdo al libro Diseño y Análisis de experimentos de Montgomery en el apéndice IV se procede a buscar en la pag. 644 de acuerdo a los grados de

libertad los cuales son 2 y 6 y se tiene que $F_0 = 5,14$. Por lo tanto se acepta la Hipótesis Alternativa.

Tabla 12. Supuesto de igualdad de varianza

TEMPERATURA	1	2	3	
50	28493,8749	27831,0462	28492,4255	N
60	27865,377	26926,9901	28438,6733	9
70	35352,5336	28265,5406	27774,8305	A
promedio	30570,59517	27674,5256	28235,3098	3
VARIANZA S^2_i	17248953,79	466303,376	159753,191	
ni	3	3	3	total
$(ni-1)*S^2_i$	34497907,58	932606,752	319506,382	35750020,7
$\log_{10}(S^2_i)$	7,236762759	5,66866856	5,20344954	
$\log_{10}(S^2_P)$	6,775125047			
$(ni-1)*\log_{10}(S^2_i)$	14,47352552	11,3373371	10,4068991	36,2177617
$1/(ni-1)$	0,5	0,5	0,5	
$1/(N-a)$	0,166666667			

S ² P	5958336,785
Q	4,432988563
C	40,05677228
chi-cuadrado(0)	0,254823314
chi-cuadrado(tabla)	5,991464547

Fig. 21. Ecuación Supuestos de igualdad de Varianza

$$\chi_0^2 = 2.3026 \frac{q}{c}$$

$$q = (N-a) \log_{10} S_p^2 - \sum_{i=1}^a (n_i - 1) \log_{10} S_i^2$$

$$c = 1 + \frac{1}{3(a-1)} \left(\sum_{i=1}^a (n_i - 1)^{-1} - (N-a)^{-1} \right)$$

$$S_p^2 = \frac{\sum_{i=1}^a (n_i - 1) S_i^2}{a - 1}$$

Se acepta la Hipótesis Alternativa si, chi cuadrado(o) < chi cuadrado(tabla); por lo tanto, se concluye que los datos cumplen con el supuesto de igualdad de varianza.

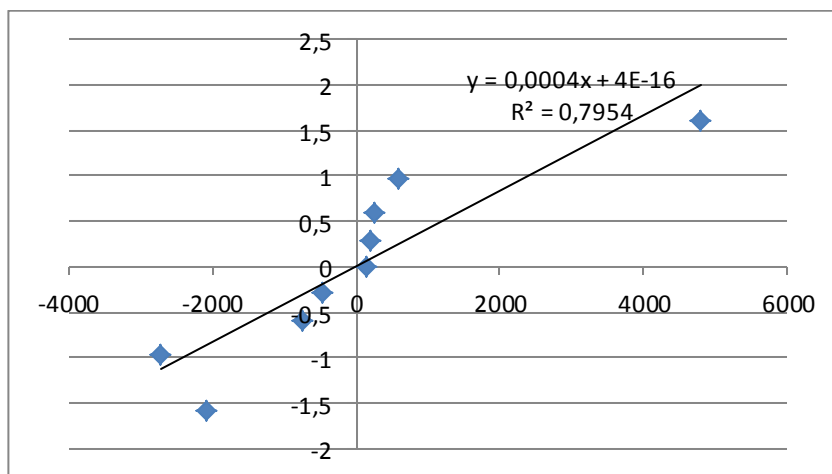
SUPUESTO DE NORMALIDAD

Tabla 13. Supuesto de Normalidad

TEMPRATURA	CONCENTRACION ALA		
50	28493,8749	27831,0462	28492,4255
60	27865,377	26926,9901	28438,6733
70	35352,5336	28265,5406	27774,8305
promedio	30570,5952	27674,5256	28235,3098
Residuales			
-			
2076,72027	156,520567	257,115733	
-			
2705,21817	-747,535533	203,363533	
4781,93843	591,014967	-460,479267	

J	Yij- ordenada	j-0,5/N	Zj	Eij- ordenada	Zi
1	26926,9901	0,05555556	1,59321882	2076,72027	1,59321882
2	27774,8305	0,16666667	0,96742157	2705,21817	0,96742157
3	27831,0462	0,27777778	-0,5894558	747,535533	-0,5894558
4	27865,377	0,38888889	0,28221615	460,479267	0,28221615
5	28265,5406	0,5	0	156,520567	0
6	28438,6733	0,61111111	0,28221615	203,363533	0,28221615
7	28492,4255	0,72222222	0,5894558	257,115733	0,5894558
8	28493,8749	0,83333333	0,96742157	591,014967	0,96742157
9	35352,5336	0,94444444	1,59321882	4781,93843	1,59321882

Fig. 22. Curva de Normalidad



Se acepta el supuesto de normalidad porque los datos se asemejan a un comportamiento lineal.

Observando el valor de referencia inicial de α -La en el lactosuero dulce sin tratamiento térmico, es claro que existe una variación en cuanto a las concentraciones finales de α -La de las diferentes muestras tratadas, con respecto a la temperatura de evaporación; de acuerdo a lo visto en los cromatogramas, se indica que la muestra más eficiente es la que se encuentra a una concentración de 40% sólidos totales y una temperatura de 70°C con un pH de 3,3 ya que fue la que mayor resultados arrojó en cuanto a concentración de α -La por encima de las diferentes muestras.

Tomamos 9 muestras de lactosuero a diferentes concentraciones y temperaturas para medir el rendimiento de la α -La; para esto se determinó la concentración de las mismas por la técnica HPLC con el fin de determinar cuál de las 9 muestras arrojó un mayor % de concentración de la proteína; al realizar las pruebas se dedujo que la muestra que mayor contenido de α -La contenía, fue la muestra número 1, con una concentración de 35352,5336 mg/L

El propósito de esta investigación fue evaluar el rendimiento de la α -La extraída del lactosuero dulce evaporado para determinar las variables ideales en cuanto a temperatura y concentración de este mismo.

El lactosuero posee un contenido proteico del 0,8% en el cual el 0,12% hace referencia específicamente a la alfa lactoalbúmina, lo que corresponde al 15% del contenido total en proteína en el lactosuero.

En el desarrollo experimental de esta investigación, se logró extraer el 12,2% de la alfa lactoalbúmina presente en el lactosuero por el método de concentración por evaporación; observándose un resultado favorable, debido a que se logró extraer más del 75% de la proteína.

Estudios anteriores enfocados en la extracción de la alfa lactoalbúmina por el método de ultrafiltración; por ejemplo, realizado por los autores Konrad G. & Kleinsmichdt T. en el año 2008 en el artículo titulado “A new method for isolation of native alpha lactalbumin from sweet whey”, hacen referencia a la obtención del 15% de la alfa lactoalbúmina presente en el lactosuero; lo que corresponde al 100%, si lo comparamos con el % total de la proteína contenida inicialmente en el suero dulce, mostrando una mayor eficacia comparado con el método utilizado en la presente investigación.

No obstante; cabe resaltar, que el método de extracción de alfa lactoalbúmina por concentración del lactosuero dulce evaporado, es una alternativa bastante eficiente; ya que, como se mencionó anteriormente, con este método se puede extraer más del 75% de la proteína; además, es un método simple y de bajo costo que permite separar selectivamente la alfa lactoalbúmina a partir de las proteínas del suero.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la elaboración del presente proyecto demostraron lo establecido por Railland y Barbier (1988), ya que se encontró que era posible obtener dicha proteína si se sometía el lactosuero a un tratamiento térmico luego de concentrar previamente la muestra a un % de sólidos totales específico.

Durante el proceso, se sometió la muestra a 3 temperaturas y concentraciones diferentes para observar el comportamiento de la proteína, se pudo determinar que estas dos variables controlables juegan un papel muy importante en la realización de esta investigación; obteniendo resultados ascendentes a medida que se aumentaba la concentración y la temperatura. Se pudo observar que la muestra 1 cuyas condiciones eran 70°C de temperatura de concentración y 40 % de sólidos totales, fue la cual mayor concentración de alfa lactoalbúmina contenía con un valor de 35352,5336 mg/l. De acuerdo a lo analizado experimentalmente podemos inferir que el rendimiento depende en gran medida de la temperatura a la cual se somete el lactosuero, ya que estas variables son directamente proporcionales. Además se pudo observar que la temperatura de 70 °C fue la que tuvo un comportamiento definido puesto esta siempre iba en aumento a diferencia de las otras dos temperaturas que no tuvieron un comportamiento lineal.

9. RECOMENDACIONES

- Mejorar el método de concentración de la alfa lactoalbúmina.
- Indagar otros métodos para evaluar el rendimiento de la proteína
- Aumentar el número de muestras y trabajar cada concentración con cada temperatura por triplicado.
- Continuar con el propósito de la investigación el cual es la aplicación en la nanotecnología para la formación de nanotubos de alfa lactoalbúmina.
- Profundizar la investigación planteando nuevos y diferentes procesos para la mejora del proyecto.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGUILERA JM. 2005. Why food microstructure. J Food Eng 67(1–2):3–11.

ALOMIRAH F., ALLI I. (2004) Separation and characterization of

ANDREWS, M. TAYLOR, A. OWEN.(1985). Rapid analysis of bovine milk proteins by fast protein liquid chromatography.

Approximate Distribution of milk components between cheese and whey .
[Artículo de internet].

<http://www.cdr.wisc.edu/programs/dairyingredients/pdf/approx>. [02 de mayo de 2013].

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMIST.A.O.A.C
(2005).official method: pH of acidified 18 Th Ed, (A.O.A.C 981.12)

BIKKER, J.F., ANEMA, S.G., LI, Y. & HILL, J.P. (2000) Thermal denaturation of β -lactoglobulin A, B and C in heated skim milk.Milchwissenschaft, 55, 609-613.

CARERI M. MANGIA A. (2003). Analysis of food proteins and peptides by chromatography and mass spectrometry.

CHRISTIAN G. (2009) Química Analítica Sexta Edición Ed. Mc Graw Hill.

DUPONT D. (2011). Milk proteins – Analytical Methods.

FRANCHI O. Suero de leche, propiedades y usos. Innovación en la industria láctea. [Artículo de internet]. <http://es.scribd.com/doc/47261459/2/Tipos-de-suero-de-leche-y-sus-componentes>. [Consulta agosto 4 de 2012].

GARCÍA M., MARINA M., TORRE M. (1998). Ultrarapid detection of bovine whey proteins in powdered soybean milk by perfusión reversed – phase high – performance liquid chromatography.

GERBERDING S., BYERS C. (1998). Preparative ion – exchange chromatography of proteins from dairy whey.

GIRALDO, E. GARCÍA, J. COIMBRA, W. LUERA (2010). Separation of Whey Proteins for Chromatography Liquid.

GRAVELAND-BIKKER & C.G. DE KRUIF. Unique milk protein based nanotubes: Food and nanotechnology meet. (2006)

GRAVELAND-BIKKER, J. F., & DE KRUIF, C. G. (submitted for publication-a). Cation triggered tubular self-assembly of hydrolysed α -lactalbumin.

GRAVELAND-BIKKER, J. F., & DE KRUIF, C. G. (submitted for publication-b). Kinetics of α -lactalbumin nanotube self assembly and disassembly.

GRAVELAND-BIKKER, J. F., FRITZ, G., GLATTER, O., & DE KRUIF, C. G. (2006). Growth and structure of α -lactalbumin nanotubes. Journal of Applied Crystallography (in press).

GRAVELAND-BIKKER, J. F., IPSEN, R., OTTE, J., & DE KRUIF, C. G. (2004). Influence of calcium on the self-assembly of partially hydrolyzed alpha-lactalbumin. *Langmuir*, 20(16), 6841–6846.

GRAVELAND-BIKKER, J. F., KONING, R. I., KOERTEN, H. K., GEELS, R. B. J., HEEREN, R. M. A., & DE KRUIF, C. G. (submitted for publication).

ALactalbumin nanotubes are formed by b-sheet stacking.

GUERRERO W, GOMEZ C, CASTRO J, GONZÁLEZ C, SANTOS E.

Caracterización fisicoquímica del lactosuero en el valle de Tulancingo [Artículo de internet].

http://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icbi/LI_FisicAlim/Carlos_Aldapa/3.pdf.

[Consulta noviembre 27 de 2012]

GUIZIOU., DAUFIN G., TIMMER M., ALLERSMA D., & VAN DER HORST, C. (1999). Process steps for the preparation of purified fractions of alactalbumin and b-lactoglobulin from whey protein concentrates. *Journal of Dairy Research*, 66(2), 225–236.

HAU J., BOVETTO L. (2001) Characterisation of modified whey protein in milk ingredients by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. B – lactoglobulin and alpha lactalbumin from whey and whey protein preparations.

HARRIS R. (1991). *Protein Purification: principles, high resolution methods and applications*.

IGARASHI Y. (1995) An improved procedure for the preliminary fractionation of milk proteins. *International Dairy Journal*. Vol (5) 305–310.

IMAFIDON G. I., FARKYE N., Y., SPANIER, A. (1997). Isolation, purification and alteration of some functional groups of major milk proteins: A review. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37(7), 663–689.

JELLEN P. (2002) WHEY PROCESSING Utilization and Products. Encyclopedia of Dairy Sciences , 2739–2745.

JOCHENWEISS, PH.D., PAUL TAKHISTOV, PH.D., AND D. JULIANMCCLEMENTS, PH.D. *Functional Materials in Food Nanotechnology.*

KINSELLA J.E., WHITEHEAD D.M. (1989) Proteins in Whey: Chemical, Physical, and Functional Properties.

KONRAD G., KLEINSMICHDT T. (2008) A new method for isolation of native alpha lactalbumin from sweet whey. *International Dairy Journal*, 47-54

LÈONIL J., GAGNAIRE V., MOLLE´ D., PEZENNEC S., BOUHALLAB S. (2000). Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of food proteins and derived peptides.

LUCENA M., ALVAREZ S., MENENDEZ C, RIERA F., ÁLVAREZ R. (2007). Alpha lactalbumin precipitation from comercial whey protein concentrates.

MATTHEWS M.E. (1984). Whey Protein Recovery Processes and Products. Journal of Dairy Science, Vol (67) 2680–2692.

MONTGOMERY. (2004). *Diseño y Análisis de Experimentos.* Apendice IV. Pag g44.

MUÑI A, PAEZ G, FARIA J, FERRER J, RAMONES E. Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración de lactosuero. Rev. Cient. FCV-LUZ. 2005; vol. 15 (4): 361-367.

PARRA R. Lactosuero: Importancia en la industria de alimentos. Rev. Fac. Nal. Agr. 2009; vol. 62 (1): 4967-4982 p.

PEARCE R. (1995). Enriched whey protein fractions and method for the production thereof (Patent No: US5455331). Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization.

PEARCE R. (1995). Enriched whey protein fraction and method for the production thereof.

PEDERSEN L., MOLLERUP M., HANSEN E., JUNGBAUER A. (2003). Whey proteins as a model system for chromatographic separation of proteins.

RIALLAND J., BARBIER J. (1988). Process for selectively separating the alpha-lactalbumin from the proteins of whey.

SKOOG; HOLLER J., CROUCH S., (2010) Principios de Análisis Instrumental Sexta Edición. Ed. CENGAGE Learning.

SOZER N., KOKINI J. (2008) Nanotechnology and its applications in the food sector. Illinois Agricultural Experiment Station.

TAKERUCHI N. (2009) Nanociencia y Nanotecnología. Ed. La ciencia /222 para todos.

WALTON, REYES J. (2005). Análisis Químico e Instrumental Moderno Ed. Reverté

WALLEN % MEOW – CHAN FENG (2001). Relaciones Químicas entre organismos: Aspectos básicos y perspectivas de aplicación.

YAGUCHI M., ROSE D. (1971) Chromatographic Separation of milk Proteins: A. Review.

YASHIN Y., YASHIN A. (2012) Chapter 10 – Liquid Chromatography.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

ANEXOS

United States Patent [19]

[11] **Patent Number:** 4,782,138

Rialland et al.

[45] **Date of Patent:** Nov. 1, 1988

[54] **PROCESS FOR SELECTIVELY SEPARATING THE ALPHA-LACTALBUMIN FROM THE PROTEINS OF WHEY**

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

2155696 6/1973 Fed. Rep. of Germany .
1313085 4/1973 United Kingdom .

[75] **Inventors:** Jean-Paul Rialland, Retiers;
Jean-Pierre Barbier, St-Erblon, both of France

OTHER PUBLICATIONS

Chem. Abstracts, 85, 76484m, Marshall et al, 1976.

[73] **Assignee:** Laiteries E. Bridel, s.a., Retiers, France

Primary Examiner—Howard E. Schain
Attorney, Agent, or Firm—Mason, Fenwick & Lawrence

[21] **Appl. No.:** 876,491

[57] **ABSTRACT**

[22] **Filed:** Jun. 17, 1986

This invention relates to a process for selectively separating the alpha-lactalbumin from the proteins of whey; the process comprises a heat treatment of the whey previously concentrated to a dry matter content of 10 to 40% by weight, and acidified to a pH of less than 4, preferably from 3 to 3.5, said heat treatment being carried out at a temperature not exceeding 75° C., preferably from 45° to 75° C., for a duration of 15 seconds to 1 hour so as selectively to precipitate the alpha-lactalbumin; this heat treatment is followed by the recovery of the alpha-lactalbumin in the form of a precipitate and possibly of the other lacto-proteins remaining in solution in the residual whey. The process presents the advantage of being simple to carry out and being of low cost.

[30] **Foreign Application Priority Data**

Jun. 17, 1985 [FR] France 85 09153

[51] **Int. Cl.⁴** A23J 1/20

[52] **U.S. Cl.** 530/366; 426/543;
426/657; 530/410; 530/416; 530/833

[58] **Field of Search** 530/366, 410, 416, 833;
426/657

[56] **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

3,423,208 1/1969 Kuipers 530/833 X
3,728,327 4/1973 Frazeur et al. 530/378
3,930,039 12/1975 Kuipers 530/833 X
4,352,828 10/1982 Rialland et al. 530/416 X
4,485,040 11/1984 Roger et al. 530/366

9 Claims, 1 Drawing Sheet

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO



US005455331A

United States Patent [19]

[11] **Patent Number:** **5,455,331**

Pearce

[45] **Date of Patent:** **Oct. 3, 1995**

[54] **ENRICHED WHEY PROTEIN FRACTIONS AND METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF**

OTHER PUBLICATIONS

[75] Inventor: **Robert J. Pearce**, Beaumaris, Australia

Harwalkar, *Milchwissenschaft* vol. 41 (4) pp. 206-209 (1986).

[73] Assignee: **Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation**, Australian Capital Territory, Australia

Amundson et al., *J. Food Process Preserv.* vol. 6 (2) pp. 55-72 (1982).

[21] Appl. No.: **76,702**

Pearce, R. J., "Fractionation of Whey Proteins" *Australian Journal of Dairy Technology*, vol. 2298, No. 42, 75-78 (1987).

[22] Filed: **Jun. 15, 1993**

Pearce, R. J., "Thermal Separation of β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin in Bovine Cheddar Cheese Whey", *Australian Journal of Dairy Technology*, vol. 38, 144-148 (Dec. 1983).

Related U.S. Application Data

Patent Abstracts of Japan, JP-61-268138, C-417, p. 142, Nov. 27, 1986.

[63] Continuation of Ser. No. 439,045, filed as PCT/AU88/00141 May 13, 88, abandoned.

Primary Examiner—Jeffrey E. Russel

Attorney, Agent, or Firm—Sughrue, Mion, Zinn, Macpeak & Seas

[30] **Foreign Application Priority Data**

May 14, 1987 [AU] Australia PI 1886/87

[57] **ABSTRACT**

[51] **Int. Cl.⁶** **C07K 1/34; C07K 14/47; C07K 14/76**

Whey protein fractions, especially alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin, are produced by a process which comprises the steps of: (a) treating the whey to achieve a reduction in the specific gravity and ionic strength of the whey to levels which should not be less than 25% of their original values; (b) adjusting the pH of the whey to a value in the range 3.80 to 5.50 by the addition of acid; the above steps being carried out in any order; (c) heating the pH-adjusted whey to a temperature in the range 55°-70° C., and maintaining the whey at that temperature for a period greater than 30 seconds and sufficient to permit aggregation of a portion of the protein content of the whey; (d) cooling the whey to a temperature less than 55° C., and maintaining the whey at that temperature for a period of time sufficient to permit flocculation of the aggregated protein; (e) separating the aggregated protein containing alpha-lactalbumin from the mother liquor; and (f) optionally, recovering beta-lactoglobulin and/or other soluble proteins from the mother liquor.

[52] **U.S. Cl.** **530/366; 530/386; 530/414; 530/833**

[58] **Field of Search** **530/350, 365, 530/366, 369, 386, 395, 414, 424, 833**

[56] **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

2,023,014 12/1935 Flanigan et al. 530/365
4,485,040 11/1984 Roger et al. 530/366
4,782,138 11/1988 Rialland et al. 530/410

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

7771981 5/1986 Australia .
5887686 12/1986 Australia .
143966 12/1969 New Zealand .
216567 6/1986 New Zealand .
1402977 8/1975 United Kingdom .

35 Claims, 1 Drawing Sheet

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

IV. Puntos porcentuales de la distribución F (continuación)

F_1	$F_{0.05, F_1, F_2}$																				F_2
	Grados de libertad del numerador (r_1)																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞		
2	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0	249.1	250.4	251.1	252.2	253.3	254.3	254.3	
3	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45	19.45	19.46	19.47	19.48	19.49	19.50	19.50	
4	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	8.57	8.55	8.53	8.53	
5	7.21	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63	5.63	
6	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40	4.36	4.36	
7	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67	3.67	
8	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23	3.23	
9	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93	2.93	
10	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71	2.71	
11	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54	2.54	
12	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45	2.40	2.40	
13	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34	2.30	2.30	
14	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	2.30	2.25	2.21	2.21	
15	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18	2.13	2.13	
16	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	2.16	2.11	2.07	2.07	
17	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01	2.01	
18	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	2.06	2.01	1.96	1.96	
19	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	2.02	1.97	1.92	1.92	
20	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93	1.88	1.88	
21	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	1.95	1.90	1.84	1.84	
22	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87	1.81	1.81	
23	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.78	1.78	
24	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	1.86	1.81	1.76	1.76	
25	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79	1.73	1.73	
26	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77	1.71	1.71	
27	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15	2.07	1.99	1.95	1.90	1.85	1.80	1.75	1.69	1.69	
28	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.84	1.79	1.73	1.67	1.67	
29	4.20	3.34	2.95	2.71	2.55	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.82	1.77	1.71	1.65	1.65	
30	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.81	1.75	1.70	1.64	1.64	
40	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	1.74	1.68	1.62	1.62	
60	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69	1.64	1.58	1.51	1.51	
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	1.45	1.39	1.32	1.32	
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.39	1.32	1.22	1.10	1.10	

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAÍDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

APLICACIONES ACTUALES Y PROYECTADAS DE LA NANOTECNOLOGÍA PARA EL SECTOR ALIMENTARIO

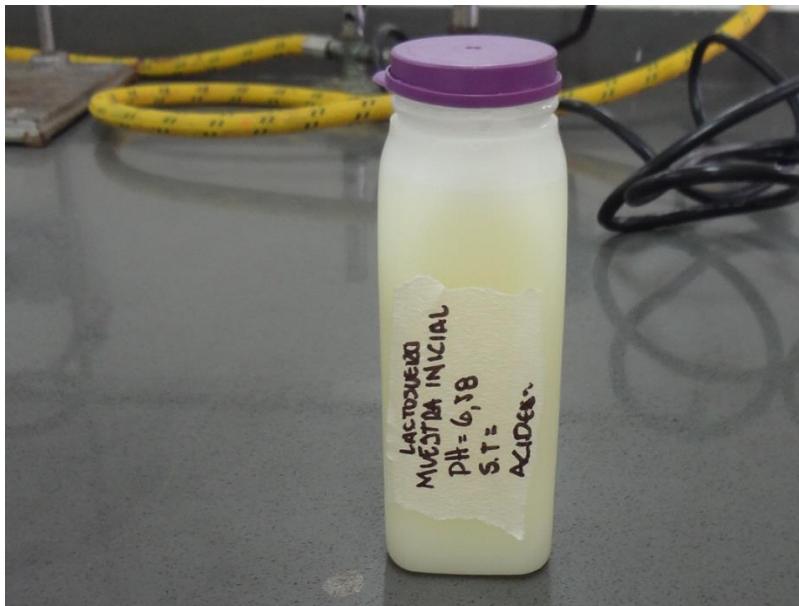
Las aplicaciones actuales y a corto plazo, previstas en el área de la nanotecnología en el sector alimentario, son los ingredientes a nano escala o nano encapsulado, aditivos para la alimentación y bebidas saludables. (Castillo & Watkins, 2010) La nanotecnología tiene impacto potencial en muchos aspectos del sistema alimentario y agrícola; como es la seguridad alimentaria, las nuevas herramientas de biología molecular y celular, nuevos materiales para la detección de patógenos y la protección del medioambiente son ejemplos de los importantes vínculos de la nanotecnología y la ingeniería de alimentos. (Blundell & Hurlby 1987; Aguilera 2005).

Por esto la importancia en la nanotecnología de ciertas proteínas globulares de la leche (como la α -lacto albúmina hidrolizada) ya que esta se puede hacer libre para ensamblar nanotubos de estructura similar en las condiciones ambientales adecuadas. (Graveland & Kruif, 2010). La mayoría de las investigaciones de la nanotecnología se centran en el desarrollo de aplicaciones en las ciencias biológicas y en ingeniería de alimentos siendo cuatro áreas principales en la producción de alimentos las que se benefician de la nanotecnología: el desarrollo de nuevos materiales funcionales, el procesamiento en micro y nano escala, el desarrollo de nuevos productos y el diseño de métodos para la seguridad alimentaria y la bioseguridad (Blundell & Thurlby, 1987; Aguilera 2005).

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO



**Concentración de lactosuero.
Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013**

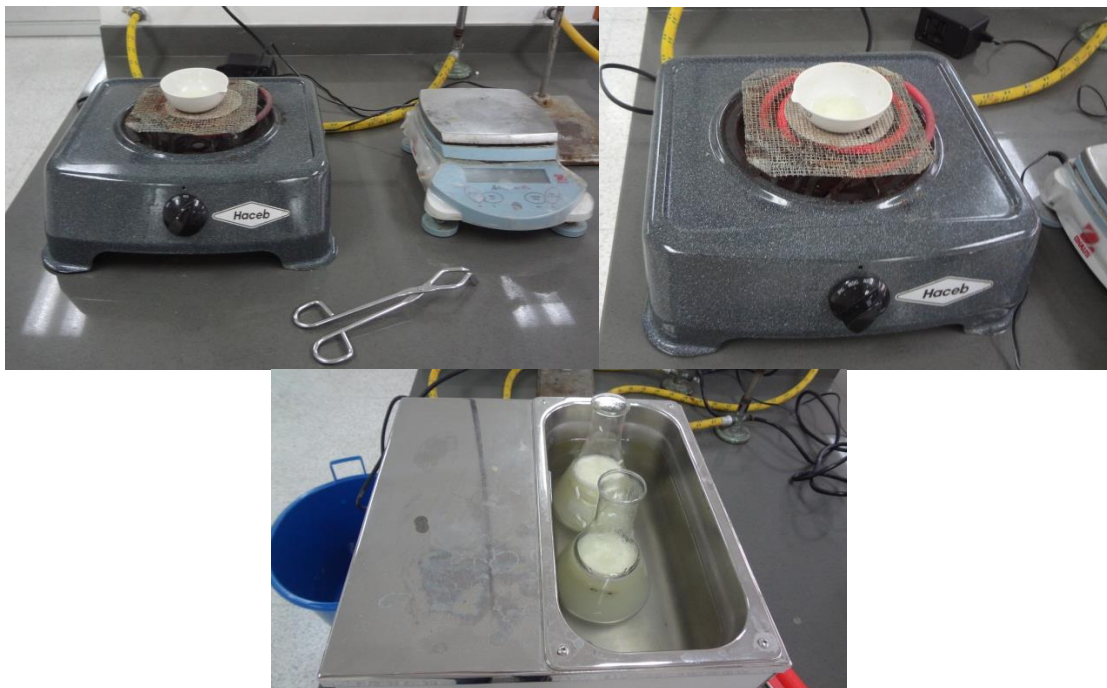


**Muestra Inicial sin ningún tratamiento.
Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013**

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO



Materiales y Equipos Utilizados.
Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013

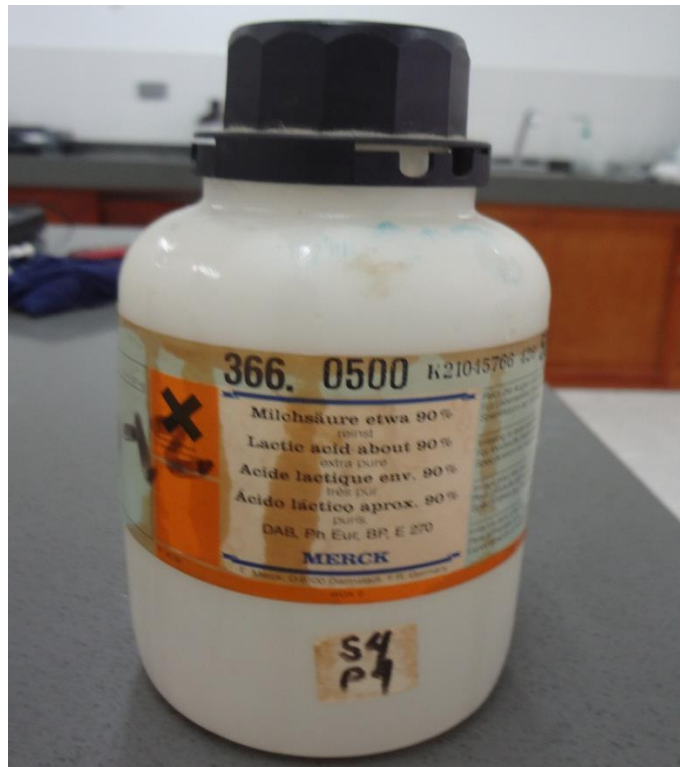


Concentración de las muestras.
Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

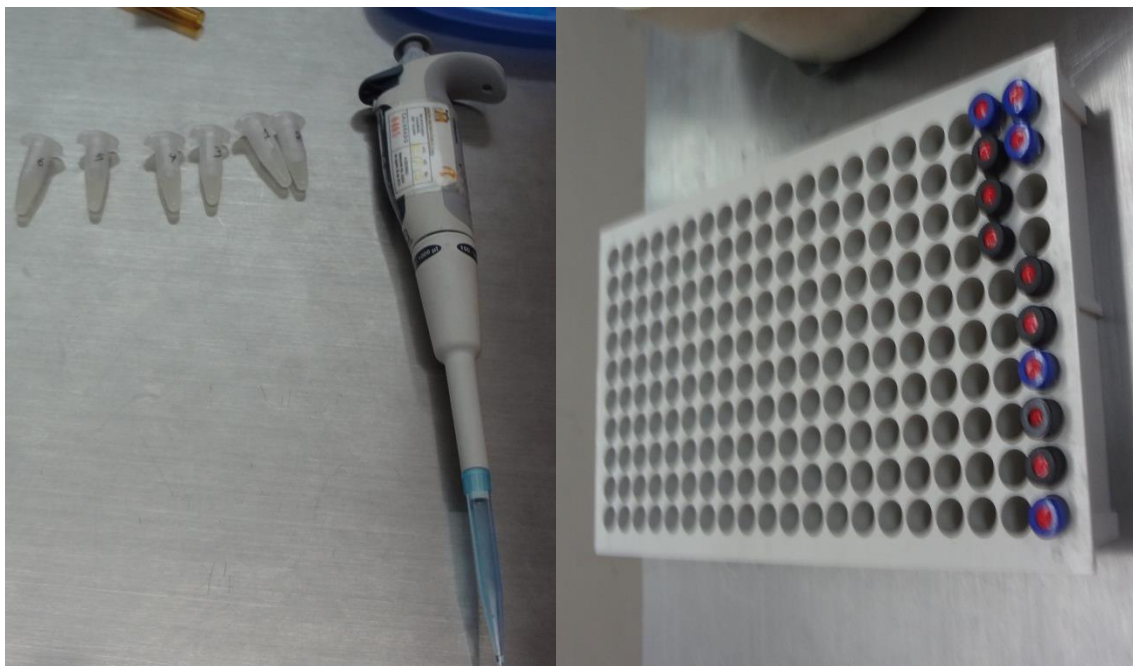
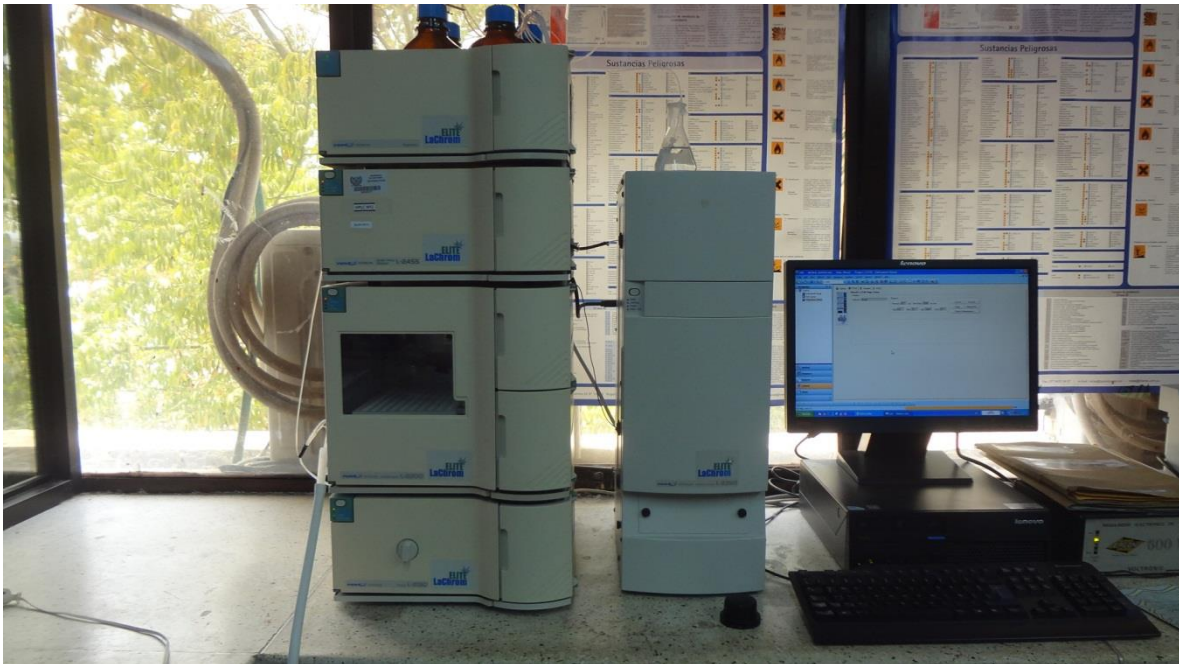


Acidificación de las Muestras.
Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013



Ácido Láctico.
Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO



Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC
Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

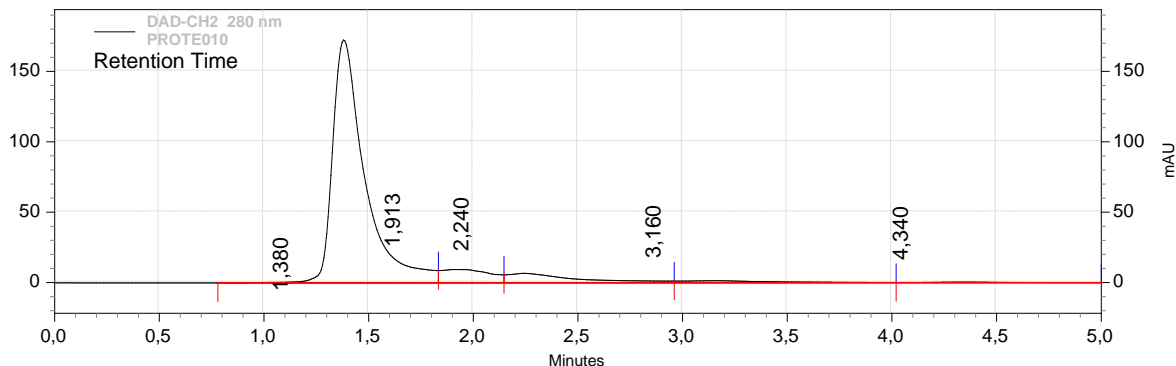
MUESTRA INICIAL A

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE010-Rep1.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 26/03/2013 12:53:52

Printed: 27/03/2013 9:43:00



DAD-CH2 280 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1,380	7410947	83,63	690132	90,54
1,913	612657	6,91	37815	4,96
2,240	608368	6,86	26861	3,52
3,160	184597	2,08	5799	0,76
4,340	45373	0,51	1600	0,21

Totals	8861942	100,00	762207	100,00
--------	---------	--------	--------	--------

Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

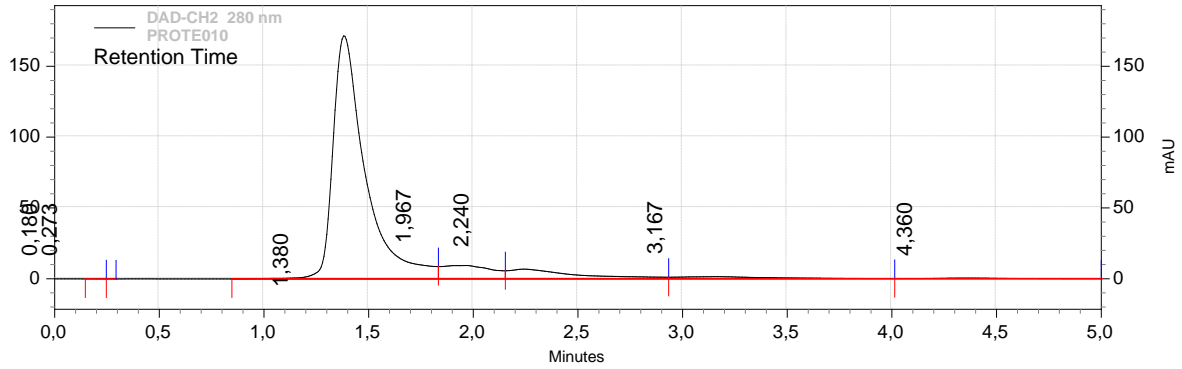
MUESTRA INICIAL B

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE010-Rep2.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 26/03/2013 13:00:16

Printed: 27/03/2013 9:43:51



DAD-CH2 280 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0,180	107	0,00	30	0,00
0,273	35	0,00	17	0,00
1,380	7371804	83,46	686018	90,41
1,967	623523	7,06	37663	4,96
2,240	600206	6,80	27299	3,60
3,167	191921	2,17	6034	0,80
4,360	45263	0,51	1693	0,22

Totals	8832859	100,00	758754	100,00
--------	---------	--------	--------	--------

Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

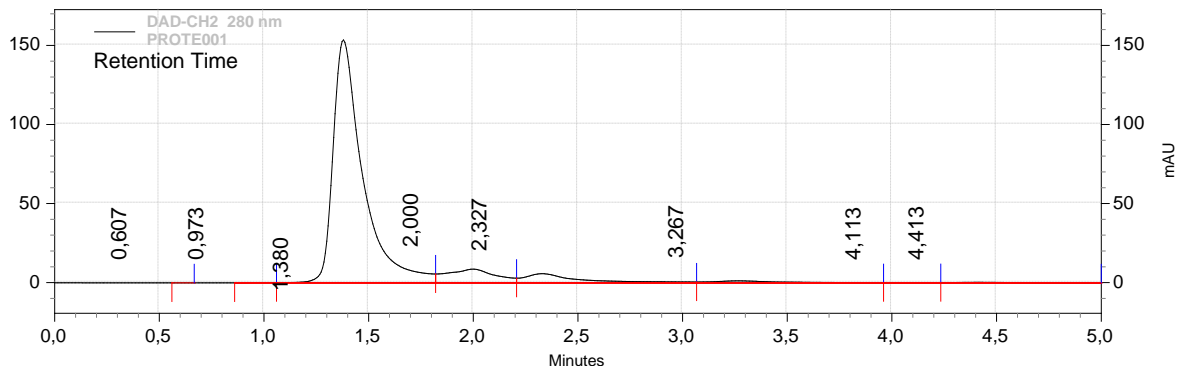
MUESTRA 1A

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE001-Rep1.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 26/03/2013 10:58:51

Printed: 27/03/2013 9:25:01



DAD-CH2 280 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0,607	61	0,00	19	0,00
0,973	5048	0,07	654	0,10
1,380	6069701	84,16	614351	90,34
2,000	559490	7,76	34632	5,09
2,327	418310	5,80	23166	3,41
3,267	118309	1,64	5027	0,74
4,113	11524	0,16	799	0,12
4,413	29445	0,41	1398	0,21

Totals	7211888	100,00	680046	100,00
--------	---------	--------	--------	--------

Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

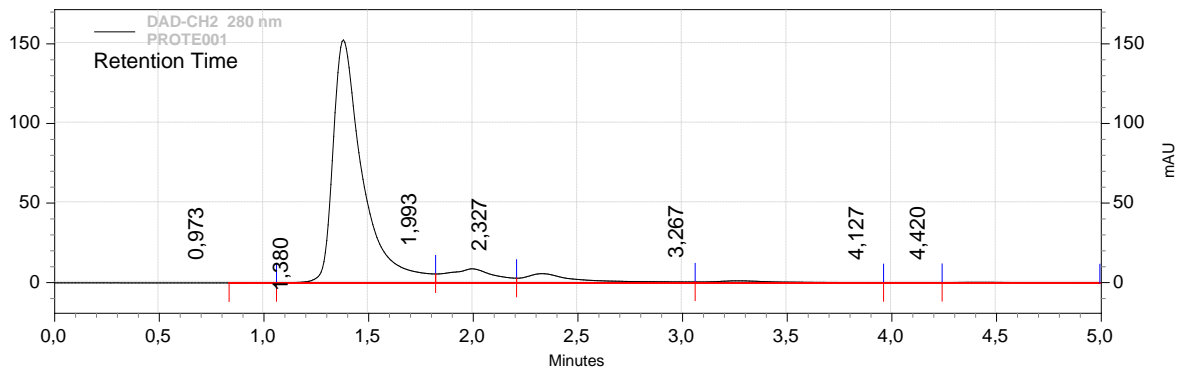
MUESTRA 1B

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE001-Rep2.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 26/03/2013 11:05:14

Printed: 27/03/2013 9:26:09



DAD-CH2 280 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0,973	5205	0,07	681	0,10
1,380	6016908	84,08	610528	90,19
1,993	557696	7,79	35323	5,22
2,327	416709	5,82	23142	3,42
3,267	118216	1,65	5039	0,74
4,127	11638	0,16	781	0,12
4,420	29811	0,42	1412	0,21

Totals	7156183	100,00	676906	100,00
--------	---------	--------	--------	--------

Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

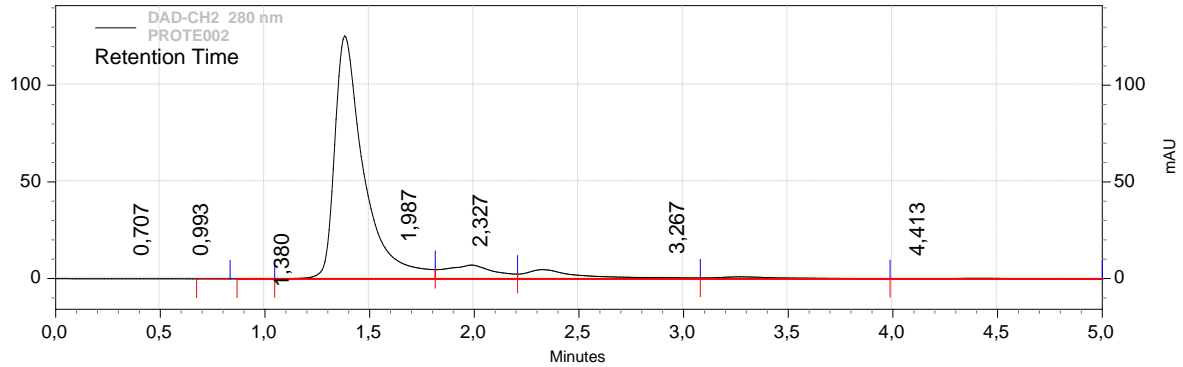
MUESTRA 2A

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE002-Rep1.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 26/03/2013 11:11:39

Printed: 27/03/2013 9:27:03



DAD-CH2 280 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0,707	119	0,00	20	0,00
0,993	2496	0,04	364	0,07
1,380	4881535	83,56	502573	90,41
1,987	463601	7,94	28517	5,13
2,327	356441	6,10	19035	3,42
3,267	101766	1,74	4087	0,74
4,413	36081	0,62	1260	0,23

Totals	5842039	100,00	555856	100,00
--------	---------	--------	--------	--------

Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

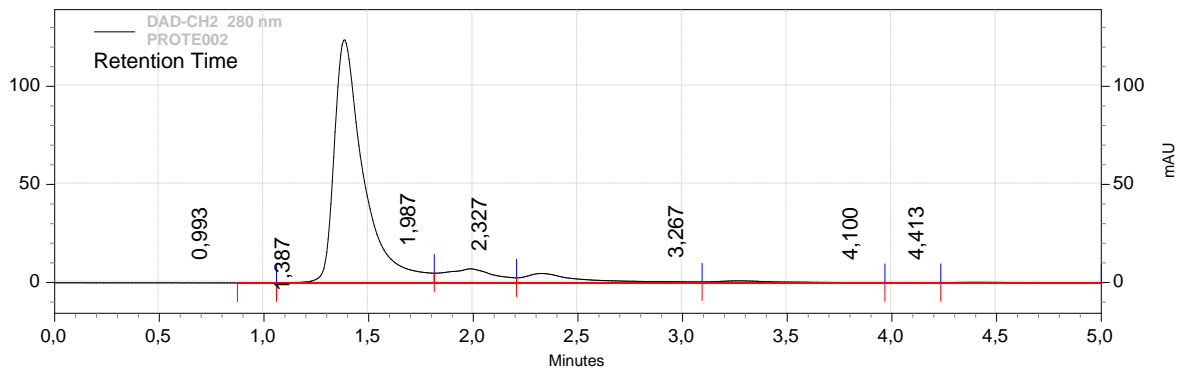
MUESTRA 2B

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE002-Rep2.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 26/03/2013 11:18:07

Printed: 27/03/2013 9:28:00



DAD-CH2 280 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0,993	2948	0,05	380	0,07
1,387	4858041	83,07	495296	90,16
1,987	478177	8,18	28580	5,20
2,327	373907	6,39	19161	3,49
3,267	98435	1,68	4097	0,75
4,100	9609	0,16	641	0,12
4,413	26786	0,46	1224	0,22

Totals	5847903	100,00	549379	100,00
--------	---------	--------	--------	--------

Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

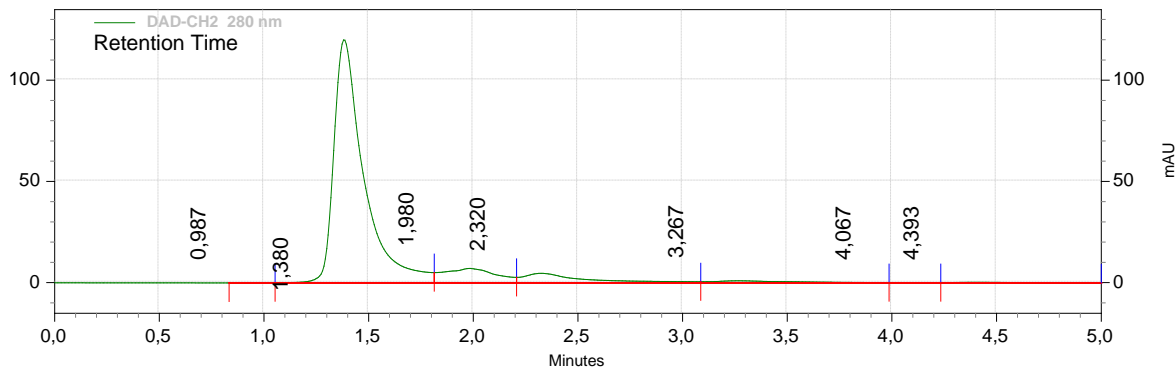
MUESTRA 3A

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE003-Rep1.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 26/03/2013 11:24:35

Printed: 27/03/2013 9:29:20



DAD-CH2 280 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0,987	3497	0,06	467	0,09
1,380	4780933	82,27	480031	89,92
1,980	493040	8,48	28535	5,35
2,320	382609	6,58	18818	3,53
3,267	115642	1,99	4099	0,77
4,067	9950	0,17	720	0,13
4,393	25612	0,44	1167	0,22

Totals	5811283	100,00	533837	100,00
--------	---------	--------	--------	--------

Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

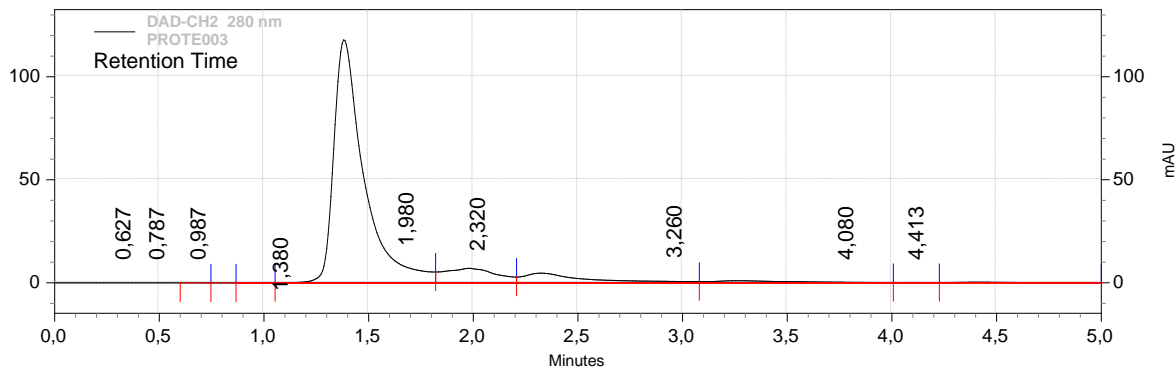
MUESTRA 3B

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE003-Rep2.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 26/03/2013 11:30:56

Printed: 27/03/2013 9:30:37



DAD-CH2 280 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0,627	111	0,00	21	0,00
0,787	64	0,00	14	0,00
0,987	3177	0,05	425	0,08
1,380	4743571	81,99	471649	89,85
1,980	492753	8,52	28185	5,37
2,320	394795	6,82	18804	3,58
3,260	118697	2,05	4104	0,78
4,080	7825	0,14	628	0,12
4,413	24895	0,43	1089	0,21

Totals	5785888	100,00	524919	100,00
--------	---------	--------	--------	--------

Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

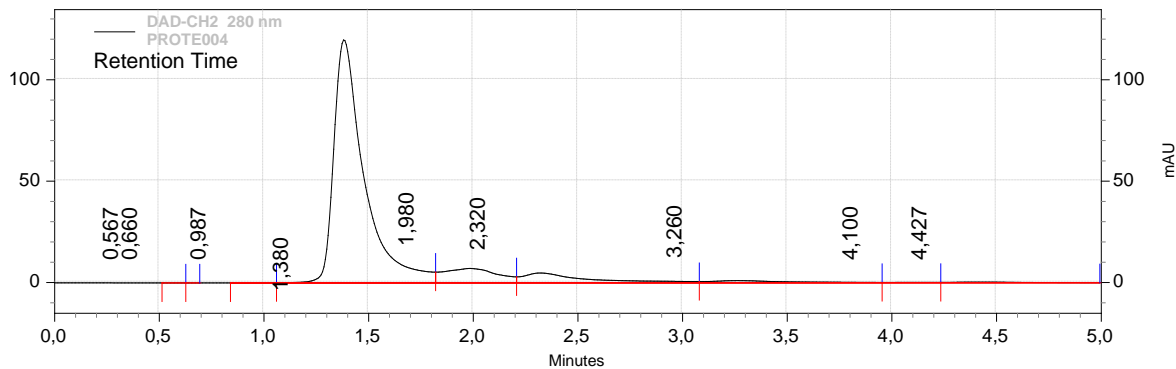
MUESTRA 4A

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE004-Rep1.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 26/03/2013 11:37:21

Printed: 27/03/2013 9:31:35



DAD-CH2 280 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0,567	110	0,00	27	0,01
0,660	44	0,00	19	0,00
0,987	4040	0,07	516	0,10
1,380	4828386	82,02	479192	89,81
1,980	504305	8,57	28364	5,32
2,320	402574	6,84	19340	3,62
3,260	109929	1,87	4287	0,80
4,100	10781	0,18	674	0,13
4,427	26681	0,45	1152	0,22

Totals	5886850	100,00	533571	100,00
--------	---------	--------	--------	--------

Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

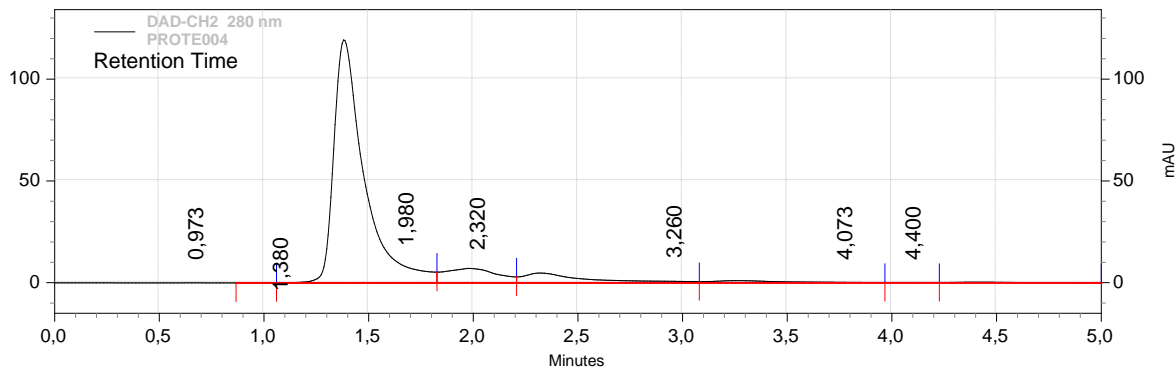
MUESTRA 4B

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE004-Rep2.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 26/03/2013 11:43:42

Printed: 27/03/2013 9:32:44



DAD-CH2 280 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0,973	3757	0,06	493	0,09
1,380	4833054	82,13	477219	89,78
1,980	494192	8,40	28350	5,33
2,320	403741	6,86	19275	3,63
3,260	112464	1,91	4320	0,81
4,073	10814	0,18	739	0,14
4,400	26410	0,45	1163	0,22

Totals	5884432	100,00	531559	100,00
--------	---------	--------	--------	--------

Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

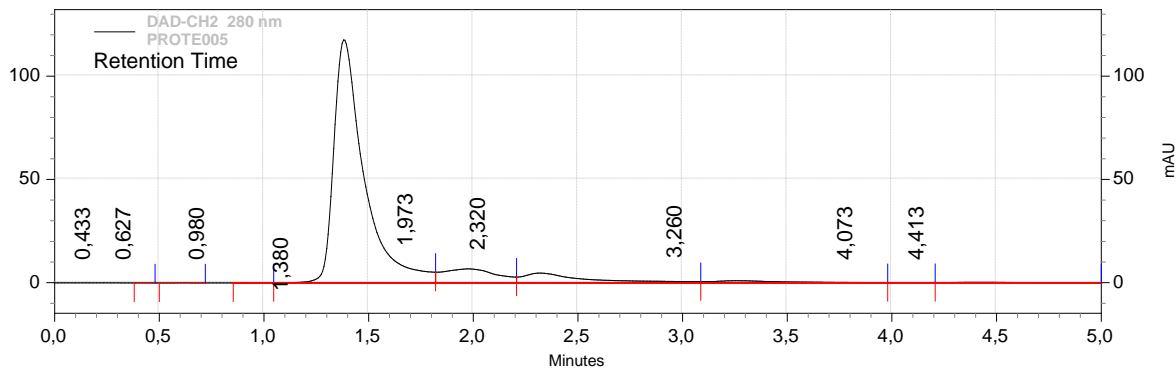
MUESTRA 5A

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE005-Rep1.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 26/03/2013 11:50:04

Printed: 27/03/2013 9:33:36



DAD-CH2 280 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0,433	108	0,00	33	0,01
0,627	207	0,00	43	0,01
0,980	3065	0,05	425	0,08
1,380	4750603	82,37	470460	89,99
1,973	482514	8,37	27089	5,18
2,320	392656	6,81	18926	3,62
3,260	104747	1,82	4100	0,78
4,073	7906	0,14	617	0,12
4,413	25438	0,44	1096	0,21

Totals	5767244	100,00	522789	100,00
--------	---------	--------	--------	--------

Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

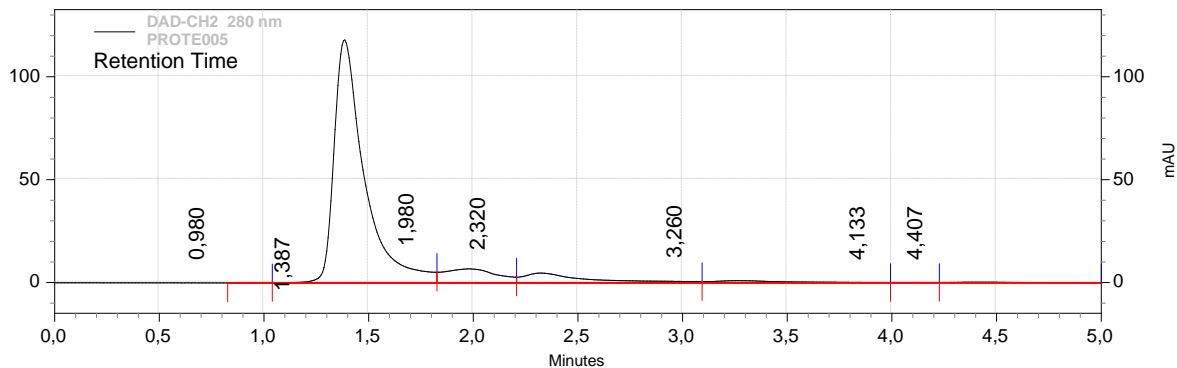
MUESTRA 5B

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE005-Rep2.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 26/03/2013 11:56:28

Printed: 27/03/2013 9:34:39



DAD-CH2 280

nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0,980	2619	0,05	385	0,07
1,387	4762153	82,41	472129	90,01
1,980	473426	8,19	27060	5,16
2,320	398401	6,89	18996	3,62
3,260	108009	1,87	4167	0,79
4,133	8670	0,15	649	0,12
4,407	25562	0,44	1144	0,22

Totals	5778840	100,00	524530	100,00
--------	---------	--------	--------	--------

Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

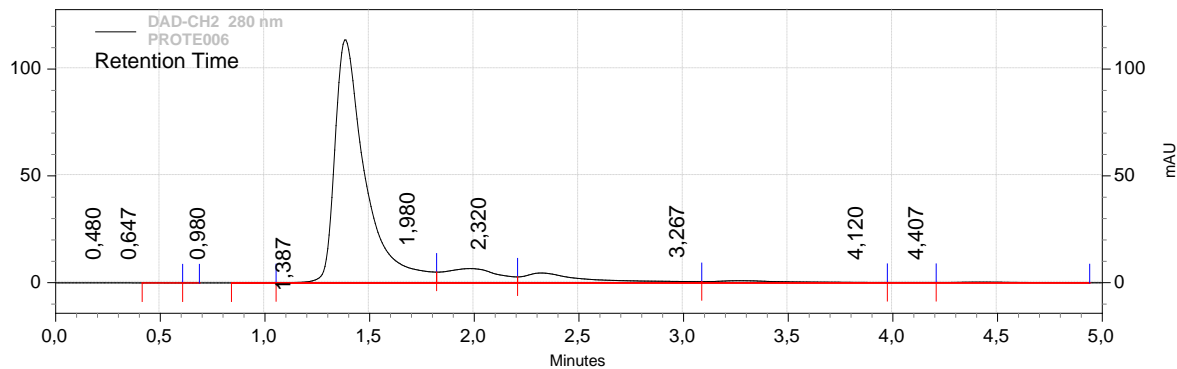
MUESTRA 6A

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE006-Rep1.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 26/03/2013 12:02:52

Printed: 27/03/2013 9:35:42



DAD-CH2 280 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0,480	203	0,00	36	0,01
0,647	43	0,00	13	0,00
0,980	3064	0,05	409	0,08
1,387	4600063	82,17	454728	89,88
1,980	476949	8,52	26729	5,28
2,320	382188	6,83	18399	3,64
3,267	102538	1,83	3884	0,77
4,120	8186	0,15	610	0,12
4,407	25328	0,45	1100	0,22

Totals	5598562	100,00	505908	100,00
--------	---------	--------	--------	--------

Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

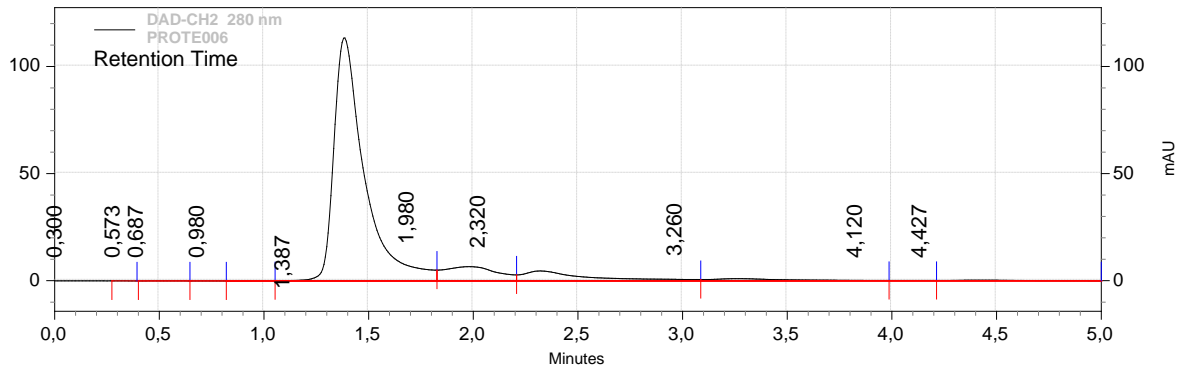
MUESTRA 6B

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE006-Rep2.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 26/03/2013 12:09:13

Printed: 27/03/2013 9:36:33



DAD-CH2 280 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0,300	70	0,00	22	0,00
0,573	588	0,01	78	0,02
0,687	205	0,00	32	0,01
0,980	3245	0,06	433	0,09
1,387	4603325	82,22	453546	89,86
1,980	466922	8,34	26498	5,25
2,320	387690	6,92	18444	3,65
3,260	105039	1,88	4043	0,80
4,120	7698	0,14	594	0,12
4,427	24343	0,43	1062	0,21

Totals	5599125	100,00	504752	100,00
--------	---------	--------	--------	--------

Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

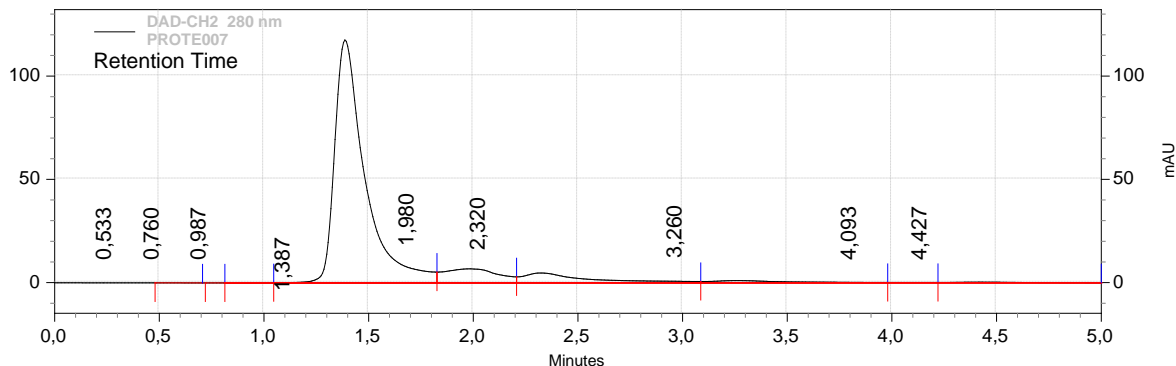
MUESTRA 7A

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE007-Rep1.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 26/03/2013 12:15:35

Printed: 27/03/2013 9:37:23



DAD-CH2 280 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0,533	298	0,01	37	0,01
0,760	35	0,00	14	0,00
0,987	3088	0,05	437	0,08
1,387	4741661	81,97	470474	89,91
1,980	486684	8,41	27073	5,17
2,320	406508	7,03	19100	3,65
3,260	110873	1,92	4350	0,83
4,093	9265	0,16	675	0,13
4,427	25867	0,45	1115	0,21

Totals	5784279	100,00	523275	100,00
--------	---------	--------	--------	--------

Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

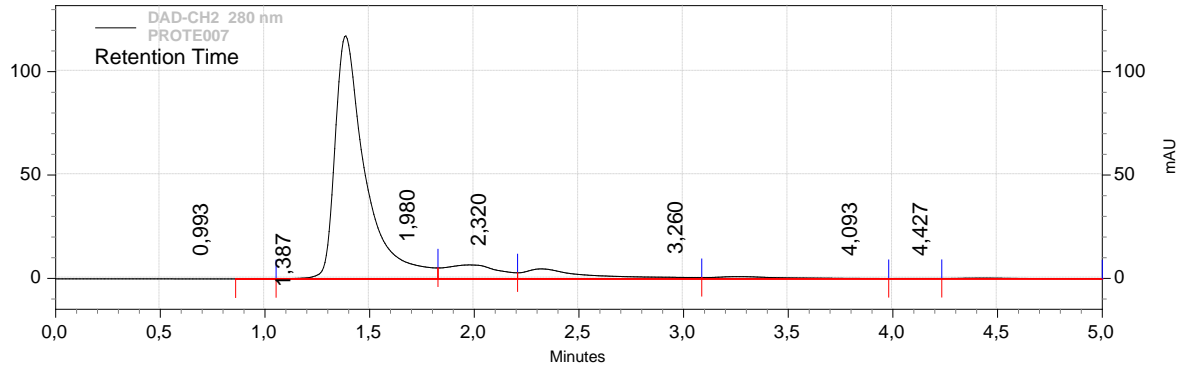
MUESTRA 7B

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE007-Rep2.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 26/03/2013 12:21:58

Printed: 27/03/2013 9:38:05



DAD-CH2 280 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0,993	3413	0,06	462	0,09
1,387	4751858	82,21	470029	89,95
1,980	482080	8,34	26883	5,14
2,320	402592	6,97	19207	3,68
3,260	105572	1,83	4233	0,81
4,093	8948	0,15	623	0,12
4,427	25362	0,44	1114	0,21

Totals	5779825	100,00	522551	100,00
--------	---------	--------	--------	--------

Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

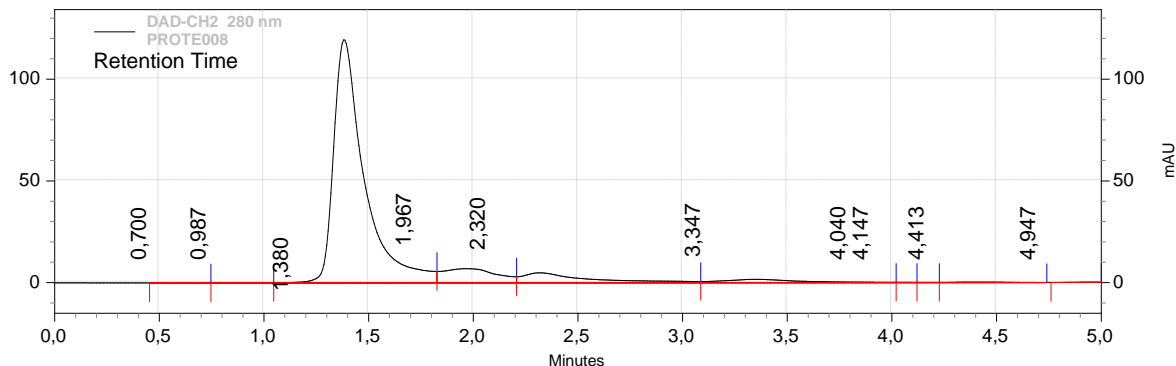
MUESTRA 8A

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE008-Rep1.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 26/03/2013 12:28:19

Printed: 27/03/2013 9:39:02



DAD-CH2 280 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0,700	764	0,01	66	0,01
0,987	3461	0,06	442	0,08
1,380	4861660	81,75	477388	89,49
1,967	492453	8,28	27707	5,19
2,320	406803	6,84	19441	3,64
3,347	160937	2,71	6505	1,22
4,040	2806	0,05	497	0,09
4,147	2496	0,04	424	0,08
4,413	13884	0,23	813	0,15
4,947	1809	0,03	144	0,03

Totals	5947073	100,00	533427	100,00
--------	---------	--------	--------	--------

Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

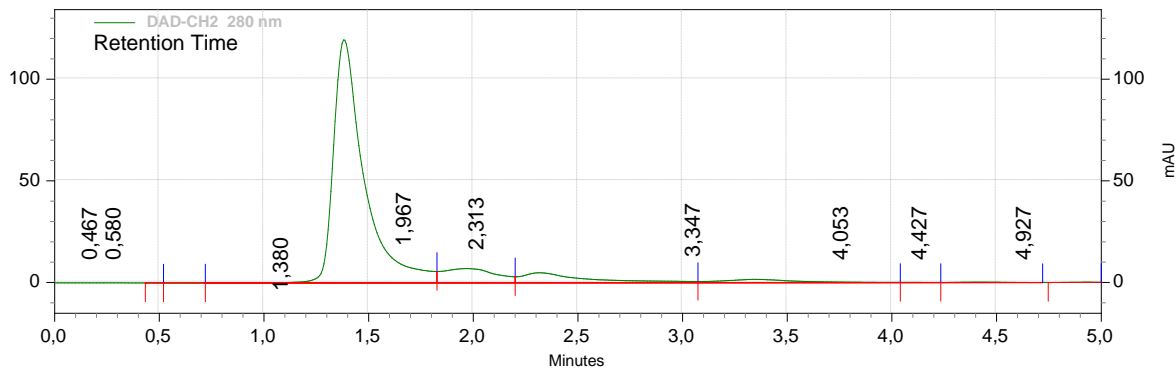
MUESTRA 8B

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE008-Rep2.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 26/03/2013 12:34:40

Printed: 27/03/2013 9:39:54



DAD-CH2 280 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0,467	96	0,00	27	0,01
0,580	175	0,00	35	0,01
1,380	4877420	81,85	477803	89,59
1,967	490212	8,23	27943	5,24
2,313	412249	6,92	19634	3,68
3,347	159400	2,68	6476	1,21
4,053	4114	0,07	427	0,08
4,427	13058	0,22	778	0,15
4,927	2008	0,03	207	0,04

Totals	5958732	100,00	533330	100,00
--------	---------	--------	--------	--------

Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

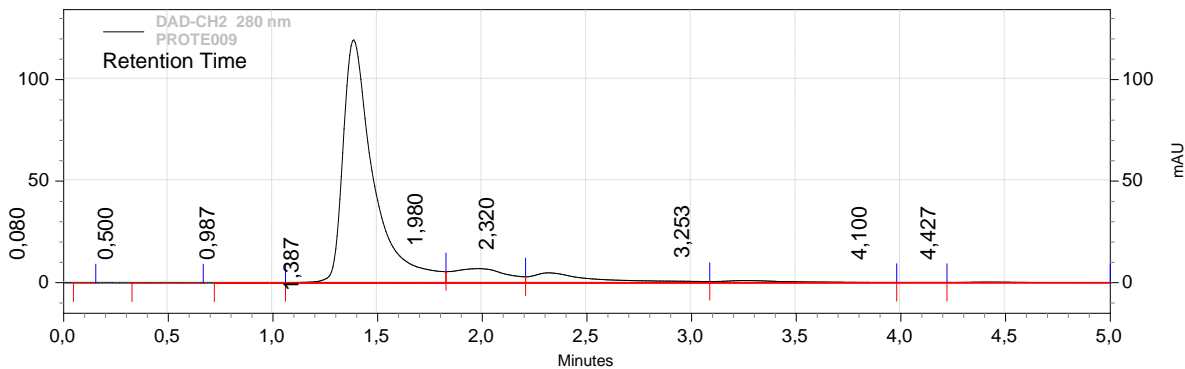
MUESTRA 9A

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE009-Rep1.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 26/03/2013 12:41:03

Printed: 27/03/2013 9:40:50



DAD-CH2 280 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0,080	169	0,00	46	0,01
0,500	528	0,01	51	0,01
0,987	6142	0,10	702	0,13
1,387	4861951	82,06	478281	89,78
1,980	500735	8,45	27977	5,25
2,320	412535	6,96	19595	3,68
3,253	110181	1,86	4384	0,82
4,100	7712	0,13	563	0,11
4,427	24625	0,42	1112	0,21

Totals	5924578	100,00	532711	100,00
--------	---------	--------	--------	--------

Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO

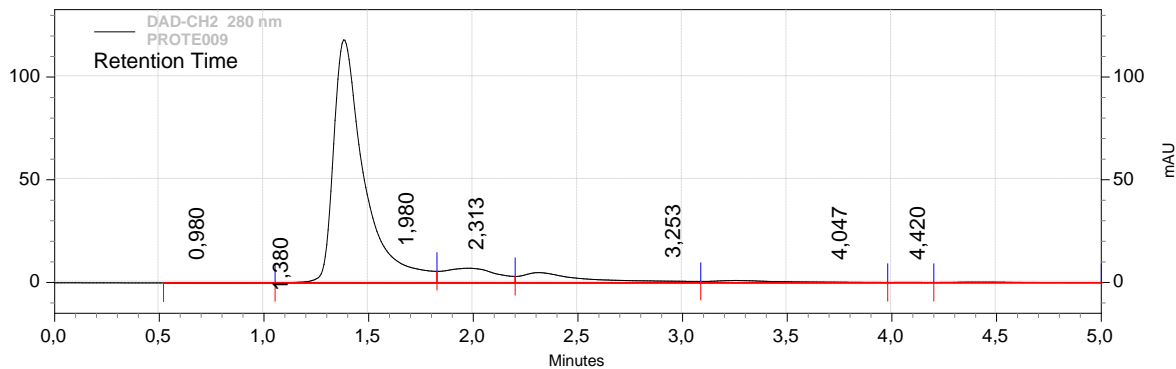
MUESTRA 9B

Data File: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\24-03-2013\PROTE009-Rep2.dat

Method: C:\Documents and Settings\ELITE\Mis documentos\JEMC\PROTEINA\PROTEINA.met

Acquired: 26/03/2013 12:47:28

Printed: 27/03/2013 9:41:50



DAD-CH2 280 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0,980	4759	0,08	560	0,11
1,380	4858735	81,89	472961	89,63
1,980	503348	8,48	28376	5,38
2,313	423706	7,14	19810	3,75
3,253	110832	1,87	4321	0,82
4,047	7249	0,12	573	0,11
4,420	24888	0,42	1060	0,20

Totals	5933517	100,00	527661	100,00
--------	---------	--------	--------	--------

Fuente: Arroyo y Jiménez, 2013.