



Desarrollo de un bioproceso para la extracción y purificación de las proteínas del suero de leche de vaca obtenido en la producción de mantequilla en la empresa Pasteurizadora Quito S.A.

Campaña Mejía, Mónica Margarita

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Trujillo Toledo, Luis Enrique PhD.

11 de febrero de 2022



proyecto.docx

Scanned on: 1:22 February 12, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	1
Words with Minor Changes	19
Paraphrased Words	0
Omitted Words	0



LUIS ENRIQUE
FRUJILLO
TOLINO



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, denominado “Desarrollo de un bioproceso para la extracción y purificación de las proteínas del suero de leche de vaca obtenido en la producción de mantequilla en la empresa Pasteurizadora Quito S.A.” fue realizado por la señorita Campaña Mejía Mónica Margarita, el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 11 de febrero de 2022

Firma:



Firma digitalizada por:
LUIS ENRIQUE
TRUJILLO
TOLEDO

Trujillo Toledo, Luis Enrique

C.C.: 1755850276



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, Mónica Margarita Campaña Mejía, con ID: 100005790, con cédula de ciudadanía n° 17221740 2 – 4, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Desarrollo de un bioproceso para la extracción y purificación de las proteínas del suero de leche de vaca obtenido en la producción de mantequilla en la empresa Pasteurizadora Quito S.A.”**, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 11 de febrero de 2022

Firma

Campaña Mejía, Mónica Margarita

CC: 172217402 – 4



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

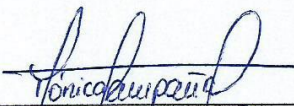
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Campaña Mejía, Mónica Margarita**, con cédula de ciudadanía n° 172217402 – 4, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Desarrollo de un bioproceso para la extracción y purificación de las proteínas del suero de leche de vaca obtenido en la producción de mantequilla en la empresa Pasteurizadora Quito S.A.”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 11 de febrero de 2022

Firma:


Campaña Mejía, Mónica Margarita

C.C.: 172217402 – 4

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido en mi crecimiento tanto académico como personal y han sido parte de este arduo camino.

Principalmente a mis amados padres Mario y Mónica, quienes han estado junto a mí en todo momento y con su esfuerzo, cariño y apoyo me llenaron de fortaleza para poder cumplir cada meta y sobre todo superar todos los obstáculos.

A mis hermanos Mario y Cris, quienes además de ser mis mejores amigos son mi ejemplo a seguir por su fortaleza, generosidad y sobre todo por su apoyo incondicional.

A mis angelitos en el cielo, en especial a mi abuelita quien hasta el último momento estuvo pendiente de mí y de que me levante después de cada caída, le dedico este logro porque ha sido mi fortaleza día a día hasta hoy estar donde estoy.

Agradecimiento

Quiero agradecer en primer lugar a Dios por todas las bendiciones que ha derramado sobre mí y por haberme dado la oportunidad de cumplir un sueño más.

A toda mi familia con cuyo apoyo incondicional, amor y sabiduría me han ayudado a ser la persona y profesional en la que me he convertido.

A mi director de tesis Luis Enrique Trujillo PhD., por su tiempo, consejos, conocimiento y guía durante el proceso de realización de este proyecto.

A la empresa Pasteurizadora Quito S.A., por abrirme las puertas de su empresa y brindarme toda la información necesaria, así como permitirme el ingreso a las instalaciones de sus laboratorios donde se pudieron completar algunos análisis del proyecto.

A la Ing. Andrea Rodríguez, por brindarnos su ayuda durante el trabajo realizado en los laboratorios de docencia de la carrera y finalmente a la Universidad de las Fuerzas Armadas por haberse convertido en un lugar de enseñanza y aprendizaje sobre todo a nivel personal.

Índice de contenido

Copyleaks	2
Informe de conformidad	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimiento	7
Resumen	12
Abstract.....	13
Capítulo 1: Introducción	14
Planteamiento del Problema	14
Justificación del Problema.....	15
Objetivos	16
Objetivo general del proyecto.....	16
Objetivos específicos	16
Hipótesis	16
Capítulo 2: Marco Teórico	17
Suero Lácteo.....	17
Proceso productivo de mantequilla y obtención del suero	18
Proteínas del suero de leche.....	20
Albúminas	21
Globulinas	23

Proteínas menores	24
Procesos de extracción de proteínas	24
Tecnología de membranas	24
Precipitación en frío.....	25
Métodos de purificación de proteínas.....	25
Electroforesis	25
Espectrofotometría UV	26
Capítulo 3: Materiales y Métodos.....	27
Colaboradores científicos.....	27
Director del proyecto:	27
Área de estudio.....	27
Obtención de las muestras.....	27
Determinación de los parámetros fisicoquímicos del suero de mantequilla	27
Medición de pH	27
Determinación del contenido de grasa por el método de Gerber	28
Densidad.....	29
Acidez Titulable.....	30
Determinación de sólidos	31
Determinación de proteínas	31
Extracción de las proteínas del suero.....	31
Purificación de las proteínas	32

Análisis Estadístico	33
Capítulo 4: Resultados y Discusión.....	34
Parámetros fisicoquímicos	34
Extracción y purificación de proteínas	36
Capítulo 5: Conclusiones	39
Capítulo 6: Recomendaciones	40
Capítulo 7: Bibliografía.....	41
Capítulo 8: Anexos.....	44

Índice de tablas

Tabla 1.	<i>Composición del suero</i>	17
Tabla 2.	<i>Características de las principales proteínas de la leche de vaca</i>	20
Tabla 3.	<i>Datos del análisis estadístico para los parámetros fisicoquímicos</i>	35

Índice de figuras

Figura 1.	<i>Composición porcentual general del suero lácteo.</i>	18
Figura 2.	<i>Diagrama de flujo de la elaboración de mantequilla.</i>	19
Figura 3.	<i>Estructura de la β-lactoglobulina de leche de vaca</i>	22
Figura 4.	<i>Estructura primaria de la α-lactoalbúmina de leche de vaca</i>	23
Figura 5.	<i>Butirómetros con muestra de suero para determinación del porcentaje de grasa</i>	28
Figura 6.	<i>Muestra de lactosuero en probeta con lactodensímetro para determinación de la densidad</i>	29
Figura 7.	<i>Titulación de la muestra de suero lácteo con NaOH</i>	30
Figura 8.	<i>Gráfico de la regresión lineal obtenida con el Log(PM) vs. la distancia recorrida por las bandas del marcador molecular</i>	37
Figura 9.	<i>Perfil electroforético de proteínas de suero de leche</i>	38

Resumen

El suero lácteo consiste en una sustancia de color amarillento obtenido como subproducto del proceso de la elaboración de mantequilla, el mismo que es desechado y transportado junto con las demás aguas residuales de la industria para su posterior tratamiento. Este desecho tiene propiedades únicas, ya que posee un alto contenido proteico y por ello a su vez es más complicado al momento de tratarlo en las PTAR. Entre los péptidos y proteínas que pudieron ser extraídas y purificadas mediante precipitación a temperaturas bajas y por SDS-PAGE realizando una corrida con un voltaje constante de 150V, con una corriente entre 100 mA y usando geles de apilamiento y separación al 5% y 15% de una solución de Bis – acrilamida respectivamente, las proteínas encontradas en las muestras de suero de leche obtenido de la producción de mantequilla en la empresa Pasteurizadora Quito S.A. fueron la β -lactoglobulina con un peso molecular igual a 18259,8 Da, la α -lactoalbumina con 14294,7 Da, y proteínas séricas menores como la Lactoferrina con 82293,2 Da, la Transferrina con 75999,4 Da y el GMP con a 6256,7 Da.

Además, se concluyó que las muestras obtenidas de la producción de mantequilla de la empresa corresponden a las características de un suero dulce o buttermilk, con valores iguales a: 6,6 de pH, 0,27% de grasa, 1,027 de densidad, 0,12 % en masa de ácido láctico, 2,74% de proteína y 2,24% de caseína.

Palabras clave:

- **SUERO DE MANTEQUILLA**
- **EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**
- **PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**
- **CARACTERIZACIÓN.**

Abstract

Whey consists of a yellowish substance obtained as a by-product of the butter-making process, which is discarded and transported along with other industrial wastewater for subsequent treatment. This waste has unique properties, since it has a high protein content and therefore, in turn, it is more complicated when treating it in the WWTP. Among the peptides and proteins that could be extracted and purified by precipitation at low temperatures and by SDS-PAGE, performing a run with a constant voltage of 150V, with a current between 100 mA and using stacking and separating gels at 5% and 15% of a solution of Bis - acrylamide respectively, the proteins found in the samples of milk whey obtained from the production of butter in the company Pasteurizadora Quito SA were β -lactoglobulin with a molecular weight equal to 18259.8 Da, α -lactalbumin with 14294.7 Da, and minor serum proteins such as Lactoferrin with 82293.2 Da, Transferrin with 75999.4 Da and GMP with at 6256.7 Da. In addition, it was concluded that the samples obtained from the company's butter production correspond to the characteristics of a sweet whey or buttermilk, with values equal to: 6.6 pH, 0.27% fat, 1.027 density, 0.12% by mass of lactic acid, 2.74% protein and 2.24% casein.

Keywords:

- BUTTERMILK
- PROTEIN EXTRACTION
- PROTEIN PURIFICATION
- CHARACTERIZATION.

Capítulo 1: Introducción

Planteamiento del Problema

En el Ecuador el número de vacas ordeñadas es de aproximadamente 836.518 con un promedio de 6 litros por vaca, y de esta cantidad de leche producida el 53% es destinado para la industria formal, es decir para la elaboración de leche de funda, quesos, mantequilla, yogurt, crema, entre otros. En la producción de quesos y mantequilla principalmente se obtiene un estimado de 1,7 millones de suero de leche que no es aprovechado por las industrias en su totalidad (Centro de Industria Láctea del Ecuador, 2018).

Al realizar un estudio en Medellín dirigido a la industria de alimentos, se concluye que el lacto suero es una fuente económica importante de proteínas, lo que a su vez confiere una variedad de propiedades para su utilización a nivel de elaboración de alimentos. Los productos obtenidos a partir del suero tienen múltiples beneficios, puesto que realzan tanto el color como el sabor de los alimentos, mejoran la textura y las propiedades de flujo y muestran muchas otras propiedades funcionales que aumentan la calidad de los productos alimenticios. Basados en el valor nutricional del lacto suero, se han obtenido un sinnúmero de usos comerciales como complemento nutricional para ganado porcino o bovino, etanol, ácidos orgánicos, bebidas no alcohólicas, bebidas fermentadas, biomasa, concentrados, aislados e hidrolizados de proteína, películas comestibles, medio de soporte para encapsular sustancias, producción de xantana, enzimas, separación de la lactosa como endulzante en alimentos, entre otras aplicaciones (Parra, 2009).

Pese a que hoy en día se ha optado por la búsqueda de nuevas opciones para utilizar el lacto suero como algunos estudios realizados en otros países lo demuestran, aún persiste el desecho del mismo, en el Ecuador solo una pequeña porción es utilizado en alimentación para el ganado y la crianza de terneros o bovinos jóvenes que ayudan al crecimiento de los mismos gracias al concentrado de proteínas que presenta, sin embargo, la contaminación y el tratamiento del mismo sigue siendo un problema para estas industrias, por lo que se siguen

realizando estudios para emplearlo en nuevos productos o a su vez obtener compuestos benéficos y de esa forma también reducir la carga contaminante de esta sustancia y en general de las aguas residuales de estas empresas encargadas de la producción de lácteos y sus derivados (Pais et al., 2017).

Justificación del Problema

Puesto que la leche es la materia prima principal en la elaboración de muchos productos derivados como queso, mantequilla, entre otros, la industria láctea es considerada el eje del sustento económico en algunos países tanto industrializados como en desarrollo. Sin embargo, durante su ciclo productivo se generan diferentes desechos, siendo uno de los más importantes el suero de leche (Guevara & León, 2019).

El problema radica principalmente en las grandes cantidades de suero lácteo que resultan de estas industrias, puesto que, si se eliminan directamente sin previo tratamiento al medio, se descomponen porque pueden sufrir ataques microbianos, ocasionando el crecimiento de patógenos que causan infecciones y malos olores. Por otra parte, si el suero se envía por los desagües, al momento en el que llegan a las plantas de tratamiento de agua residual (PTAR), presentando una alta capacidad contaminante con un DBO que varía aproximadamente entre 30,000 a 50,000 mg/L, desestabiliza los sistemas de tratamiento biológico debido a la alta cantidad de materia orgánica que posee y disminuye el oxígeno disuelto en el agua ocasionando la muerte de los organismos especializados en el tratamiento de efluentes (Guerrón, 2015).

Por ello es importante la búsqueda de opciones para emplear este desecho y reutilizarlo en la obtención de proteínas o productos nuevos aprovechando la presencia de fragmentos de la membrana del glóbulo graso relacionada con propiedades beneficiosas para la salud y con ello conseguir la reducción a nivel de contaminación por parte de las vertientes de estas industrias (Valencia & Ramírez, 2009).

Objetivos

Objetivo general del proyecto

Desarrollar un bioproceso para la extracción y purificación de las proteínas que se encuentran en el suero de leche de vaca obtenido en la producción de mantequilla en la empresa Pasteurizadora Quito S.A.

Objetivos específicos

- Realizar el análisis de las muestras de suero lácteo mediante pruebas fisicoquímicas para la obtención de las características del mismo.
- Extraer las principales proteínas que se encuentran en el suero lácteo mediante la precipitación con ácido Tricloroacético y ultrafiltración de las muestras.
- Purificar las proteínas obtenidas mediante electroforesis SDS-PAGE para su identificación.

Hipótesis

Ho: El lacto suero obtenido en la producción de mantequilla no contiene proteínas que pueden ser extraídas y purificadas mediante el desarrollo de un bioproceso.

Hi: El lacto suero obtenido en la producción de mantequilla contiene proteínas que pueden ser extraídas y purificadas mediante el desarrollo de un bioproceso.

Capítulo 2: Marco Teórico

Suero Lácteo

El suero de mantequilla también conocido como mazada, consiste en la fracción acuosa de color amarillento liberada en la etapa de batido ya sea de la crema dulce o ácida durante el proceso de elaboración de mantequilla. Este subproducto es diferente a cualquier otro generado durante la producción de una industria láctea porque contiene fragmentos de la membrana del glóbulo graso en el suero relacionados con propiedades benéficas para la salud por su alto contenido fosfolípido y proteínas (Alayo, 2017).

Existen dos tipos de suero lácteo, que varían dependiendo del pH de los mismos, el lacto suero dulce presenta un pH de 6 a 6,6 y el lacto suero ácido con un pH bajo de 4,3 a 4,7; y aunque su pH es muy diferente los demás parámetros en cuanto a su composición son un poco similares como se detallan en la Tabla 1 (Iniesta, 2020).

Tabla 1.

Composición del suero

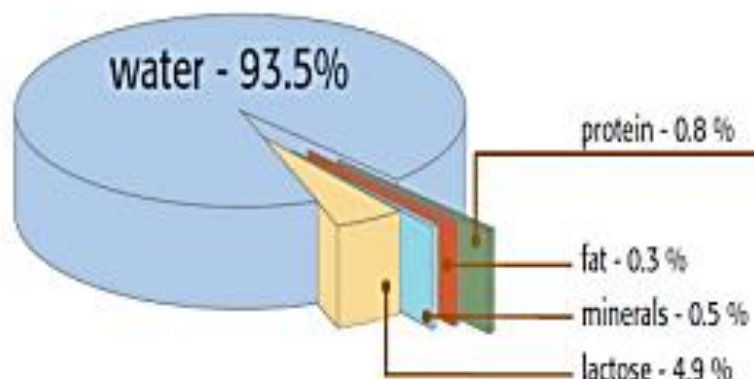
COMPONENTE (g/L)	SUERO DULCE	SUERO ÁCIDO
Sólidos Totales	63,0 – 70,0	63,0 – 70,0
Lactosa	46,0 – 52,0	44,0 – 46,0
Grasa	0,0 – 5,0	0,0 – 5,0
Proteína	6,0 – 10,0	6,0 – 8,0
Calcio	0,4 – 0,6	1,2 – 1,6
Fósforo	0,4 – 0,7	0,5 – 0,8
Potasio	1,4 – 1,6	1,4 – 1,6
Cloruros	2,0 – 2,2	2,0 – 2,2

Nota: Adaptado de *Composición de los sueros dulce y ácido* (p. 10), por P. Hermosa, 2021

Por otro lado, de manera general la composición del suero en porcentajes se puede observar en la Figura 1, donde, aunque el mayor porcentaje corresponde al agua, también se observa que las proteínas séricas ocupan de un 0,8 – 1,0% (Arroyo & Jiménez, 2013).

Figura 1.

Composición porcentual general del suero lácteo.



Nota: Tomado de *Composición típica del suero* (p. 19), por Y. Arroyo & Y. Jiménez, 2013

Proceso productivo de mantequilla y obtención del suero

El proceso de elaboración y obtención de mantequilla inicia con la recepción de materia prima a los tanques de almacenamiento o silos, donde la leche receptada es analizada inicialmente para garantizar la calidad y el buen rendimiento del producto final (FAO-PRODAR, 2014).

En la Figura 2 se detallan los pasos para la obtención de mantequilla y como subproducto la obtención de suero.

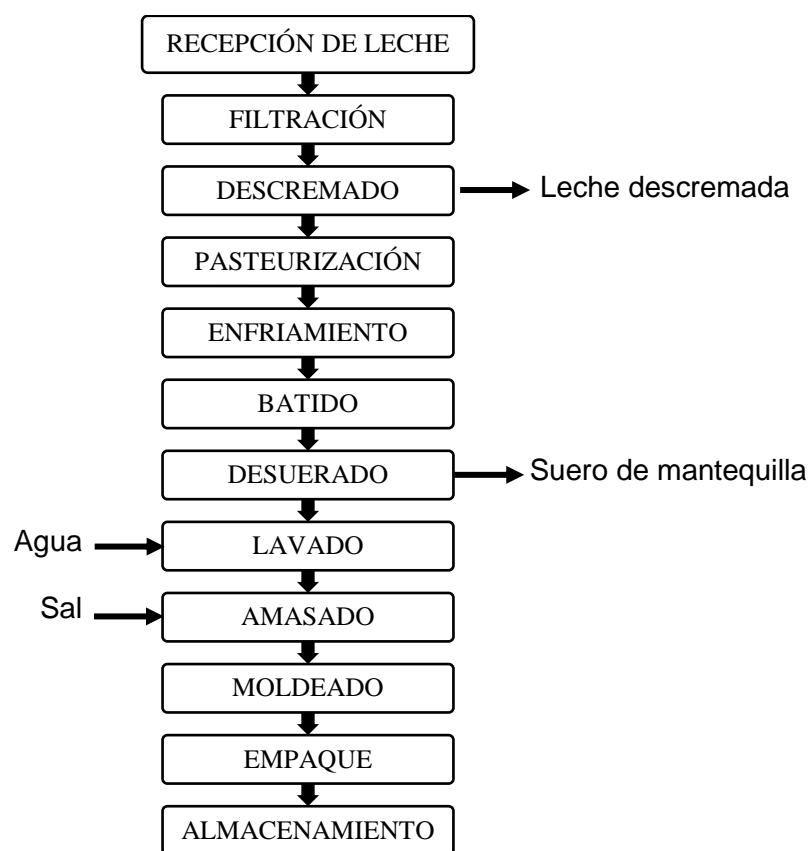
Una vez la leche se considera apta para procesarla pasa a través de unos filtros o cedazos para retirar cualquier impureza e ingresa a los tanques de descremado.

Este contenido de crema es separado de la leche descremada y pasa al tanque de pasteurización, en donde es sometida a altas temperaturas para eliminar microorganismos contaminantes. A continuación, pasa al tanque de batido una vez se haya enfriado, en esta

etapa, la nata es violentamente agitada con el objetivo de que los glóbulos de grasa se rompan y se formen los granos de mantequilla (Flores, 2015). La nata entonces es dividida en dos fases: el cuajo o granos de mantequilla y el suero o mazada. Este segundo es desechado, mientras que el cuajo pasa a los procesos de amasado, moldeado, empaquetado y almacenamiento

Figura 2.

Diagrama de flujo de la elaboración de mantequilla.



Nota: Adaptado de *Diagrama de Flujo de Elaboración de Mantequilla* (p. 8), por A. Alayo, 2017.

Tomando en cuenta el proceso detallado anteriormente, la fase del desuerado es la más importante en este proyecto, puesto que es la etapa en la que se recolecta el suero o fase acuosa con la ayuda de un colador para recoger las partículas de mantequilla que luego de amasarlas formarán el producto final (FAO-PRODAR, 2014).

Proteínas del suero de leche

Las proteínas del suero lácteo son sustancias nitrogenadas de alto valor biológico si se las compara con las proteínas de la carne y del huevo. Además de la función biológica que estas proteínas poseen, tienen acción enzimática y como anticuerpos. En el lacto suero (LS) las proteínas no son abundantes y representan apenas un 20% de las proteínas totales presentes en la leche del bovino como se observa en la Tabla 2, donde se enlistan las proteínas lácteas de manera general (Lapeña & Hierro, 2018).

Tabla 2.

Características de las principales proteínas de la leche de vaca

Proteína	Peso molecular (kDa)
Caseína (80%)	20 – 30
- Alpha s1-Caseína	23,6
- Alpha s2-Caseína	25,2
- Beta-Caseína	24
- Kappa-Caseína	19
Proteínas séricas (20%)	
- Alfa-Lactoalbumina	14,2
- Beta-Lactoglobulina	18,3
- Seroalbúmina	6,7
- Inmunoglobulinas	160
- Lactoferrina	80

Nota: Adaptado de *Características de las principales proteínas presentes en la composición de leche de vaca* (p. 78), por S. Lapeña & E. Hierro, 2018.

Se pueden distinguir tres grupos de proteínas séricas mediante la diferencia de solubilidad que éstas presentan cuando se expone a agentes precipitantes como el ácido tricloroacético o sulfato de sodio y amonio descritos a continuación:

Albúminas

Corresponden a la fracción más representativa e importante del total de las proteínas séricas con un 75% aproximadamente. Este grupo está compuesto fundamentalmente por tres proteínas α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina (β -Lg) y seroalbúmina bovina (BSA).

La β -lactoglobulina (β -Lg) es la sueroproteína más abundante puesto que constituye cerca del 50% de las proteínas del lactosuero (LS). Su estructura consiste en una secuencia de 162 aminoácidos como se observa en la Figura 3 y un peso molecular aproximado a los 18 kDa (Candiotti, 1999). Es considerada importante, puesto que es empleada ampliamente en diferentes productos alimenticios debido a sus propiedades emulsificantes y gelificantes (Guevara & León, 2019).

Figura 3.

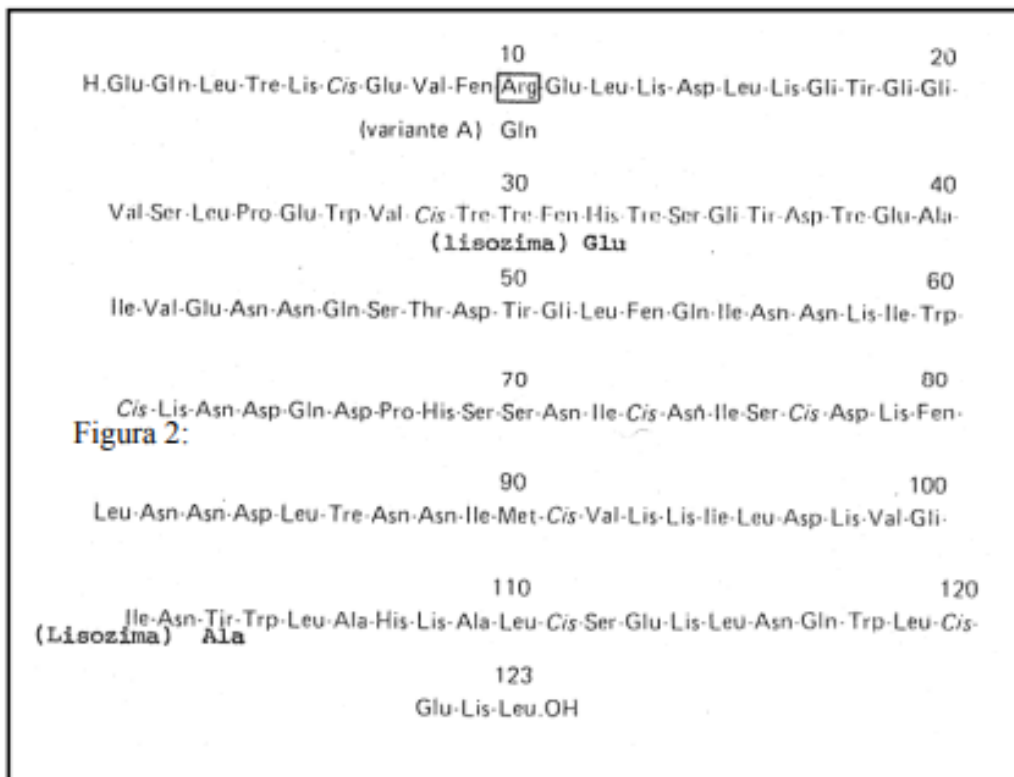
Estructura de la β -lactoglobulina de leche de vaca

Nota: Adaptado de *Estructura primaria de la β -lactoglobulina bovina* (p. 18), por M. Candiotti, 1999.

Por otro lado, también se encuentra la α -lactoalbúmina (α -La) representando un 4% de toda la proteína láctea, la misma que es utilizada muchas veces en la elaboración de fórmulas infantiles (Guevara & León, 2019). Esta proteína tiene un peso molecular entre 14,5 a 16,3 kDa y estructuralmente está formada por 123 aminoácidos como se puede observar en la Figura 4 (Candiotti, 1999).

Figura 4.

Estructura primaria de la α -lactoalbúmina de leche de vaca



Nota: Tomado de *Estructura primaria de la α -lactoalbumina bovina* (p. 15), por M. Candiotti, 1999.

Las seroalbúminas finalmente son el último tipo de proteínas que pertenecen a este grupo y corresponden al 5 o 6% del grupo de las albuminas y tiene un peso molecular igual al de la seroalbúmina sanguínea de 69000. Estas proteínas tienen la capacidad de ligarse a una gran variedad de sustancias o compuestos, en especial a moléculas pequeñas como los ácidos grasos, con las que funcionan como transportador (Candiotti, 1999).

Globulinas

Representan del 10 al 12% de las proteínas solubles del suero de leche y presentan una actividad inmunológica importante. Estas proteínas son conocidas también como

inmunoglobulinas, y se caracterizan por su actividad inmunológica la cual les permite reaccionar con los antígenos apropiados (Arroyo & Jiménez, 2013).

Todas las inmunoglobulinas tienen una estructura básica similar, la cual está compuesta por cuatro subunidades y juegan un papel sumamente importante a nivel de la inmunidad que puede otorgarse de madre a hijo. Las principales inmunoglobulinas (Ig) son las de clase G, clase A y clase M (Arroyo & Jiménez, 2013).

Proteínas menores

Son un grupo de proteínas que se encuentran en el suero en cantidades mínimas, es decir al menos un 5 % aproximadamente del total de sueroproteínas. Entre las más conocidas se encuentran la Lactoferrina con un peso molecular de 88000 Da, la Transferrina con un peso entre 75000 – 77000 Da, la Microglobulina β de 43000 Da de peso y el Glicomacropéptido, el mismo que ha sido estudiado en numerosas investigaciones para detectar las adulteraciones en la los productos lácteos, presenta un peso molecular de 6000 a 8000 Da (Galindo et al., 2006).

Procesos de extracción de proteínas

Actualmente existen diferentes mecanismos para extraer o recuperar las proteínas y los péptidos del suero lácteo sin que estos sean desnaturalizados, entre los métodos que se utilizan en mayor medida se encuentran la tecnología de separación o fraccionamiento con el uso de membranas, cromatografías, técnicas de precipitación y formación de complejos.

Tecnología de membranas

La tecnología de membranas es una de las técnicas más utilizada a nivel industrial, principalmente porque ayuda en la retención de partículas como proteínas, grasa y lactosa presentes en el suero lácteo. Mediante la ultrafiltración se pueden rescatar las proteínas del lactosuero con facilidad y sin someterlas a ningún tipo de modificación, siempre y cuando no exista variaciones relacionadas a su pH y temperatura. Por otro lado, al considerar los otros

tipos de filtración como la nana filtración y la micro filtración, cada una cumplen una función específica, la primera da lugar a la desalinización del suero y la segunda ayuda en la reducción de la carga bacteriana. Las proteínas extraídas por este tipo de métodos aportan en la formación de emulsiones y geles y sobre todo presentan propiedades funcionales y espumantes (García et al., 2018).

Precipitación en frío

Este proceso consiste en precipitar las proteínas mediante la interacción con sustancias como poli fosfatos o carboximetilcelulosa e incluso ácidos como el TCA con intervención de bajas temperaturas y haciendo uso de termo centrífugas donde la temperatura pueda ser controlada. Con esta técnica se puede evitar la desnaturalización de las proteínas y así, conservar sus propiedades funcionales.

Métodos de purificación de proteínas

La purificación de proteínas son una serie de procesos o técnicas que permiten identificar y aislar un tipo de proteína de una mezcla compleja. La purificación de proteínas es muy importante para caracterizarlas y determinar su estructura, función e interacciones de las proteínas ya sea con una enzima, un receptor o un anticuerpo.

Entre las técnicas más empleadas se tienen:

Electroforesis

La electroforesis es una técnica utilizada para la separación de moléculas según su peso y movilidad en un campo eléctrico, en el caso de las proteínas se utiliza como soporte un gel, habitualmente de agarosa o de poliacrilamida (Ritchie, 2012). En esta técnica, las proteínas se cargan cuando se unen con sustancias como el SDS, el cual es un detergente, cuya función principal es la de aportar cargas negativas a la proteína de una manera dependiente de la masa molecular. Al cargar la mezcla de moléculas o en este caso proteínas y aplicar un campo eléctrico, estas se moverán e irán pasando por el gel, por lo que las moléculas más pequeñas

se moverán con más rapidez y facilidad. Es decir que la movilidad de las proteínas está relacionada con la concentración del gel, aquellos geles que tienen un porcentaje más alto son más adecuados para la separación de polipéptidos, por ejemplo. Así, las más pequeñas avanzarán más y las más grandes quedarán cerca del lugar de partida (Cubilla et al., 2020).

Por lo general, la parte superior del gel (stacking gel) en donde se ubican los pocillos donde se colocan las muestras, tiene una concentración del 5%, mientras que la sección que continúa (Resolving Gel), va aumentando el porcentaje de su concentración de forma lineal hasta llegar a un 20% (BioTed, 2000).

Espectrofotometría UV

Es rápida y conveniente ya que no se requieren reactivos ni procesos adicionales, no requiere estándar, no se consume la proteína y se obtiene una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de proteínas. De manera general se obtiene la concentración de la proteína expresada en mg/mL con las relaciones detalladas a continuación:

$$\text{Concentración (mg/mL)} = (1.55 \times A_{280}) - 0.76 \times A_{260}$$

$$\text{Concentración (mg/mL)} = (A_{205}) / 31$$

(Ritchie, 2012)

Capítulo 3: Materiales y Métodos

Colaboradores científicos

Director del proyecto:

Dr. Luis Enrique Trujillo, Ph. D.

Docente Investigador de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

Área de estudio

El proyecto fue realizado en los laboratorios de Control de Calidad de la empresa Pasteurizadora Quito S.A. en Quito – Ecuador, en el sector de Luluncoto y en los laboratorios de docencia de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE en Sangolquí.

Obtención de las muestras

Se realizó la toma de muestra del suero de leche durante 15 días consecutivos de producción de mantequilla. Analizando tres muestras diarias de 250 mL para la caracterización del suero en cuanto a los parámetros fisicoquímicos y una muestra total de 300 mL para realizar la extracción y purificación de proteínas.

Siguiendo el protocolo detallado en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 4, se mezcló completamente el suero agitándolo con ayuda de un agitador de disco e inmediatamente mediante un cucharón se transfirió la muestra de 250 mL a un envase de vidrio totalmente limpio y seco. Por otro lado, también se tomó una muestra de 300 mL en un frasco ámbar y se lo colocó en un cooler para transportarla a los laboratorios de docencia de la universidad (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2017).

Determinación de los parámetros fisicoquímicos del suero de mantequilla

Medición de pH

Esta prueba es un método analítico para medir la concentración de iones H^+ en una solución con ayuda de un potenciómetro digital. Para el análisis se inició tomando 50 mL de la

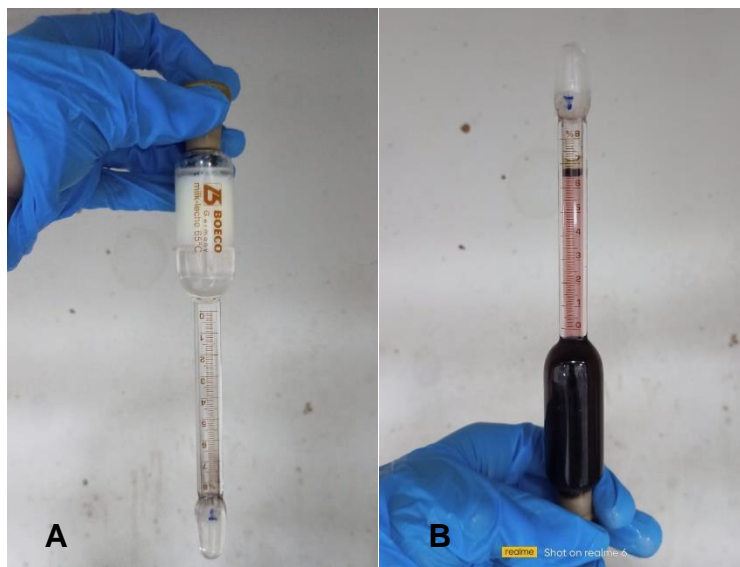
muestra en un vaso de precipitación y posteriormente se introdujo el electrodo para obtener la lectura del pH una vez el valor en la pantalla fue estable (López et al., 2016).

Determinación del contenido de grasa por el método de Gerber

Este método consiste en determinar el contenido de grasa de manera manual, empleando butirómetros, de diferente tamaño y medición, para cada producto analizado. Tomando en cuenta una muestra de suero, en el butirómetro se añadió: 10 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 90%, 11 mL de la muestra (tomada con una pipeta volumétrica) y 1 mL de alcohol amílico ($C_5H_{11}OH$) como se puede observar en la Figura 5 literal A. Finalmente, después de taparlo con un corcho, se lo colocó en la centrífuga durante 5 minutos a 1200 rpm, con el fin de que se distingan dos fases, siendo la parte superior el porcentaje de grasa como se aprecia en la Figura 5 literal B (Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN, 1973).

Figura 5.

Butirómetros con muestra de suero para determinación del porcentaje de grasa.



Nota: **A)** Butirómetro antes de la centrifugación donde se observan las tres sustancias (ácido sulfúrico en la parte inferior, muestra de suero y alcohol amílico en la parte superior). **B)** Butirómetro después de la centrifugación donde se observa la separación de dos fases (en la parte superior y de color amarillento el contenido graso).

Densidad

Una vez agitada la muestra de suero a una temperatura de 15°C o lo más cercano en un rango de 10 a 20°C, se la coloco en una probeta evitando la formación de espuma e inmediatamente se introdujo el termolactodensímetro. Después de que el lactodensímetro permaneció inmóvil, se realizó la lectura del valor por encima del menisco formado por el suero y haciendo uso de la fórmula detallada a continuación se obtuvo el valor de la densidad como se aprecia en la Figura 6 (Alayo, 2017).

$$\rho = L \pm (\Delta^{\circ}T \times 0.0002)$$

Donde:

ρ = densidad real del suero

L = grados del lactodensímetro

$^{\circ}\Delta T$ = variación de temperatura teniendo como referencia 15°C, ya sea menor o mayor a éste

0.0002 = factor de corrección que se aumenta o disminuye por cada grado que este sobre o debajo a los 15°C

Figura 6.

Muestra de lactosuero en probeta con lactodensímetro para determinación de la densidad



Acidez Titulable

Según Alayo (2017) se emplea el método descrito en 947,05 AOAC del 2005.

Con ayuda de una pipeta volumétrica se tomaron 10 mL de la muestra y se colocaron en un vaso de precipitación junto con 3 gotas de fenolftaleína y se realizó la titulación con Hidróxido de Sodio (NaOH) al 0.1 N agitando constantemente la muestra hasta que se observó un color rosa pálido persistente durante 30 segundos aproximadamente como se observa en la Figura 7. Finalmente, se realizó la lectura del volumen consumido y empleando la fórmula descrita a continuación se calculó la acidez en relación al porcentaje de ácido láctico:

$$A = fa \times \frac{V \times N \times 100}{V_o}$$

Donde:

A = acidez del suero en porcentaje

fa = factor del ácido predominante (ácido láctico = 0.090)

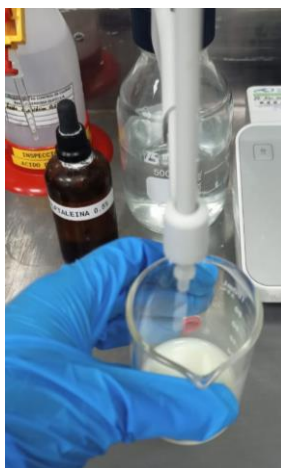
V = volumen de Hidróxido de Sodio (NaOH) en mL

N = normalidad de la solución de Hidróxido de Sodio (NaOH)

V_o = volumen de la muestra

Figura 7.

Titulación de la muestra de suero lácteo con NaOH



Determinación de sólidos

Una vez conocido el contenido de grasa y el valor de la densidad del suero, se pudo calcular el porcentaje de sólidos indirectamente o de manera teórica haciendo uso de la fórmula a continuación:

$$ES = \frac{L}{4} + (1.2 \times G) + 0.14$$

Donde:

ES = extracto seco (son los sólidos totales de la muestra)

L = grados del lactodensímetro

G = % de grasa

(Alayo, 2017).

Determinación de proteínas

Para determinar el porcentaje de proteínas presentes en la muestra de suero de mantequilla, se colocaron 9 mL de suero en un vaso de precipitación, se agregaron 3 gotas de fenoftaleína y se tituló con Hidróxido de Sodio (NaOH) 0.1 N hasta que se obtuvo un viraje de coloración a rosado persistente. A continuación, se añadieron 2 gotas de formol, se mezcló completamente y se dejó reposar la muestra por 5 minutos, consiguiendo la pérdida de color rosado de la muestra y tornándose amarillenta. Una vez transcurrido este tiempo se tituló la muestra nuevamente con Hidróxido de Sodio (NaOH) hasta que se consiguió un viraje de color a rosa pálido, siendo la lectura de este valor (V2) (Alayo, 2017). Para el cálculo del porcentaje proteico se emplearon las siguientes relaciones:

$$\%Proteína = V2 \times 2.00$$

$$\%Caseína = V2 \times 1.63$$

Extracción de las proteínas del suero

Para poder realizar el análisis a nivel proteico se inició con la extracción de las proteínas de la muestra de suero. En primer lugar, se tomaron 50 mL de la muestra de LS y bajo

agitación constante por 2 minutos se agregó a ella lentamente 25 mL de una solución de ácido tricloroacético (ATC) al 24%. Esta mezcla se dejó reposar por 60 minutos a temperatura ambiente y transcurrido este tiempo se observó la formación de dos fases. El sobrenadante (proteínas séricas) fue separado del precipitado (caseína) mediante filtración. A continuación, se colocaron 30 mL del filtrado en un vaso de precipitación y se añadieron 8 mL de una solución de ácido tricloroacético (ATC) al 50%, dejando esta etapa nuevamente en reposo, pero esta vez se colocó la solución bajo refrigeración a una temperatura de 5°C durante 60 minutos. La suspensión resultante se centrifugó a 7.000 r.p.m. a 5°C durante 10 minutos (Vega et al., 2019).

El sobrenadante obtenido se descartó y el precipitado se lavó con 10 mL de una solución de etanol-éter (1:1) y luego se centrifugó nuevamente la solución en las mismas condiciones de la etapa anterior. Finalmente, se descartó el filtrado y el precipitado final se suspendió en 300 µL de una solución de TRIS-HCl 0,05 M y EDTA 1 mM, ajustándose a un pH igual a 7,2 y se guardó la muestra bajo congelación a -20°C hasta realizar la corrida de las muestras en la siguiente etapa (Galindo et al., 2006).

Purificación de las proteínas

Las muestras que se obtuvieron del proceso de extracción con ácido tricloroacético (ATC) fueron analizadas por electroforesis PAGE-SDS. En esta técnica 15 µL de las muestras de los extractos proteicos fueron cargadas con 3 µL de buffer de carga y 2 µL de β-mercaptoetanol como agente reductor, con un voltaje constante de 150V, con una corriente entre 100 mA y usando geles de apilamiento y separación al 5% y 15% de una solución de Bis - acrilamida, respectivamente. La corrida se la realizó en una cámara de electroforesis vertical de la marca Thermo Scientific OWL P81 con un buffer tris-glicina a pH 8,3 durante un tiempo de 90 minutos aproximadamente. En todas las corridas se empleó un marcador de amplio espectro de la marca Molecular Probes by Life technologies REF P6649 (Vega et al., 2019).

Finalmente para visualizar las bandas de las proteínas encontradas, se realizó la tinción de los geles con 0,125% de azul de Coomassie R – 250 una solución de compuesta por 400 mL de etanol, 100 mL de ácido acético y 500 mL de agua destilada a temperatura ambiente, por un tiempo de 24 horas y una vez transcurrido este tiempo se realizó la decoloración en una solución de etanol:ácido:acético:agua (50:875: 75) (Galindo et al., 2006).

Análisis Estadístico

Para el diseño experimental y el análisis estadístico de las pruebas fisicoquímicas se utilizó el programa SPSS, el mismo que ayudó en el cálculo de la varianza de las muestras obtenidas del suero lácteo durante 10 días de producción como se observa en la Tabla A1 de los anexos.

Por otro lado, el peso molecular de las proteínas separadas en el gel se calculó mediante la elaboración de una curva de calibración, la cual se graficó considerando el logaritmo de la masa molecular de los marcadores y la movilidad relativa (R_f) de los mismos. Una vez obtenida la ecuación de los mínimos cuadrados a partir de estos datos, se determinó masa molecular aparente de las proteínas que forman parte del suero analizado.

Capítulo 4: Resultados y Discusión

Parámetros fisicoquímicos

Tomando en cuenta la producción diaria con tres paradas de elaboración de mantequilla, se analizaron un total de 30 muestras, y para cada una de ellas se analizaron todos los parámetros fisicoquímicos, con los cuales se pudo identificar el tipo de suero que se obtiene como desecho de esta producción.

Considerando los valores recopilados en la tabla del [Anexo 1](#), se realizó el análisis estadístico haciendo uso del programa SPSS, mediante el cual se obtuvo el valor de media, desviación estándar y valores mínimos y máximos para cada uno de los parámetros.

Según Alayo (2017), el pH de un suero obtenido de la producción de queso es igual a 6,52, además arroja valores de acidez iguales a 0,08% de ácido láctico, un contenido de grasa de 0,42% y un contenido proteico igual a 1,2%. Estos valores son muy diferentes en relación a los que se obtuvieron en el desarrollo de la investigación como se puede apreciar en la Tabla 2, con lo que se podría afirmar que en lo que respecta a su utilización a nivel de enriquecimiento de productos lácteos u otros productos de industrias como elaboración de productos cárnicos, el suero de mantequilla puede ser una mejor opción para aportar un mayor valor nutricional a los mismos, sin embargo este subproducto sigue siendo desechado y en la empresa de la que se tomaron las muestras se reutiliza una porción únicamente como complemento alimenticio y el resto es desechado para ser tratado en las plantas de tratamiento.

Tabla 3.*Datos del análisis estadístico para los parámetros fisicoquímicos*

Parámetro	pH	% Grasa	Densidad	Acidez (% ácido láctico)	Extracto Seco	Proteína (%)	Caseína (%)
Válido	30	30	30	30	30	30	30
Media	6,60400	0,2667	1,028905	0,118320	7,68500	2,74467	2,23700
Desviación Estándar	0,03838	0,0994	0,0007123	0,0067835	0,18303	0,10976	0,08960
Varianza	0,001	0,010	0,000	0,000	0,034	0,012	0,008
Mínimo	6,5500	0,1000	1,0270	0,1116	7,2600	2,5600	2,0900
Máximo	6,6700	0,4000	1,0300	0,1350	8,0000	3,1400	2,5600

Tomando en cuenta los resultados presentados en la Tabla 3, las muestras de suero analizadas pertenecen a un suero de tipo dulce, puesto que presenta un valor de pH promedio igual a 6,6 y una acidez de 0,12% expresada en porcentaje en masa de ácido láctico. Esto se corrobora con lo detallado en la Norma NTE INEN 2594:2011 ([Anexo 2](#)), en la que se indica que para considerarse suero dulce el rango de pH permitido es de 6,8 – 6,4, mientras que para los valores de acidez, estos no pueden superar el 0,16% (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2011).

Finalmente, según la Norma NTE INEN 2594:2011 el suero de toda industria debe ser analizado y cumplir con ciertos parámetros, entre ellos además de la acidez y el pH que ya se analizaron anteriormente, están: 0,8%< de proteína, <0,3% de grasa. Al comparar estos valores con los obtenidos en la investigación el suero cumple con estos parámetros, teniendo un 0,27% de contenido graso y un 2,74 % de proteínas.

Extracción y purificación de proteínas

El ácido tricloroacético (TCA) es un ácido muy parecido al ácido acético (AC), con la única diferencia de que los tres átomos de hidrógeno del grupo metilo del AC han sido reemplazados por átomos de cloro en el TCA. Este compuesto es ampliamente utilizado en procesos de precipitación de macromoléculas como proteínas, ADN y ARN (Laboratoriumdiscounter, 2021). Este método ha sido utilizado en esta ocasión, en primer lugar, para obtener la precipitación de la muestra y separar los residuos de caseína de las proteínas séricas (TCA24%) como se observa en la banda 1 de la Figura 9, y en segundo lugar para analizar al GMP con una segunda precipitación con TCA a un 50% de concentración como se aprecia en la banda 2 de la Figura 9.

Una vez realizada la destinción del gel, se obtuvieron unas bandas marcadas con claridad como se observa en la Figura 9. Para obtener el peso relativo de las proteínas presentes en el suero lácteo después de su tratamiento con TCA se realizó la medición de la distancia que recorrieron las proteínas en el gel y con ayuda de una regresión lineal según los datos del marcador molecular como se observa en la Figura 8, se determinó el Peso Molecular de las mismas aplicando la ecuación descrita a continuación:

$$\text{Log}(PM) = 0,2658D + 3,698$$

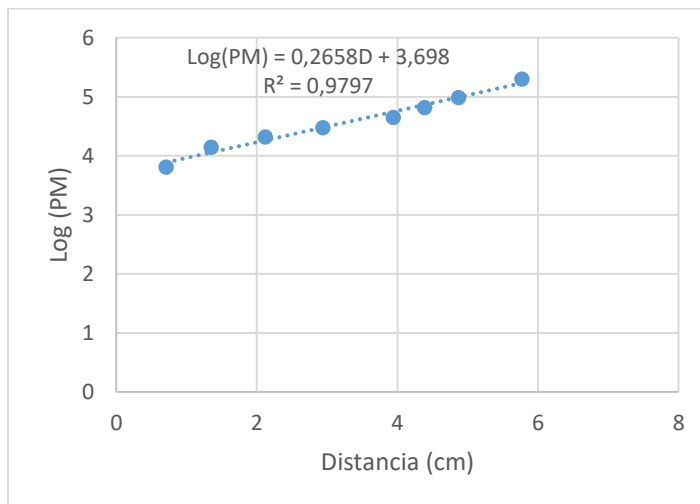
Donde:

PM = Peso Molecular en Da

D = Distancia recorrida por las proteínas (bandas azules marcadas en el gel)

Figura 8.

Gráfico de la regresión lineal obtenida con el $\text{Log}(PM)$ vs. la distancia recorrida por las bandas del marcador molecular.



Las principales proteínas séricas identificadas en las muestras de suero obtenidas del proceso productivo de mantequilla de la empresa Pasteurizadora Quito S.A. son la β -lactoglobulina, la α -lactoalbumina, y algunas proteínas menores.

Según Rojas y sus colaboradores (2009) el GMP tiene una masa molecular aproximada entre 6000 a 8000 Da, con lo que se comprueba la presencia de ese péptido en la muestra como se observa en la Figura 9 en la banda 2, donde se señala una banda teñida de un color leve que, mediante la ecuación obtenida, arroja un valor igual a 6256,7 Da, el mismo que se encuentra dentro del rango establecido según bibliografía.

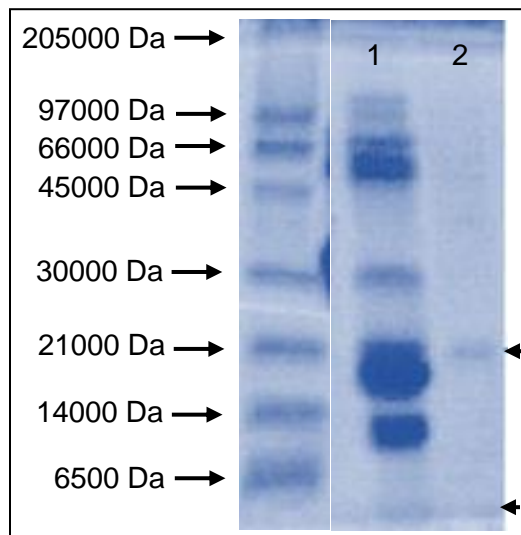
Por otro lado, se aprecian también algunas bandas mucho más teñidas en la misma figura en la banda 1, donde se identifican unos pesos moleculares iguales a 82293,2 Da, 75999,4 Da. Estos valores según Galindo y sus colaboradores (2006) pertenecen a las proteínas menores como la Lactoferrina, Transferrina respectivamente, puesto que, según varios estudios entre las proteínas menores del suero más conocidas se encuentran la Lactoferrina con un peso molecular de 88000 Da, la Transferrina con un peso entre 75000 –

77000 Da, la Microglobulina- β de 43000 Da de peso, valores que son muy similares a los obtenidos en la electroforesis realizada en este estudio.

Finalmente, y consideradas las más importantes de las proteínas séricas, se pudo obtener la β -lactoglobulina y α -lactoalbumina con unos pesos de 18259,8 Da y 14294,7 Da respectivamente. Según estudios realizados, las proteínas que predominan en las muestras de suero por lo general de tipo dulce son de peso aproximado a 18 kDa y 14,2 a 16 kDa, correspondientes a β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina respectivamente (Rojas et al., 2009).

Figura 9.

Perfil electroforético de proteínas de suero de leche



Capítulo 5: Conclusiones

Las muestras obtenidas de la producción de mantequilla de la empresa Pasteurizadora Quito S.A. corresponden a las características de un suero dulce o buttermilk, con valores iguales a: 6,6 de pH, 0,27% de grasa, 1,027 de densidad, 0,12 % en masa de ácido láctico, 2,74% de proteína y 2,24% de caseína.

El suero lácteo desechado en esta industria cumple con los parámetros requeridos según la Norma NTE INEN 2594:2011, y aunque sigue siendo problema al momento de ser tratado en la planta de tratamiento de aguas residuales es muy rico en proteínas por lo que se considera una sustancia muy rica en nutrientes y puede ser reutilizada en la industria de alimentos principalmente.

Después del proceso de extracción y purificación realizado, las proteínas encontradas en las muestras de suero de leche obtenido de la producción de mantequilla en la empresa Pasteurizadora Quito S.A. fueron la β -lactoglobulina con un peso molecular igual a 18259,8 Da, la α -lactoalbumina con 14294,7 Da, y proteínas séricas menores como la Lactoferrina con 82293,2 Da, la Transferrina con 75999,4 Da y el GMP con a 6256,7 Da.

Capítulo 6: Recomendaciones

Este trabajo de investigación está orientado al análisis del suero desechado por esta industria, por lo que se recomienda utilizar los resultados de este estudio como base o un inicio para la búsqueda de nuevas opciones en las que se podría disminuir el deshecho de este subproducto y aprovechar sus excelentes características no solamente como complemento alimenticio para animales sino también como un crecimiento a nivel industrial, optando por la elaboración de nuevos productos a partir del suero como bebidas, concentrados proteicos, entre otros.

Las muestras de suero son susceptibles a cambios bruscos de temperatura, por lo que se recomienda transportar las muestras en un cooler y realizar la extracción de proteínas el mismo día, evitando guardar las muestras por tiempos prolongados.

Después de haber analizado tanto las propiedades fisicoquímicas como las proteínas presentes en el suero, se recomienda buscar alternativas a nivel productivo para poder reutilizar este desecho, puesto que según sus características es muy rico a nivel proteico.

Capítulo 7: Bibliografía

- Alayo, A. (2017). *Determinación de las características fisicoquímicas del suero obtenido de la fabricación de mantequilla de leche de vaca*. Universidad Nacional de Trujillo.
- Arroyo, Y., & Jiménez, Y. (2013). EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ALFA LACTOALBÚMINA EXTRAIDA DEL LACTOSUERO DULCE EVAPORADO. In *Skripsi*. Universidad de Cartagena.
- BioTed. (2000). *Electroforesis vertical de proteínas*. 11.
- Candioti, M. (1999). *RESPUESTA DE LAS PROTEÍNAS DEL SUERO DE LA LECHE BOBINA A LA ACCIÓN DE DIVERSAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DE USO INDUSTRIAL*. Universidad Nacional del Litoral.
- Centro de Industria Láctea del Ecuador. (2018). *Datos del sector lechero*. CILECUADOR. https://e152f73b-81b4-4206-a6ee-8b984b6a13b0.filesusr.com/ugd/6cc8de_513a9bb8db76451a9a74586d7902bb3b.pdf
- Cubilla, A., Flores, M., Barúa, J., & Romero, M. C. (2020). Evaluación de metodologías para el análisis de perfil de proteínas secretadas por aislados de *Trichoderma* spp. al medio de cultivo. *Investigaciones y Estudios - UNA*, 11(1), 47–51. <https://doi.org/10.47133/ieuna6>
- FAO-PRODAR. (2014). *Fichas técnicas Procesados de lácteos*.
- Flores, P. (2015). *ELABORACIÓN DE MANTEQUILLA*. Universidad Nacional de San Agustín.
- Galindo, L. M., Valbuena, E., & Villarroel, E. (2006). ESTANDARIZACIÓN DE LA DETECCIÓN DEL GLICOMAPEPTIDO POR PAGE-SDS DE LA LECHE. *Redalyc*, 16, 308–314.
- García, V., Sánchez, R., & Ramón, T. (2018). *SUERO DE LECHE. La ciencia detrás de su rescate* (G. Compás (ed.); Primera Ed).
- Guerrón, P. (2015). *OBTENCIÓN DE CONCENTRADO PROTEICO MEDIANTE TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS A PARTIR DE SUERO LÁCTEO DE CABRA*. Universidad Central del Ecuador.
- Guevara, L., & León, R. (2019). *Aprovechamiento del lactosuero dulce en la elaboración de un*

- alimento enriquecido con Hordeum vulgare y Pasiflora edulis*. (Vol. 6, Issue 3). Universidad de Guayaquil.
- Iniesta, D. (2020). *Desarrollo De Nuevos Productos a Base De Suero De Queseria*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2011). *NTE INEN 2594 Suero de Leche Líquido, requisitos*. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/2594.pdf>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2017). *NTE INEN 0004: Leche y productos lácteos. Muestreo*.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN. (1973). *LECHE. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE GRASA - NTE INEN 12*.
- Laboratoriumdiscounter. (2021). *Ácido tricloroacético* . Laboratoriumdiscounter. <https://www.laboratoriumdiscounter.nl/es/quimicos/a-z/t/acido-tricloroacetico/>
- Lapeña, S., & Hierro, E. (2018). Alergia a proteínas de leche de vaca. *Pediatra Integral*, 2, 76–86.
- López, Á., Barriga, D., Jara, J., & Ruz, J. M. (2016). Determinaciones Analíticas en Leche. In *JUNTA DE ANDALUCÍA. Instituto de investigación y formación agraria y pesquera*.
- Pais, J., Núñez, J., Trujillo, L., Lara, M., Rivera, L., Abril, V., & Cuaran, M. (2017). Milk Whey- From a Problematic Byproduct to a Source of Valuable Products for Health and Industry in Ecuador: An Overview from Biotechnology. *La Prensa Medica Argentina*, 103(4). <https://doi.org/10.4172/lpma.1000257>
- Parra, R. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 62(1), 4967–4982.
- Ritchie, C. (2012). Purificación de proteínas. *Labome the World of Laboratory*, 14–15.
- Rojas, E., Valbuena, E., Torres, G., García de H., A., Piñero, M., & Galindo, L. M. (2009). Aislamiento y rendimiento del GMP mediante precipitación de lactosuero con ácido tricloroacético. *Revista Científica*, 19(3), 295–302.

Valencia, E., & Ramírez, M. (2009). La industria de la leche y la contaminación del agua.

Redalyc, 16.

Vega, C., Chegwin, C., & Ardila, H. (2019). Condiciones para el análisis de proteínas del micelio de *Lentinula edodes* obtenido por fermentación en estado líquido. *Revista Colombiana de Química*, 48(3), 3–12. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v48n3.74843>

Capítulo 8: Anexos