



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Análise comparativa do contido en proteínas entre leite de distinta
orixe: vaca, cabra, soia e arroz**

**Análisis comparativo del contenido en proteínas entre leche de distinto
origen: vaca, cabra, soja y arroz**

**Comparative analysis of the protein content among milk of different
origin: cow, goat, soy and rice**

Paula Palleiro Mosquera

Xuño, 2019

*Directora Académica: M^a Esther Rodríguez Belmonte
Codirectora : M^a Graciela Estévez Pérez*



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Dna. María Esther Rodríguez Belmonte, profesora titular do Departamento de Bioloxía da Facultade de Ciencias da Universidade da Coruña, e Dna. María Graciela Estévez Pérez, do Departamento de Estatística e Investigación Operativa da Universidade da Coruña, autorizan a presentación do Traballo de Fin de Grao "**Análise comparativa do contido en proteínas entre leite de disto orixe: vaca, cabra, soia e arro.**" presentado pola alumna **Paula Palleiro Mosquera** , para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

En A Coruña a 20 de Xuño do 2019

Asinado: M. Esther Rodríguez Belmonte

Asinado: Graciela Estévez Pérez

ÍNDICE

Resumen/Summary

Palabras clave

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	5
3. Material y métodos.....	5
4. Resultados.....	11
4.1 Análisis del proyecto piloto.....	11
4.2 Análisis del proyecto.....	12
5. Discusión.....	17
6. Conclusiones/Conclusions.....	18
7. Bibliografía.....	18

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1	4
Figura 2	4
Figura 3	10
Figura 4	11
Figura 5	12
Figura 6	13
Figura 7	14
Figura 8	15
Figura 9	15
Figura 10	16
Tabla 1	6
Tabla 2	11
Tabla 3	12
Tabla 4	15

RESUMEN

La leche animal es uno de los productos alimenticios más importantes en la dieta humana debido a su alto contenido en nutrientes esenciales y una fuente importante de proteínas. Sin embargo, el consumo de leche animal se ha visto reducido estos últimos años siendo reemplazada por las bebidas vegetales cuyos niveles de proteína y valor nutricional son, por lo general, inferiores. En este trabajo se ha realizado una cuantificación de proteínas de cuatro tipos de leche de origen animal y vegetal (vaca, cabra, soja y arroz) pertenecientes a la misma marca comercial con el objetivo de determinar estadísticamente si la cantidad de proteínas es significativamente distinta entre los diferentes tipos. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método Bradford midiendo la absorbancia a 595nm en un lector multi-modal de microplacas Synergy H1.

Los datos obtenidos se analizaron mediante los programas RCommander y RStudio para determinar si existían diferencias mediante un ANOVA I. Los resultados indican que la leche de cabra es la que presenta una mayor cantidad de proteína mientras que la de arroz es la que presenta los niveles más bajos, siendo significativas las diferencias entre los cuatro tipos de leche. Además del nivel de proteínas, también es importante el valor nutricional de las mismas. En experimentos futuros sería interesante realizar otros proyectos en los que se incluyeran más tipos de bebidas vegetales o varias marcas para determinar si existen diferencias de nivel de proteínas entre ellas.

PALABRAS CLAVE

Arroz, bebida vegetal, Bradford, cabra, cuantificación, dieta, leche, leche animal, nutrientes, proteínas, soja, vaca, vegano

SUMMARY

Animal milk is one of the most important food products in the human diet due to its high content of essential nutrients and as an important source of protein. However, the consumption of animal milks has been reduced in recent years by being replaced by vegetable drinks whose protein levels and nutritional value are generally lower. In this work, a quantification of proteins of four types of milk of animal and vegetable origin (cow, goat, soybean and rice) belonging to the same brand has been carried out in order to determine statistically if the amount of proteins is significantly different between different types. Protein quantification was performed using the Bradford method of protein quantification by measuring absorbances at 595nm with a Synergy H1 hybrid multi-mode microplate reader. For the analysis of the data, the RCommander and RStudio programs were used, through which a previous analysis of the obtained data was carried out to determine if there were differences by means of an ANOVA I. The results indicate that goat's milk is the one that presents the highest amount of protein while rice's is the one that presents the lowest levels, being significant the differences between the four types of milk. In addition to the level of proteins, the nutritional value of them is also important. In future experiments, it would be interesting to carry out other projects that include more types of vegetable drinks or several brands to determine if there are differences in the level of proteins between them.

KEY WORDS

Animal milk, cow, Bradford, diet, goat, milk, nutrients, proteins, quantification, rice, soy, vegan, vegetable drin

1. Introducción

La leche es uno de los productos alimenticios básicos más consumidos a nivel mundial. Sin embargo, este consumo ha descendido en los últimos años siendo poco a poco reemplazado por el de bebidas de origen vegetal, cada vez más populares y deseadas, lo cual se refleja en el creciente número de bebidas vegetales disponibles en el mercado.

Es importante hacer hincapié entre las diferencias de estas dos categorías de leche ya que esta determinación causó gran controversia por englobar en el término “leche”, no solo a productos de origen animal, sino también a los de origen vegetal. Coloquialmente a las bebidas de origen vegetal que se asemejan en apariencia a la leche animal se las denomina “leches vegetales” sin embargo, el uso de esta terminología se vio que podía causar confusión al consumidor al pensar que la leche animal y vegetal eran equivalentes. Por ello, finalmente el Tribunal de Justicia Europea (Sentencia del 14 de junio de 2017, asunto C-422/16)¹ declaró una sentencia en la que se prohibió el uso de la palabra “leche” para la venta de productos puramente vegetales, que deberían pasar a llamarse “bebidas vegetales”. De este modo, la leche solo englobaría a la secreción producida por los mamíferos y, por tanto, a las leches animales. Según un artículo publicado por Haug y colaboradores en 2007 (Haug, A. *et al.*, 2007), de los diferentes tipos de leche de origen animal, la leche de vaca es el tipo más consumido por excelencia. Se la considera un componente importante en la dieta humana ya que contiene numerosos nutrientes esenciales (como determinados aminoácidos) y es una fuente de lípidos, proteínas, factores de crecimiento y ácidos grasos, además de presentar propiedades antimicrobianas, promover la absorción de otros nutrientes, estimular el sistema inmunológico, etc. (Haug, A. *et al.*, 2007). De entre todas las proteínas, la más importante y la que se encuentra en mayor proporción es la caseína, la cual representa el 80% del total de proteínas de la leche (Jenness, R., 1988).

Sin embargo, pese a sus numerosas propiedades, algunas de estas proteínas son alérgenos potenciales incluso a concentraciones bajas, derivando en lo que se conoce como alergia a las proteínas de la leche, la cual suele darse especialmente entre lactantes y niños de hasta 3 años. A partir de esa edad, la alergenicidad tiende a aumentar en un 35% en niños de entre 5 y 6 años, pudiendo aumentar aún más hasta llegar a la adolescencia (Vanga, K. y Raghavan, V., 2018). Otro problema común es la intolerancia a la lactosa, ocasionada por un déficit de la enzima lactasa en el tracto digestivo, la cual es una patología de la que se estima que un 70% de la población mundial se ve afectada por ella. La prevalencia y la edad a la que se manifiesta varían en función de los diferentes grupos étnicos (Asociación de intolerantes a la lactosa España, (ADILAC), 2019). Estos dos factores, hacen que la leche de vaca y en general, la mayoría de leches de origen animal, puedan no ser aptas para todos los consumidores.

¹ Sentencia del Tribunal de Justicia de la Unión Europea (asunto C-422/16: Verband Sozialer Wettbewerb / TofuTown.com), de 14 de junio de 2017. Procedimiento prejudicial — Organización común de mercados de los productos agrícolas — Reglamento (UE) n. o 1308/2013 — Artículo 78 y anexo VII, parte III — Decisión 2010/791/UE — Definiciones, designaciones y denominaciones de venta — “Leche” y “productos lácteos” — Denominaciones utilizadas para la promoción y comercialización de alimentos puramente vegetales. Recuperado de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:62016CJ0422&from=ES>

Los valores nutricionales obtenidos a partir de la Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA) determinan que la leche de vaca entera presenta la siguiente composición: valor energético de 65kcal/100mL; 3,8g/100mL de grasa; 3,06g/100mL de proteína; 4,7 g/100mL de carbohidratos y otros componentes como vitaminas y minerales en menor proporción (Consortio BEDCA y Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, BEDCA, 2007).

La leche de cabra por su parte, posee ciertas ventajas sobre la leche de vaca para el consumo humano puesto que, presenta ciertos valores terapéuticos tanto en medicina como en nutrición y una mejor digestibilidad y capacidad de tamponación (Yangilar, F., 2013).

Además, es una fuente importante de proteínas, fósforo y calcio entre otros componentes. Las proteínas de la leche de cabra son hipoalérgicas, algo interesante a tener en cuenta para los consumidores que presentan alergia a las proteínas de la leche, aunque, si bien también contiene lactosa, sus valores son inferiores a los que posee la leche de vaca (Park, Y., 2016).

Los valores nutricionales recogidos a través de la BEDCA para la leche de cabra determinan: un valor energético de 65kcal/100mL; 3,7g/100mL de grasa; 3.4g/100mL de proteína; 4.4g/100mL de carbohidratos y otros componentes como vitaminas y minerales en menor proporción (Consortio BEDCA y Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, BEDCA, 2007). Sus valores nutricionales son semejantes a los de la leche de vaca con una mayor proporción de proteínas y grasa. En ambos casos, estos valores nutricionales se ven afectados por numerosos factores como la raza del animal, la edad, la estación del año, la alimentación, etc. (Haug, A. *et al.*, 2007).

Por ello, los valores que aparecen representados en las etiquetas de los envases a disposición del consumidor, son niveles mínimos que debe contener dicha leche para cada uno de los parámetros mencionados.

En cuanto a las bebidas vegetales, generalmente son suspensiones coloidales o emulsiones a partir de distintas partes de plantas desintegradas que se asemejan a la leche de vaca en apariencia (Mäkinen, O. *et al.*, 2016). El proceso general consiste en moler la materia vegetal humedecida para extraer sus componentes. Los residuos de la molienda son posteriormente separados por filtración o decantación y dependiendo del tipo de bebida vegetal que sea, se le adicionan otros ingredientes. Finalmente se produce la homogeneización y la pasteurización (Mäkinen, O. *et al.*, 2016).

En vista al creciente consumo de este tipo de bebidas, los autores Sethi y colaboradores mencionan una clasificación general en 5 categorías según el tipo de planta utilizada (Sethi, S. *et al.*, 2016):

- A base de cereales: bebida de avena, arroz, maíz, trigo, espelta
- A base de legumbres: bebida de soja, cacahuete, lupino, judía
- A base de frutos secos: bebida de almendras, coco, avellana, pistacho, nuez
- A base de semillas: bebida de sésamo, lino, cáñamo, girasol.

La bebida vegetal más popular es la leche de soja. Su uso se remonta a 2000 años atrás en China. Es muy común como sustituta de la leche de vaca fundamentalmente entre las

personas con alergia a las proteínas de la leche o intolerancia a la lactosa. Además, la bebida de soja es una buena fuente de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, considerados buenos para la salud (Sethi, S. *et al.*, 2016). La presencia de isoflavonas en su composición es otro de sus puntos a favor, puesto que existen evidencias de que el consumo de este compuesto está relacionado con la disminución de síntomas de la menopausia, prevención de enfermedades cardiovasculares y de otras enfermedades crónicas, como la osteoporosis tal como señalan Mendoza y colaboradores (Mendoza, D. *et al.*, 2015).

La composición nutricional, según la base de datos BEDCA para la bebida de soja es de: un valor energético de 53kcal/100mL; 3,2g/100mL de proteínas; 1.84g/100mL de grasa, 5,76g de carbohidratos y minerales y vitaminas en menor proporción (Consortio BEDCA y Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, BEDCA, 2007).

En cuanto al otro tipo de bebida vegetal que tratamos en esta memoria, la “leche” de arroz, puede ser preparada mezclando arroz integral molido con agua. El arroz es uno de los alimentos con mayor fuente de carbohidratos. Estos carbohidratos son convertidos en azúcares durante la producción de la bebida de arroz, lo que le da su sabor dulce característico. Es una de las alternativas al uso de leche de origen animal, pero también al uso de bebidas vegetales ya que algunas de éstas, como la de soja o almendra, pueden ocasionar reacciones alérgicas en los consumidores (Vanga, K. y Raghavan, V., 2018).

La composición nutricional de este tipo de bebida según datos proporcionados por la marca utilizada a lo largo de este trabajo (puesto que esta información no aparece registrada en el BEDCA), señala un valor energético de 55kcal/100mL; 1g/100mL de grasa; 0.3g/mL de proteína; 11,2g/100mL de carbohidratos entre otros componentes como vitaminas o minerales que se encuentran en menor cantidad.

La cantidad de proteínas de esta bebida es claramente inferior a la que se encuentra en las leches animales e incluso en otras bebidas vegetales y ha sido recomendado suplementar su consumo con aminoácidos en los que también es deficiente y combinarlo con alimentos ricos en proteínas como las legumbres (Trejo, J., 2015).

Como se mencionó al inicio, el consumo de leche de origen animal ha descendido a nivel internacional en los últimos años.

Según datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) correspondientes al año 2017, desde el año 2000 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, MAPA, 2018) se ha producido un continuo descenso del consumo de leche, tal como puede verse representado en la Figura 1.

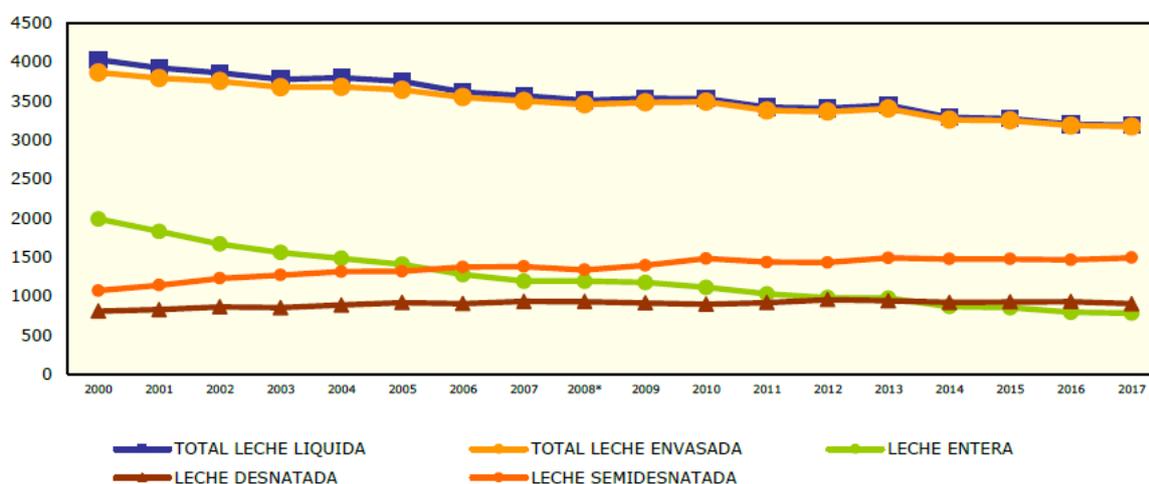


Figura 1. Evolución del total de compras de leche líquida envasada desde el año 2000 a 2017. Gráfica extraída a partir del Informe del consumo de alimentación en España 2017 publicado por el MAPA



Figura 2. Porcentaje de variación del valor en euros y en volumen en litros del consumo de leche entera, semidesnatada y desnatada sobre el año anterior. Gráfica extraída a partir del Informe del consumo de alimentación en España 2017 publicado por el MAPA

Este descenso se produce por igual tanto en el total de leche líquida (leche de larga y corta duración) como en la leche envasada, la cual a su vez se subdivide en leche entera, semidesnatada y desnatada. De estos tres subtipos, el más afectado es la leche entera, experimentando (detallado en la Figura 2) un descenso entre el año 2016-2017 en compra de un 1,5%. La leche desnatada ha sufrido una caída en el consumo del 3% mientras que la leche semidesnatada ha aumentado ligeramente respecto a ésta con un incremento de un 1,9%, el cual no es suficiente para compensar el descenso de la leche entera (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, MAPA, 2018).

Por el contrario, las bebidas de origen vegetal (junto con las leches enriquecidas y las “sin lactosa”, han experimentado, según datos de IRI (Information Resources, Incorporated) para el TAM (Total Año Móvil) de noviembre de 2017, un crecimiento de un 8,3% en su volumen de ventas (Revista Aral, 2018).

Las principales razones por las que el consumo de bebidas vegetales ha aumentado se pueden atribuir a varios motivos. Se ha estimado que un número creciente de consumidores emplean estas bebidas como sustitutos de la leche, bien por razones de salud como puede ser la intolerancia a la lactosa o la alergia a las proteínas de la leche animal (Mäkinen, O. *et al.*, 2015), o bien por su estilo de vida en respuesta a un creciente escepticismo por parte de la población sobre el consumo de estos productos, a veces relacionados con un posible aumento del riesgo de padecer ciertas enfermedades o por el temor de la posible presencia de antibióticos en la propia leche (Jeske, S. *et al.*, 2018). Otro factor que cada vez tiene mayor peso, es la elección personal de una dieta determinada en la que no se consuman esta clase de productos de origen animal, como es el caso del veganismo, paleodieta y otras (Kongerslev Thorning *et al.*, 2016).

Este incremento de consumo de “leches” vegetales en sustitución a la leche de origen animal comienza a ser, en algunos casos, un tema preocupante de salud a causa de la falta de información de las familias sobre las consecuencias reales que implica sustituir por completo el consumo de leche animal por bebidas vegetales. Es especialmente preocupante en niños y lactantes en los que ya se han reportado casos con deficiencias nutricionales severas a causa del posible reemplazo de la leche de vaca por las nuevas alternativas vegetales (Chalupa-Krebzdak, S. *et al.*, 2018).

2. Objetivos

Cuantificación de los niveles medios de proteína total en leche de distinto origen (animal y vegetal) y análisis estadístico con el fin de averiguar si existen diferencias significativas entre los mismos.

3. Material y métodos

Toma y recogida de muestras

Se tomaron una serie de muestras de cuatro tipos de leche (vaca, cabra, soja y arroz) pertenecientes a la misma marca comercial que denominaremos (M).

Dado que el objetivo es comparar los niveles medios de proteína entre los distintos tipos de leche, se seleccionó una marca comercial que produjera cuatro tipos distintos sin componentes añadidos (extra de calcio, sabor determinado, fibra, etc.) para descartar que la marca pudiera ser un posible factor que influyera en el resultado.

Además, como la leche de origen animal generalmente presenta tres subtipos: entera, semidesnatada y desnatada, se eligió el subtipo “semidesnatada” para los tipos de leche vaca y cabra puesto que esta marca solo trabaja con leche de cabra de tipo semidesnatada.

La recogida de las muestras se realizó por medio de la adquisición de cartones de leche con distinta fecha de caducidad y número de lote para asegurar que dichas muestras eran diferentes y poder, de este modo, detectar con mayor facilidad posibles errores debido al muestreo en los datos obtenidos.

El contenido proteico declarado por la marca en cada tipo de leche aparece recogido en la Tabla 1. Dichos valores corresponden al nivel mínimo de proteína expresado en g/100mL, que debe contener el tipo de leche consumido. Según estos valores mínimos, la leche de cabra sería el tipo de leche con mayor contenido en proteínas mientras que la “leche” de arroz sería la que presenta una menor cantidad, siendo la leche de vaca y soja las más semejantes entre sí. Estos son los datos que esperamos obtener tras realizar el análisis de las muestras.

Tabla 1. Distintos tipos de leche utilizados con sus valores comerciales de contenido en proteínas

Tipo de leche	Contenido proteico declarado
Vaca	3,1 g/100mL
Cabra	3,4 g/100mL
Soja	3,1 g/100mL
Arroz	0,3 g/100mL

Las muestras se recogieron en viales de cristal con tapa y se conservaron en el frigorífico para evitar cualquier tipo de alteración en espera de ser procesadas. Para no romper la cadena de frío se transportaron los viales en bolsas de frío que mantenían dichas condiciones.

Para cada una de las muestras se anotó su fecha de caducidad, nº de lote, el valor de nivel de proteína expresado en la etiqueta en g/100mL y el día en el que fueron procesadas.

Para cuantificar la cantidad de proteínas presente en las distintas muestras se empleó el método de Bradford, puesto que es uno de los más utilizados para este fin. La determinación se produce mediante la formación de un complejo entre el colorante azul de Coomassie y las proteínas que se encuentren disueltas. En su forma libre, el reactivo de Bradford presenta una coloración marrón oscura que torna a azul al unirse a las proteínas y que además absorbe a 595nm. Por este motivo, el método se basa en la estimación de la cantidad de colorante que se ha unido midiendo su absorbancia en un espectrofotómetro a 595nm (Johnson, M., 20)

Preparación del reactivo Bradford

El reactivo de Bradford (de la casa comercial Bio-Rad) se utilizó en una proporción 2:10 en agua bidestilada MilliQ. Se conservó dicho reactivo en la nevera tapado de modo que no estuviera expuesto a la luz.

Preparación de la recta patrón

Se utilizó BSA (Albúmina sérica bovina) concentrada a 1 mg/mL para realizar la recta patrón en concentraciones crecientes de 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1 mg/mL al que después se le añadieron 190µL de reactivo Bradford.

Como blanco se utilizó agua bidestilada MilliQ.

Precipitación de proteínas

La precipitación de las proteínas de las diferentes muestras se realizó mediante el siguiente protocolo:

1. Se tomó 1mL de leche y se transfirió a un tubo Eppendorf, etiquetado con el número de la muestra correspondiente.
2. Se añadieron 100 μ L de acetato al tubo que mezclaron por inversión hasta ver aparecer pequeños acúmulos de precipitación.
3. Se centrifugó a 13000 r.p.m/10min
4. Se retiró el sobrenadante transfiriéndolo a un tubo Eppendorf nuevo, el cual se etiquetó con el subíndice S (sobrenadante) mientras que el precipitado se nombró con el subíndice P (precipitado).
5. Se conservaron ambos tubos y se congelaron para su posterior procesado. Se realizó el mismo procedimiento en todas las muestras hasta tener las suficientes para realizar una primera medida.

Procesado del sobrenadante S

El sobrenadante S congelado se conservó tal cual. Permitiendo posteriormente que se descongelara a temperatura ambiente. A continuación, se le hizo una dilución 1:100 para poder realizar la medida.

Procesado del precipitado P

1. Se descongeló el precipitado dejándolo a temperatura ambiente y se lavó con 500 μ L de agua destilada fría.
2. Se centrifugó a 13000 r.p.m/2min y se descartó el agua.
3. Se resuspendió agregando 2mL de NaOH 0.1M previamente preparado el cual se agitó en el vortex.
4. Se centrifugó de nuevo a 13.000 r.p.m/2min
5. Se pasó el sobrenadante que contendría las proteínas a un nuevo tubo Eppendorf previamente etiquetado y al que se le añadió el subíndice PS (sobrenadante del precipitado). También se descartó el precipitado insoluble en el NaOH.
6. Se realizó una dilución 1:100 (10 μ L de muestra con 990 μ L de agua destilada) del sobrenadante PS y se conservó para realizar la medida.

Medida de proteínas por el método Bradford

Para realizar la medida se dispone, para cada tipo de leche y tanda de muestreo, de:

- ✓ Sobrenadante de la muestra (S)
- ✓ Sobrenadante extraído a partir del precipitado diluido (PS) 1:100
- ✓ Recta patrón de BSA

1. Se preparó una microplaca de 96 pocillos para realizar las medidas. En cada uno de los pocillos se añadieron 5 μ L de muestra (sobrenadantes conservados), 5 μ L de agua bidestilada MilliQ y 190 μ L de reactivo de Bradford previamente preparado. También se incluyó la recta patrón elaborada con BSA.

2. Se introdujo la placa en un lector multi-modal de microplacas Synergy H1 y se realizó la medida a 595nm. Los datos se recogieron en el programa Microsoft Excel (2016) para su posterior análisis.
3. Se representó la recta patrón en la hoja de cálculo Microsoft Excel (2016) y a partir de ella se estimaron los datos de la cantidad de proteína en mg/mL que había en cada muestra.
4. Para facilitar la comparación de la cantidad de proteína con el valor establecido en la etiqueta del cartón de leche, los datos se expresaron en g/100mL

La recta patrón se elaboró todas las veces que se realizó una medida en el lector de microplacas Synergy H1 para asegurar que los valores obtenidos se ajustaban a la realidad.

Reajuste del protocolo

Tras un primer análisis de la cantidad de proteína de las muestras analizadas, se decidió realizar una serie de modificaciones al protocolo utilizado puesto que se encontraron dificultades para resuspender todo el precipitado en algunas muestras y existían sospechas de que se podría estar perdiendo proteína por esa causa, obteniendo valores que no se ajustarían tanto a la realidad. Además, se elaboró de nuevo la BSA para descartar un posible error de medida por esta causa. Dichas modificaciones aparecen ahora resaltadas en negrita.

Se siguieron los siguientes pasos:

1. Se tomaron **0,5mL** de leche y se transfirieron a un tubo Eppendorf previamente etiquetado con el nombre de la muestra correspondiente.
2. Se añadieron 100µL de acetato al tubo, mezclándose por inversión hasta ver aparecer pequeños trozos de precipitado.
3. Se centrifugó a 13000 r.p.m. durante **5 min**
4. Se retiró el sobrenadante y se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo previamente etiquetado con el subíndice S (sobrenadante) mientras que el precipitado tenía el subíndice P (precipitado).
5. Se congelaron las muestras de sobrenadante y precipitado.

Procesado del sobrenadante S

El sobrenadante S congelado se conservó tal cual estaba permitiendo que se descongelara y se le hizo una dilución 1:100 para poder realizar la medida.

Procesado del precipitado P

1. Se descongeló el precipitado dejándolo a temperatura ambiente y se lavó con 500µL de agua destilada fría.
2. Se centrifugó a 13000 r.p.m./2min y se descartó el agua.
3. Se resuspendió con **1mL** de NaOH 0.1M
4. Se centrifugó de nuevo a 13.000 r.p.m./2min

5. Se transfirió el sobrenadante que contiene las proteínas a un nuevo tubo Eppendorf al que se le etiquetó añadiéndole el subíndice PS (sobrenadante del precipitado) y se descartó el precipitado.
6. Se diluyeron las muestras de sobrenadante PS 1:100
7. Se midió el nivel de proteínas con el reactivo Bradford en el lector de microplacas Synergy H1 a 595nm por el procedimiento explicado anteriormente, guardándose los datos de las absorbancias en un archivo de Microsoft Excel (2016).

Para realizar los cálculos y obtener la concentración de proteína, se representó en Microsoft Excel (2016) la gráfica de la recta patrón de BSA y se obtuvo su ecuación a partir de la cual se calculó (sustituyendo los valores de absorbancia en la misma) la concentración de proteínas del pocillo expresado en mg/mL.

A partir de estas concentraciones, y sumando las proteínas medidas en el sobrenadante S junto con las del sobrenadante PS (donde se encuentra la mayor cantidad de las mismas) se estimó cuál era el nivel de proteína en la muestra analizada y se expresó este dato en g/100mL, tal y como viene expresado en la etiqueta del cartón de leche.

Se utilizó este mismo protocolo para todas las muestras del experimento piloto y posteriormente para el proyecto realizado.

Para descartar la posibilidad de estar perdiendo mucha proteína en el proceso de precipitación, se midió el contenido en proteína total con la muestra sin procesar. Para ello se tomaron 100µL de la muestra de leche, los cuales se pasaron a un tubo Eppendorf y se diluyeron con agua destilada en proporción 1:100. Al igual que con el resto de muestras, se colocaron 10µL de muestra en el pocillo junto a 190µL de reactivo Bradford para medir en el lector de microplacas Synergy H1 a 595nm.

Tras comprobar que los valores obtenidos en las muestras procesadas no diferían mucho de los medidos a partir de la muestra sin procesar, se pudo concluir que el protocolo utilizado era el adecuado.

Análisis de los datos obtenidos

Se realizó un experimento piloto, considerando 6 muestras de leche de cada uno de los cuatro tipos de interés, con el propósito de estimar la variabilidad de los niveles de proteína en leche, uno de los parámetros necesarios para determinar el tamaño muestral mínimo que garantiza una elevada potencia estadística en el análisis. Los datos obtenidos, tanto para el experimento piloto como para el proyecto en general, se analizaron con los programas RCommander (v.3.5.1) y RStudio (v.1.1.463).

Se realizó un análisis exploratorio previo de los datos para obtener sus medias, desviaciones estándar, coeficientes de variación, asimetría y apuntamiento según el tipo de leche y se realizó una representación gráfica de los mismos por medio de histogramas y un diagrama de cajas (ver en detalle en el apartado Resultados).

Posteriormente, se ajustó un modelo lineal para explicar la proteína en función del tipo de leche y se obtuvo una estimación de la varianza del nivel de proteína de 0,031.

También se realizó un análisis de los residuos del modelo para comprobar que se cumplían los supuestos necesarios para realizar el ANOVA.

Estimación del tamaño muestral

La estimación del número de muestras necesario se calculó utilizando el paquete de R “pwr” mediante la siguiente secuencia de comandos:

```
# Determinación del tamaño muestral
```

```
k = 4; del = 0.2; sig2 = 0.031; alpha = 0.05; pwr = 0.80
```

```
pwr.anova.test(k = k, sig.level = alpha, power = pwr, f = sqrt(del^2/(2*k*sig2)))
```

El parámetro k es el nº de niveles del factor tratamiento del ANOVA, en este caso, “4” (los distintos tipos de leche).

El valor delta “del”, determina la mínima diferencia significativa que se desea detectar entre dos medias. En este caso se estimó que sería de 0,2 a partir de los valores proporcionados por las etiquetas de los envases de leche.

La varianza entre grupos calculada previamente (0,031) es el parámetro “sig2”.

El nivel de significación alfa (alpha) determina la probabilidad de encontrar diferencia significativa entre los tipos de leche cuando realmente no existe (error tipo I). Generalmente se fijan valores del 5% y es el que se utilizó en este caso.

La potencia (pwr) es la capacidad del test para detectar diferencias reales entre los tipos de leche (1- P(error de tipo II), es decir, cuando se mantiene que no hay diferencias y realmente las hay). En este caso, se fijó en 0,8 para tener una potencia del 80%.

```
Balanced one-way analysis of variance power calculation

      k = 4
      n = 17.90657
      f = 0.4016097
sig.level = 0.05
power = 0.8

NOTE: n is number in each group
```

Figura 3. Salida del programa Rstudio para la determinación del número de muestras. “k” es el número de tipos de leche, “sig.level” es el nivel de significación, “power” la potencia del test y “n” es el número de muestras por grupo que son necesarias.

En este caso se determinó que el número de muestras necesarias era de 17,91 (ver Figura 3), por lo que se recogieron un total de 18 muestras por cada grupo.

En total, el número de muestras recogidas para el análisis fue de 72. Con estas muestras, se realizó de nuevo el análisis estadístico de los datos por medio del programa RStudio mencionado anteriormente.

4. Resultados

4.1 Análisis del experimento piloto.

Con los datos obtenidos se realizó un estudio descriptivo de los mismos que aparece recogido en la Tabla 2.

Tabla 2 Resumen de los datos obtenidos (media, desviación estándar y coeficiente de variación) a partir de RCommander para las muestras del experimento piloto

Tipo	Media (g/100mL)	Desviación estándar	Coeficiente de variación
Arroz	0,687	0,186	27,01%
Cabra	3,504	0,140	3,99%
Soja	3,232	0,252	7,81%
Vaca	3,193	0,080	2,51%

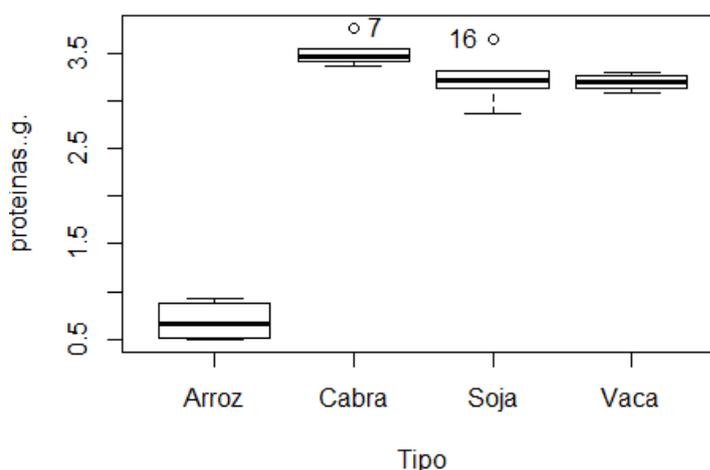


Figura 4. Diagrama de cajas para los diferentes tipos de leche. En el eje horizontal está representado el tipo de leche (arroz, cabra, soja o vaca) y en el eje vertical los niveles de proteína en g/100mL

Las medias muestrales obtenidas en este análisis (resumidas en la Tabla 2) determinaron estimaciones puntuales para los niveles de proteína en la leche de arroz de 0,687 g/100mL seguida por la de cabra, soja y vaca con niveles medios de 3,504 g/100mL, 3,232 g/100mL y 3,193 g/100mL respectivamente.

Según el coeficiente de variación, el tipo de leche Arroz, es el que presentó mayor variabilidad en los datos con un 27,01% (el cual se puede apreciar ligeramente en el diagrama de cajas de la Figura 4) seguido de un 7,81%, 3,99% y 2,51% en las variables soja, cabra y vaca respectivamente.

Con el fin de estimar el número de muestras necesarias para el proyecto, se determinó la varianza residual mediante el ajuste de un modelo lineal cuyos resultados aparecen recogidos en la Figura 5:

```
Residual standard error: 0.1762 on 20 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.9805, Adjusted R-squared: 0.9776
F-statistic: 336 on 3 and 20 DF, p-value: < 2.2e-16
```

Figura 5. Salida en Rcommander que muestra el resultado obtenido al ajustar el modelo lineal con los datos del experimento piloto.

Con una bondad de ajuste (Adjusted R-squared) de 0,978, se pudo confirmar que un 97,8% de la varianza del nivel de proteína está explicado por el modelo.

El cálculo de la varianza se pudo extraer a partir del error estándar residual (Residual standard error) que en este caso tiene un valor de 0,1762. Por tanto, la varianza es de $0,1762^2 = 0,031$.

4.2 Análisis del proyecto

Tabla 3 Resumen de los datos obtenidos (media, desviación estándar y coeficiente de variación) a partir de RCommander para las muestras totales del experimento

Tipo	Media (g/100mL)	Desviación estándar	Coeficiente de variación
Arroz	0,744	0,159	21,34%
Cabra	3,498	0,141	4,04%
Soja	3,076	0,149	4,85%
Vaca	3,198	0,089	2,78%

Las medias muestrales, obtenidas a partir del análisis general de los datos, (recogidas en la Tabla 3) según los diferentes tipos de leche estiman niveles medios de proteína para la variable arroz de 0,744g/100mL, seguida por las variables cabra (3,498g/100mL), soja (3,076g/100mL) y vaca (3,198g/100mL).

Según el coeficiente de variación (cv), la variable arroz es la que presentó mayor variabilidad (21,34%) frente a valores de 4,04%, 4,85% y 2,78% en las leches de cabra, soja y vaca, respectivamente.

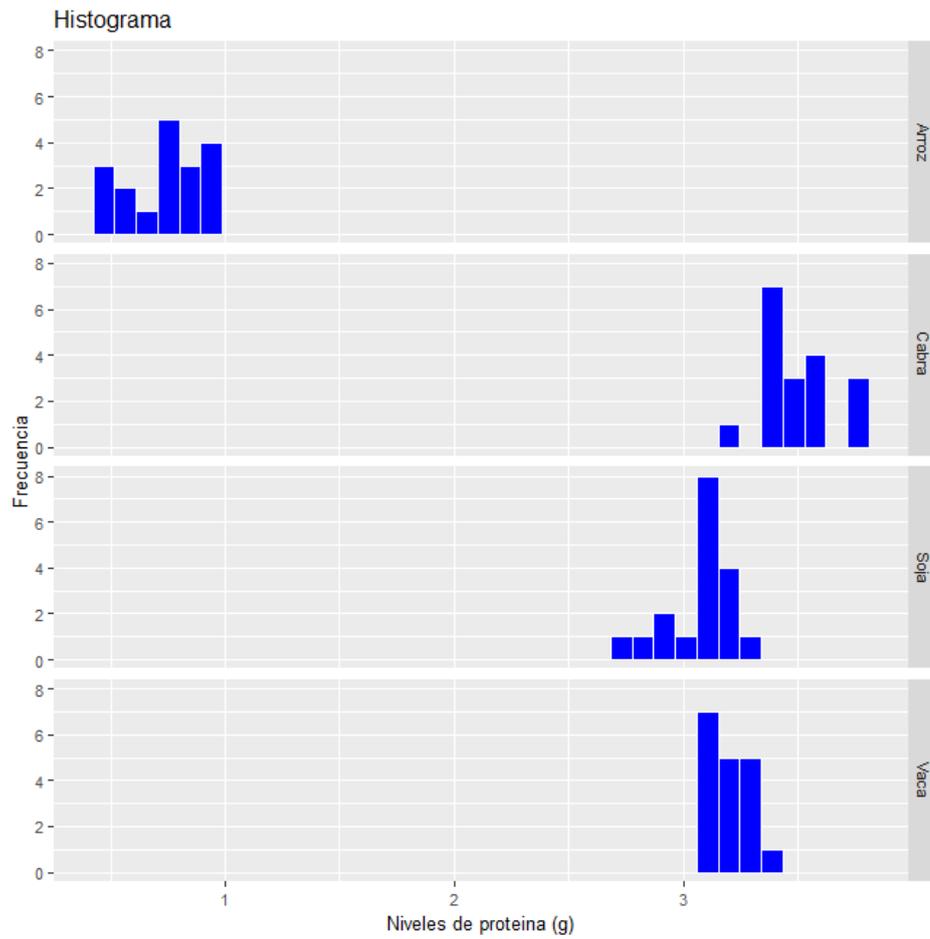


Figura 6. Histograma de los datos por tipo de leche. En el eje horizontal aparece representado el nivel de proteína en g/100mL y en el eje vertical aparece representada la frecuencia según el tipo de leche

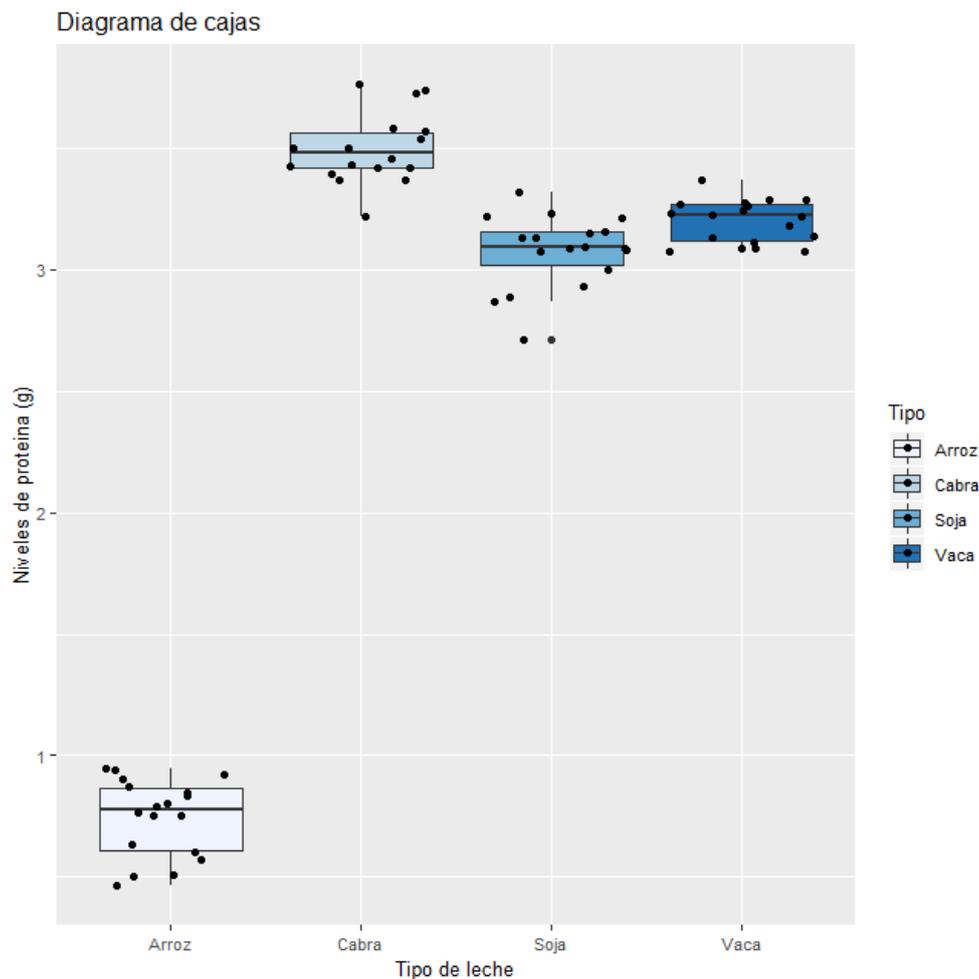


Figura 7. Diagrama de cajas que muestra los diferentes datos recogidos en forma de puntos. En el eje vertical aparece representado el tipo de leche y en el eje vertical los niveles de proteína en g/100mL

El histograma de la Figura 6 muestra cómo los valores de proteína en la variable arroz suelen ser menores que 1g. Los valores en la variable soja y vaca son bastante similares, comprendidos aproximadamente entre 2,5 y 3g, y que la variable cabra presenta los valores más elevados de todos con un contenido superior a 3g.

Por otro lado, en los diagramas de cajas de la Figura 7 se ve que, tal y como mostraban los datos de los resúmenes numéricos, la variable arroz presenta una mayor variabilidad, puesta de manifiesto en el gráfico mediante una mayor longitud de la caja respecto a la de las otras variables. También se puede apreciar que en la variable soja presenta, al igual que la variable arroz, una mayor dispersión de los datos en comparación con las otras dos variables.

Posteriormente, para obtener los intervalos de confianza, se chequeó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk, para cada tipo de leche. En todos los casos los p-valores fueron superiores a 0,05 por lo que se mantiene la hipótesis nula de normalidad para cada tipo de leche.

Tras chequear la normalidad de los datos, se calcularon los intervalos de confianza para las medias que vienen resumidos en la Tabla 4 y que aparece representados gráficamente en la Figura 8.

Tabla 4 Intervalos de confianza para los niveles medios de proteína en los cuatro tipos de leche

Tipo	Extremo superior	Media	Extremo inferior
Arroz	0,823	0,744	0,665
Cabra	3,568	3,498	3,428
Soja	3,151	3,076	3,002
Vaca	3,243	3,198	3,154

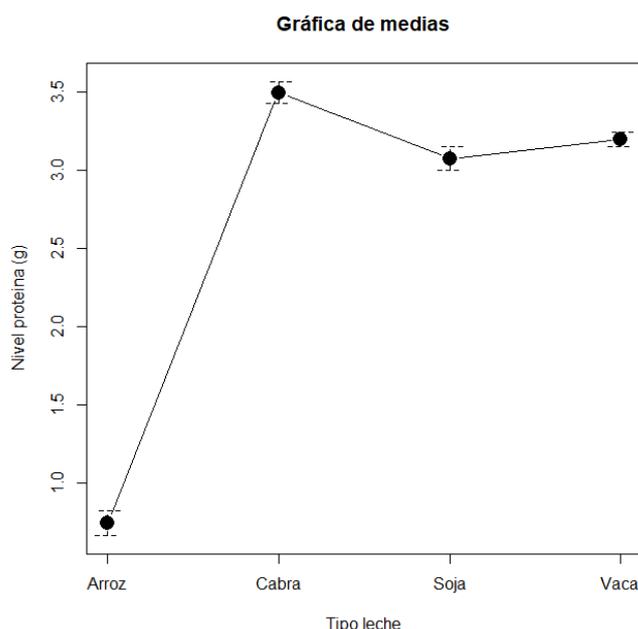


Figura 8. Gráfica de las medias con sus intervalos de confianza obtenida a partir de RStudio. En el eje vertical aparecen representados los tipos de leche y en el eje horizontal los niveles de proteína en g/100mL

Determinación de diferencias entre las medias

Una vez ajustado un modelo lineal para explicar la proteína en función del tipo de leche, se realizó el test ANOVA I bajo la hipótesis:

H_0 = No hay diferencias entre las medias de los distintos tipos

H_1 = Al menos un par de medias no son iguales

```
> summary(AnovaModel.1)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tipo    3  87.00  29.000   1539 <2e-16 ***
Residuals 68   1.28   0.019
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Figura 9. Resultados del ANOVA I realizado en el RComander

Con un p-valor de $2e-16 < 0,05$ (ver Figura 9) se rechazó la hipótesis nula de igualdad de medias y se determinó que, a cualquier nivel de significación razonable, concretamente al 5%, sí existen diferencias entre los niveles medios de proteína en los diferentes tipos de

leche analizados. Los datos aportan clara evidencia estadística de que los niveles medios de proteína en los cuatro tipos de leche considerados son significativamente distintos. Para confirmar que se cumplen los supuestos necesarios para realizar el ANOVA se realizó un análisis de los residuos:

-La normalidad de los residuos se chequeó mediante el test de Shapiro-Wilks obteniendo un p-valor de 0,467 no significativo al 5% ($>0,05$) lo que indica que tanto los niveles de proteína como los residuos se ajustan a distribuciones normales.

-Para comprobar la homocedasticidad (igualdad de varianza tanto en niveles de proteína como en residuos para los cuatro tipos de leche) se realizó el test de Breusch-Pagan, cuyo p-valor fue de 0,2582.

Puesto que el test ANOVA ha confirmado la existencia de diferencias significativas entre los tipos de leche, es conveniente investigar qué medias son distintas y en cuánto oscila el valor de esas diferencias. Para ello, se realizó un test de Tukey de comparaciones múltiples en el que se compararon los promedios de diferentes tipos de leche dos a dos.

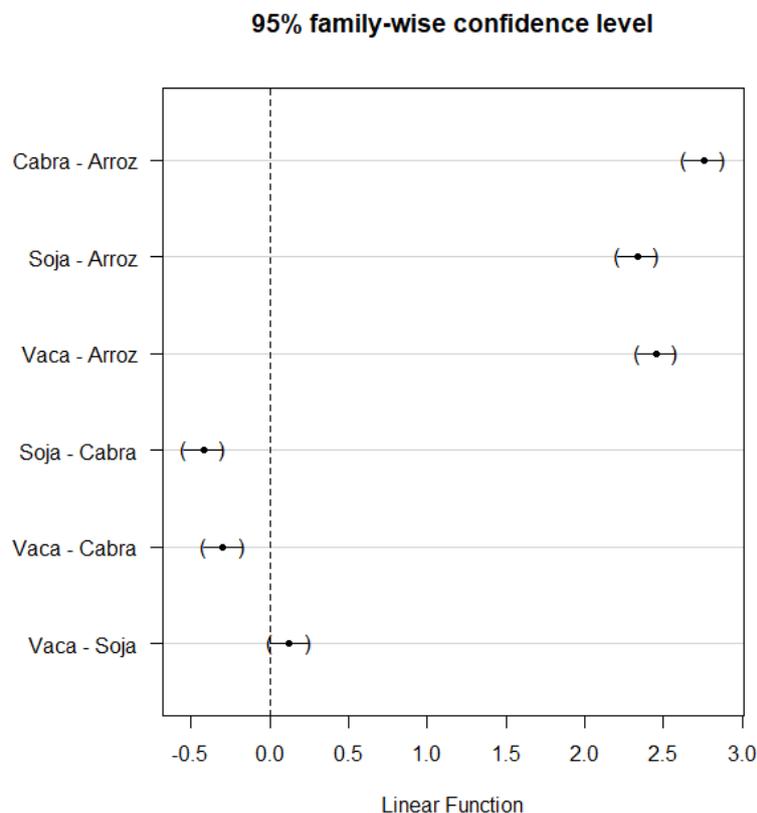


Figura 10. Gráfico del Test de comparaciones múltiples de Tukey en el que se comparan los diferentes tipos de leche dos a dos.

Según los resultados de la prueba, se concluyó que todas las comparaciones dan resultados significativos, por lo que no existen semejanzas entre las medias de los tipos de leche. Aunque la comparación entre leche tipo soja y vaca parece ser la que tiene mayor similitud de niveles de proteína como se puede apreciar en la Figura 10 al encontrarse sus intervalos tocando ligeramente el 0.

De este modo, teniendo en cuenta el nivel medio de proteína, sus intervalos de confianza y el hecho de que no se aprecian similitudes entre grupos en las comparaciones dos a dos,

podemos concluir las diferencias entre los niveles de proteína entre los tipos de leche con una confianza del 95%:

-Se estimó que el nivel medio de proteína para la leche de arroz es de 0,744g, pudiendo afirmar que dicho valor está comprendido entre 0,665 y 0,823.

-En el caso de la leche de soja, el nivel medio es de 3,076g, estando ese valor comprendido entre 3,002 y 3,151.

-La leche de vaca presenta unos niveles medios de proteína de 3,198g comprendidos entre 3,154 y 3,151.

-Y finalmente la leche de cabra, presenta unos niveles medios de 3,498g comprendidos entre 3,428 y 3,568.

Por tanto, la leche con menores niveles de proteína sería la leche de arroz, seguida de la leche de soja, vaca y cabra, respectivamente.

5. Discusión

Los niveles de proteína de los diferentes tipos de leche animal y bebidas vegetales, difieren entre unos y otros. El objetivo de este trabajo fue comprobar y comparar esas diferencias entre cuatro tipos de leches, dos de origen animal (vaca y cabra) y dos de origen vegetal (soja y arroz).

Para cuantificar estos niveles se empleó el método de Bradford y posteriormente se hizo un análisis estadístico de los datos mediante los programas RCommander y RStudio.

Es importante recordar que los valores de nivel de proteína que figuran en los envases de leche, corresponden a valores mínimos de proteína, lo cual no implica que los resultados obtenidos en el presente estudio tengan que coincidir exactamente con los valores allí representados. Este es el motivo por el cual no se pudo contrastar los resultados con la información proporcionada por los envases.

Teniendo esto en consideración y apoyándose únicamente en los resultados obtenidos y en la información declarada en las etiquetas de la marca recogidas en la Tabla 1 se puede apreciar, que los niveles medios de proteína obtenidos son bastante similares a los que aparecen allí declarados a excepción de la bebida de arroz cuyos niveles medios de proteína son más elevados de los que figuran en el etiquetado. Estas diferencias entre los valores podrían deberse a que o bien la media del contenido proteico analizado presenta esos valores o bien se pudo realizar algún error de medida en el laboratorio por preparar de forma incorrecta la BSA para preparar la recta patrón.

Con estos resultados, podríamos deducir que el tipo de leche más interesante para el consumidor en cuanto a su elevado valor de proteínas, es la leche de cabra mientras que la leche de arroz, sería la que presentaría un menor interés a causa de su pequeño valor.

Pero no solo es importante el nivel de proteínas que tiene un determinado tipo de leche. También es interesante e importante tener en cuenta el valor nutricional de esas proteínas. Este valor puede ser determinado de varias formas, pero en esencia, depende de los aminoácidos que la compongan, su uso fisiológico y su capacidad de ser absorbida por el organismo (Mäkinen, O. *et al.*,2016).

Con el aumento de tipos distintos de leche y bebidas vegetales a disposición del consumidor en los últimos años, sería interesante en un futuro realizar otros proyectos en los que se incluyeran más tipos de leche animal y bebidas vegetales y sería también interesante incluir otras marcas para realizar una comparación entre ellas ya que no hay muchos estudios en los que se haya realizado este tipo de comparación.

6. a. Conclusiones

En este trabajo se realizó un proceso de precipitación y cuantificación de proteínas en 4 tipos distintos de leche pertenecientes a una misma marca comercial. Para ello se realizó en primer lugar un experimento piloto para determinar el tamaño muestral a usar para poder realizar el proyecto y una vez fijado el número de muestras se procedió a cuantificarlas mediante el método de Bradford.

El análisis estadístico realizado con los datos obtenidos determinó la existencia de diferencias significativas entre los niveles medios de proteína de los distintos tipos de leche, Cabe destacar que el tipo de leche con mayor contenido proteico es la leche de cabra, seguido de la leche de vaca, soja y arroz.

6.b. Conclusions

In this work, a process of precipitation and quantification of proteins has been carried out in 4 different types of milk belonging to the same commercial brand. To do this, a pilot experiment was first carried out to determine the sample size to be used in order to carry out the project, and once the number of samples was fixed, they were quantified using the Bradford method.

The statistical analysis carried out with the data obtained determined the existence of significant differences between the average protein levels of each type of milk. It should be noted that the type of milk with the highest protein content is goat's milk, followed by cow's milk, soy and rice.

7. Bibliografía

- Asociación de intolerantes a la lactosa España (ADILAC) (2019). Recuperado de www.lactosa.org. [Fecha de consulta: 17 de junio de 2019]

- Chalupa-Krebsdak, S., Long, C. J., & Bohrer, B. M. (2018). Nutrient density and nutritional value of milk and plant-based milk alternatives. *International Dairy Journal*, 87, 84–92. DOI:10.1016/j.idairyj.2018.07.018
- Consorcio BEDCA y Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. (2007). Base de datos española de composición de alimentos (BEDCA). Recuperado de <http://www.bedca.net/>. [Fecha de consulta: 13 de junio de 2019].
- Haug, A., Høstmark, A. T., & Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition: a review. *Lipids in Health and Disease*, 6:25. DOI:10.1186/1476-511X-6-25
- Jenness, R. (1988). Composition of milk. En: N.P. Wong, R. Jenness, M. Keeney, E.H. Marth (Eds.) *Fundamentals of Dairy Chemistry*, (pp.1–38). DOI:10.1007/978-1-4615-7050-9_1
- Jeske, S., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2018). Past, present and future: the strength of plant-based dairy substitutes based on gluten-free raw materials. *Food Research International*, 110, 42–51. DOI:10.1016/j.foodres.2017.03.045
- Johnson, M. (2012), Protein quantitation. *Materials and Methods*, 2, 115. DOI:10.13070/mm.en.2.115
- Kongerslev Thorning, T., Raben, A., Tholstrup, T., Soedmah-Muthu, S.S., Givens, I. & Astrup, A. (2016). Milk and dairy products: good or bad for human health? an assessment of the totality of scientific evidence. *Food & Nutrition Research*. DOI:10.3402/fnr.v60.32527
- Mäkinen, O. E., Wanhalinna, V., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2016). Foods for special dietary needs: non-dairy plant-based milk substitutes and fermented dairy-type products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(3), 339–349. DOI:10.1080/10408398.2012.761950
- Mendoza Meza, D.L., Roa Mercado, C., & Ahumada Barraza, C. (2015). Efecto de las isoflavonas de la soja en la salud ósea de adultos y niños. *Salud Uninorte*, 31(1), 138–152. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81739659013>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2018) Informe del consumo de alimentación en España 2017. Madrid. Recuperado de: <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/panel-de-consumo-alimentario/ultimos-datos/> [Fecha de consulta: 13 de junio de 2019]
- Park, Y. W. (2011). Goat milk : composition and characteristics. En D. E. Ullrey, Baer, C.K. & W.G. Pond. (Eds.) *Encyclopedia of Animal Science*. Vol II (pp.537-540). New York: CRC Press.
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.

- Revista Aral (9 de mayo de 2018). La leche clásica deja paso a las sin, las enriquecidas y las bebidas vegetales. ARAL: revista del gran consumo. Recuperado de https://www.revistaaral.com/estudios-de-mercado/la-leche-clasica-deja-paso-a-las-sin-las-enriquecidas-y-las-bebidas-vegetales_379515_102.html. [Fecha de consulta: 13 de junio de 2019]
- RStudio Team (2016). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL: <http://www.rstudio.com/>.
- Sethi, S., Tyagi, S. K., & Anurag, R. K. (2016). Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 3408–3423. DOI:10.1007/s13197-016-2328-3
- Trejo Solís, J. A. (2015). Desarrollo y comparación de los principales componentes nutricionales de leches vegetales. (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, División de Ciencia Animal, México. Recuperada de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7731/T20674%20%20TREJO%20SOLIS%2c%20%20JOSE%20ALFREDO%20%2063756.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Vanga, S. K., & Raghavan, V. (2018). How well do plant based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk? *Journal of Food Science and Technology*, 55(1), 10–20. DOI:10.1007/s13197-017-2915-y
- Yangilar, F. (2013). As a potentially functional food: goats' milk and products *Journal of Food and Nutrition Research*, 1(4), 68–81. DOI:10.12691/jfnr-1-4-6