



**ACTIVIDAD INHIBITORIA *IN VITRO* DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE
ANGIOTENSINA DE UNA BEBIDA PROBIÓTICA A BASE DE SUERO**

POR:

M. C. GABRIELA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

**Disertación presentada como requisito parcial para obtener el grado de
Doctor in Philosophia**

Área Mayor: Tecnología de Productos de Origen Animal

Universidad Autónoma de Chihuahua

Facultad de Zootecnia y Ecología

Secretaría de Investigación y Posgrado

Actividad inhibitoria *in vitro* de la enzima convertidora de angiotensina de una bebida probiótica a base de suero. Disertación presentada por Gabriela Rodríguez Hernández como requisito parcial para obtener el grado de Doctor in Philosophia, ha sido aprobada y aceptada por:

M. A. Luis Raúl Escárcega Preciado
Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología

M. C. Antonio Humberto Chávez Silva
Secretario de Investigación y Posgrado

D. Ph. Pablo Fidel Mancillas Flores
Coordinador Académico

Ph. D. América Chávez Martínez
Presidente

DICIEMBRE 19-2015

Fecha

Comité:

Ph. D. América Chávez Martínez
Ph. D. Ana Luisa Rentería Monterrubio
Dr. Néstor Gutiérrez Méndez
Dr. Juan Ángel Ortega Gutiérrez
Ph. D. Iván Adrián García Galicia

© Derechos Reservados

Gabriela Rodríguez Hernández
PERIFÉRICO FRANCISCO R. ALMADA
KM. 1, CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO
C.P. 31453

DICIEMBRE 2015

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme culminar esta meta. Gracias por todo lo que recibo.

A mi familia, que esta aquí conmigo y a los que se me adelantaron también, a todos gracias por su apoyo incondicional, por confiar en mí siempre y por alentarme en todo momento. Angela, Ramis, Edy, Chelis, Abuelitos, Tita, Anis, Carmen, Servando. Gracias les amo.

A todos mis amigos, por sus aportaciones, apoyo y aliento en todo momento, en especial a mi colega Martha Campos, por colaborar con una parte fundamental del experiemetal de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por creer en mi para realizar mis estudios de posgrado y apoyarme económicamente.

Al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP), por el financiamiento de este proyecto.

A la empresa CHR HANSEN de México S.A. De C.V., por la donación de los cultivos comerciales empleados como probióticos para la formulación de las bebidas fermentadas.

A todo el personal de ésta facultad, por que de diferentes maneras compartieron conmigo mi estancia doctoral, gracias por su amabilidad.

A todos quienes fueron mis maestros de posgrado, por colaborar conmigo en mi formación profesional y por que todos y cada uno dejaron una enseñanza diferente en mí. Gracias.

A mis asesores de comité, la Ph. D. América, el Ph. D. Ivan, la Ph. D. Ana, el Dr. Juan Angel y el Dr. Néstor, porque siempre que recurrí a cada uno

de ustedes recibí su ayuda, colaboración e interés en el mejoramiento de este proyecto. Gracias a todos por sus muestras de confianza en mí. En especial:

A mi asesora, la Ph. D. América, por confiar en mi capacidad para la realización de este proyecto, por su apoyo y por atender mis sugerencias y aportaciones objetivamente, por darse tiempo siempre para atenderme. Gracias por todo.

Al Dr. Juan Ángel, ya que acudí por su ayuda constantemente desde que ingresé a esta escuela, y siempre se dió tiempo para atender mis dudas con paciencia y amabilidad. Gracias por todo.

Al Dr. Néstor, por su ayuda y apoyo en todo momento cuando se lo solicité, por su disposición, profesionalismo y aportaciones para mi formación profesional de posgrado. Gracias por todo.

DEDICATORIA

A mi Ángela, por ser mi mayor motivación, por acompañarme siempre,
por darme tanto amor,
te amo hija.

CURRICULUM VITAE

La autora nació el 8 de Diciembre de 1982, en Cd. Delicias, Chihuahua México.

2002 – 2007 Estudios de Licenciatura en la Universidad Autónoma de Chihuahua de la Facultad de Ciencias Químicas, obteniendo el título de Química Bacterióloga Parasitóloga.

2008 Química analista e Inspectora de Calidad en la planta de Lácteos Cerro Grande. Ciudad Delicias Chihuahua.

2008 – 2010 Estudios de posgrado en la Universidad Autónoma de Chihuahua de la Facultad de Ciencias Químicas, obteniendo el grado de Maestría en Ciencias en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

2013 - Revisor de la Revista Oficial Mexicana de Nutrición y a la fecha Tecnología de Alimentos: “Ciencia y Tecnología de alimentos - Journal of Foods”. Pertenece al grupo Taylor & Francis.

2014-2015 Maestra de Microbiología Veterinaria, de la Universidad Veterinaria Educación Profesional.

2014 Reconocimiento por la Universidad Autónoma de Chihuahua, de la Facultad de Zootecnia y Ecología por obtener el primer lugar en aprovechamiento académico de la XLIV Generación de Doctor in Philosophia.

2014 – Asesor comercial, encargada de zona “Chihuahua” de la a la fecha empresa Tecnología Integral para Laboratorios S.A de C.V.

RESUMEN GENERAL

ACTIVIDAD INHIBITORIA *IN VITRO* DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA DE UNA BEBIDA PROBIÓTICA A BASE DE SUERO

POR:

M. C. GABRIELA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

Doctor in Philosophia en Producción Animal

Secretaria de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: Ph. D. América Chávez Martínez

La disertación está conformada por tres estudios. El primero: “Calidad microbiológica de suero de queso Chihuahua”, este estudio evalúa tres variables microbianas del suero para valorar su potencial uso en la elaboración de bebidas fermentadas. Se analizaron 30 muestras de sueros provenientes de diferentes queserías de siete ciudades del Estado de Chihuahua. Los resultados se compararon con los límites máximos establecidos en suero por el proyecto de norma PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012. Encontrándose que de las 30 muestras, se superaron los límites en: 27 para mesofílicos aerobios, 21 para coliformes totales y 12 para mohos y levaduras. Dadas las altas cargas microbianas en los sueros; se recomienda almacenar los sueros de manera sanitaria y pasteurizarlos antes de usarlos como alimento. En el segundo estudio, “Formulación y evaluación de una bebida fermentada elaborada a base de suero adicionado con probióticos y prebióticos”, se elaboraron diferentes mezclas de suero-leche, probióticos y prebióticos, para generar una bebida que

cumpliera con: 1) calidad sensorial, 2) viabilidad de probióticos (1×10^6 UFC/mL) y 3) estabilidad (sin sinéresis) durante su vida en anaquel (21 d). Para esto, se formularon 13 tratamientos, con diferentes probióticos y con y sin prebiótico (Mezcla de fosfooligosacáridos); seleccionándose cuatro de ellos con base en los resultados de los tres parámetros evaluados. Los seleccionados fueron probados en el tercer estudio: “Actividad inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA), proteólisis y perfil peptídico de una bebida probiótica a base de suero”, observándose actividad ECA inhibitoria en todos los tratamientos, así como diferentes correlaciones de ésta (R de 0.986 hasta 0), con el resto de las variables entre tratamientos y durante la vida en anaquel. Como resultado general, se formuló una bebida funcional a base de suero, fermentada con probióticos y con actividad ECA inhibitoria *in vitro*.

ABSTRACT

ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME *IN VITRO* INHIBITORY ACTIVITY IN A WHEY PROBIOTIC BEVERAGE

BY:

GABRIELA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

The dissertation is formed by three studies. The first one: "Microbiological quality of Chihuahua cheese's whey", evaluated microbiologically 30 samples of whey, in order to estimate its potential as ingredient in fermented beverages. The samples were from different dairies of seven cities in the state of Chihuahua. The results were compared against the limits set by the Mexican standards PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012. The limits were surpassed in 27 out of the 30 samples for aerobic mesophiles, in 21 for total coliforms and in 12 for moulds and yeasts. Due to the high microbial counts, it is recommended to store whey in a more hygienic way and pasteurized it before using it to prepare any food. The second study was "Development and evaluation of a fermented beverage made from whey added with probiotics and prebiotics". A beverage was formulated with different proportions of whey and milk, probiotics and prebiotics. The beverage had to fulfill the next requirements: 1) high sensory quality, 2) a minimal viability of probiotics of 1×10^6 CFU/mL and 3) stability (no syneresis) throughout its shelf life (21 d). Hence, 13 treatments with different probiotics and with or without prebiotics (phospho-oligosaccharides mix) were tested. The beverages best graded were studied further in the next project, "Inhibitory activity of the angiotensin-converting enzyme (ACE), proteolysis and peptide profile of a whey-based probiotic beverage". It was observed an ACE inhibitory activity in all treatments and different correlations of this (R to 0986-0), against the other variables throughout the shelf life. The overall result functional whey-based beverage with probiotic and *in vitro* ACE inhibitory activity

was formulated.



CONTENIDO

	Página
RESUMEN GENERAL.....	vii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE CUADROS.....	xv
LISTA DE GRÁFICAS.....	xvi
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
LISTA DEL APÉNDICE.....	xix
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Suero de Queso.....	4
Probióticos y Prebióticos.....	7
Bebidas Fermentadas.....	10
Biopéptidos.....	11
Mecanismo de Generación de los Biopeptidos.....	12
Hidrólisis por enzimas digestivas.....	13
Proteolisis microbiana.....	13
Biopéptidos con Actividad Antihipertensiva.....	15
LITERATURA CITADA.....	19
ESTUDIO I. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL SUERO DE LECHE EN LA INDUSTRIA DEL QUESO CHIHUAHUA.....	28
RESUMEN.....	29
ABSTRACT.....	30



INTRODUCCIÓN.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
Localización del Área de Estudio.....	36
Recolección de las Muestras.....	36
Análisis Microbiológico.....	36
Análisis Estadístico.....	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
Mesofilicos Aerobios, Coliformes Totales, Mohos y Levaduras....	39
Análisis Cluster.....	42
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	48
LITERATURA CITADA.....	49
ESTUDIO II. FORMULACIÓN Y EVALUACIÓN DE UNA BEBIDA FERMENTADA CON PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS ELABORADA CON SUERO DE LECHE	52
RESUMEN.....	53
ABSTRACT.....	54
INTRODUCCIÓN	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
Localización del Área de Estudio.....	59
Obtención del Suero de Queso Chihuahua.....	59
Evaluación Sensorial de las Mezclas Suero-Leche.....	62
Efecto de los Prebióticos Sobre la Viabilidad de los Probióticos en la Bebida.....	62



Cinéticas de Crecimiento de los Probióticos Adicionados con Prebióticos.....	63
Formulación de la Bebida Fermantada.....	64
Evaluación de la Viabilidad de los Probióticos en los Tratamientos.....	67
Análisis Fisicoquímico de las Bebidas.....	70
Evaluación Sensorial de los Tratamientos.....	70
Análisis Estadístico.....	71
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	75
Evaluación Sensorial de las Mezclas Suero-Leche.....	75
Efecto del Prebiótico Sobre el Probiótico en la Bebida.....	75
Cinéticas de Crecimiento de los Probióticos Adicionados con Prebióticos.....	79
Evaluación de la Viabilidad de los Probióticos en los Tratamientos.....	84
Análisis Fisicoquímico de las Bebidas.....	88
Evaluación Sensorial de los Tratamientos.....	88
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	96
LITERATURA CITADA.....	97
ESTUDIO III. ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA, PROTEÓLISIS Y PÉRFIL PEPTÍDICO DE UNA BEBIDA PROBIÓTICA A BASE DE SUERO.....	101
RESUMEN.....	102



ABSTRACT.....	103
INTRODUCCIÓN.....	104
MATERIALES Y MÉTODOS.....	109
Localización del Área de Estudio.....	109
Preparación de las Muestras.....	109
Determinación de la Concentración Peptídica Total.....	111
Actividad Proteolítica.....	112
Actividad ECA Inhibitoria.....	112
Perfil peptídico y Aminoácidos Aromáticos.....	114
Análisis Estadístico.....	114
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	117
Componentes Principales.....	117
Correlaciones.....	120
Resultados del procedimiento mixed.....	124
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	133
LITERATURA CITADA.....	134
APÉNDICES.....	139



LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Formulación de las bebidas fermentadas con probióticos elaboradas a base de suero.....	65
2	Porcentaje de adición de los prebióticos en las soluciones primarias para evaluar las cinéticas de crecimiento de diferentes probióticos.....	68
3	Descripción de los tratamientos elaborados y agares usados para la evaluación de la viabilidad de los probióticos.....	69
4	Efecto de dos prebióticos, sobre la viabilidad de los probióticos.....	77
5	Parámetros estimados en las curvas de crecimiento de tres probióticos con distintos prebióticos.....	80
6	Análisis fisicoquímico de las bebidas lácteas fermentadas elaboradas con diferentes probióticos.....	90
7	Probióticos empleados en las bebidas fermentadas elaboradas a base de suero.....	110
8	Coeficientes de correlación (R) de las variables: proteína total, grado de proteólisis, actividad ECA inhibitoria, perfil peptídico y aminoácidos aromáticos.....	121



LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica		Página
1	Conteo de mesofílicos aerobios en suero de queso Chihuahua.....	40
2	Conteo de coliformes totales en suero de queso Chihuahua..	43
3	Conteo de mohos y levaduras en suero de queso Chihuahua	44
4	Diagrama de árbol del análisis cluster (Dendograma), muestra el grado de similitud del 0 al 100 %, entre 30 muestras de suero de queso Chihuahua, en 7 diferentes ciudades del Estado de Chihuahua.....	47
5	Aceptación sensorial de diferentes mezclas fermentadas de suero- leche.....	76
6	Viabilidad de diversos probióticos en bebidas fermentadas durante vida en anaquel.....	85
7	Efecto de la adición de dos prebióticos en la viabilidad de los probióticos en bebidas fermentadas.....	87
8	Valores de pH de bebidas fermentadas con diferentes probióticos medidos durante la vida en anaquel.....	89
9	Aceptación sensorial de la acidez de bebidas fermentadas con diferentes probióticos.....	91
10	Aceptación sensorial del sabor de bebidas fermentadas con diferentes probióticos	92



11	Aceptación sensorial de la textura de bebidas fermentadas con diferentes probióticos	94
12	Aceptación sensorial de la aceptabilidad general de bebidas fermentadas con diferentes probióticos.....	95
13	Componentes principales 1 y 2 de las variables: proteína total, grado de proteólisis, actividad ECA inhibitoria, perfil peptídico y aminoácidos aromáticos.....	118
14	Componentes principales 1 y 3 de las variables: proteína total, grado de proteólisis, actividad ECA inhibitoria, perfil peptídico y aminoácidos aromáticos.....	119
15	Concentración de péptidos en bebidas a base de suero con diferentes probióticos.....	122
16	Proteólisis de bebidas a base de suero con diferentes probióticos.....	125
17	Porcentaje de la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en las bebidas a base de suero con diferentes probióticos.....	127
18	Perfil peptídico de bebidas a base de suero con diferentes probióticos.....	130
19	Cuantificación de aminoácidos aromáticos en bebidas a base de suero con diferentes probióticos.....	131



LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Hidrólisis de las proteínas por el sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas durante la digestión, y liberación de péptidos bioactivos.....	14
2	Estrategia experimental para la formulación y evaluación de la bebida fermentada.....	60
3	Diagrama de elaboración de suero de queso Chihuahua.....	61
4	Proceso de elaboración de las bebidas fermentadas a base de suero.....	66



1	Prueba afectiva de bebidas fermentadas elaboradas con diferentes mezclas suero-leche.....	139
2	Formato de la prueba de preferencia de las bebidas lácteas fermentadas.....	140
3	Cinéticas de crecimiento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> adiconado con Avicel® y mezcla de fosfooligosacáridos.....	142
4	Cinéticas de crecimiento de <i>Bifidobacterium lactis</i> adiconado con Avicel® y mezcla de fosfooligosacáridos.....	143
5	Cinéticas de crecimiento de <i>Lactobacillus paracasei</i> adiconado con Avicel® y mezcla de fosfooligosacáridos.....	144
6	Prueba de ordenamiento de las bebidas fermentadas analizadas por el estadístico de prueba Chi cuadrada de Person.....	145
7	Curva de calibración con albúmina de suero bovino.....	146
8	Cromatograma característico para la determinación de la actividad ECA inhibitoria, de la muestra control (agua grado HPLC), en el análisis de los filtrados péptidicos de las bebidas lácteas fermentadas.....	147

9	Cromatograma característico para la determinación de la actividad ECA inhibitoria de los filtrados péptidicos de las bebidas lácteas fermentadas.....	148
10	Cromatograma característico de la muestra blanco en el análisis de los perfiles peptídicos totales y de aminoácidos aromáticos, de los filtrados de las bebidas lácteas fermentadas.....	149
11	Cromatograma característico generado en una de las muestras de los filtrados de las bebidas lácteas fermentadas, del perfil peptídico total (220 nm) y aminoácidos con anillos aromáticos (280 nm).....	150
12	Concentración peptídica necesaria para inhibir el 50 % (IC ₅₀) de la actividad de la enzima ECA en bebidas a base de suero fermentadas con probióticos.....	151



INTRODUCCIÓN GENERAL

La leche y los productos lácteos son fuente de proteínas de alto valor biológico. La leche de vaca consta de aproximadamente 3.5 % de proteínas, de las cuales 80 % son caseínas (α , β , γ y κ) y 20 % proteínas del suero (β -lactoglobulina, α -lactalbumina, seroalbúmina y proteínas minoritarias) (Jauhiainen y Korpela, 2007; Fox y McSweeney, 2008). De entre las proteínas contenidas en los alimentos, las proteínas del suero son las de mayor calidad nutricional debido al tipo de aminoácidos que contiene, de los cuales la gran mayoría son esenciales, ramificados y de fácil digestión (Devries y Phillips, 2015). El suero, se clasifica según su pH, y el tipo de queso del cual se separe, puede ser ácido o dulce. El primero se obtiene de la producción de yogurt y quesos como el cottage y tiene un pH menor de 5.1. El suero dulce es extraído de quesos tipo Cheddar (como el queso Chihuahua) y tienen un pH mayor a 5.6, además son de ser ricos en proteínas contienen vitaminas, minerales y ácidos grasos (Tunick, 2008); generalmente contienen 7 % de sólidos totales, de los cuales el 74 % es lactosa, del 10-12 % son proteínas, el 8 % son minerales, el 3 % es grasa y del 1-3 % es ácido láctico (Miranda *et al.*, 2007). Por la importancia nutrimental de sus componentes, el suero de leche ha sido empleado para elaborar bebidas funcionales (Duggan *et al.*, 2002). Una bebida láctea fermentada puede definirse como un tipo de leche fermentada resultante de la mezcla de suero y leche, adicionada con cultivos lácticos (Castro *et al.*, 2009). La suplementación de bebidas lácteas fermentadas con probióticos y prebióticos representa una opción para dar valor agregado a este tipo de



bebidas (Castro *et al.*, 2013). Los probióticos son microorganismos vivos que aportan un beneficio a la salud del consumidor (Allgeyer *et al.*, 2010; Nakamura y Omaye, 2012). Los cuales aunado a su función nutricional, también favorecen la proteólisis, por lo cual, al liberarse mayor número de péptidos, algunos son capaces de ejercer en el consumidor efectos biológicos benéficos específicos, por lo cual, se les denomina péptidos bioactivos o biopéptidos (Costa *et al.*, 2007; Dziuba *et al.*, 2009). Los prebióticos son alimentos no digeribles por el consumidor pero si por los probióticos que se localizan en el intestino grueso, beneficiándose así el crecimiento y/o actividad de uno o un limitado número de especies probióticas (Drgalic *et al.*, 2005; Cruz, 2010). Los prebióticos son generalmente oligosacáridos con diferente grado de polimerización (Angus *et al.*, 2005).

Los péptidos bioactivos o biopéptidos son generados por la hidrólisis de las proteínas, estos aunado a su función nutricional ejercen efectos biológicos benéficos específicos (Costa *et al.*, 2007; Dziuba *et al.*, 2009) que favorecen la salud del consumidor actuando en los sistemas: cardiovascular, gastrointestinal, nervioso y/o inmune (Jauhianen y Korpela, 2007; Hajirostamloo, 2010; Ruíz-Giménez *et al.*, 2012). Las proteínas de la leche son consideradas una de las principales fuentes de péptidos bioactivos (Sanlidere y Oner, 2011; Plaisancié *et al.*, 2013).

En el año 2013, se estimó que la producción mundial anual de leche, ascendió los 466 millones de toneladas métricas (Lagrange *et al.*, 2015). En nuestro país, la producción nacional de leche de bovino ha ido en incremento constante desde 1990 y en el año 2014, mostró un crecimiento anual del 1.5 %



superando los 11 129 millones de lt. De los cuales, se produjeron 39, 712 ton de queso Chihuahua generándose alrededor de 357, 408 lt de suero del mismo (SAGARPA, 2015).

Con base en lo anterior, el objetivo de este proyecto fue desarrollar una bebida funcional a base de una mezcla de suero-leche fermentada con probióticos con potencial para presentar actividad ECA inhibitoria.



REVISIÓN DE LITERATURA

Las proteínas de la leche de vaca representan cerca del 3.5 % de sus componentes totales y se dividen en dos grupos: las caseínas y las proteínas del suero. Éstas últimas, se subdividen en proteínas mayoritarias que representan aproximadamente el 20 % de las proteínas totales de la leche y las proteínas minoritarias que representan el 1 % (Madureira *et al.*, 2010). Se distribuyen de la siguiente manera: 56 % β -lactoglobulina, 21 % α -lactalbúmina, 7 % seroalbúmina, 14 % Inmunoglobulinas y 2 % lactoferrina; de las cuales, las β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina y seroalbúmina, se denominan fracción de albúmina, y la lactoferrina e inmunoglobulinas fracción de globulinas (Fox y McSwenney, 2008). Las proteínas séricas, permanecen disueltas en el suero tras la precipitación ácida de las caseínas a un pH de 4.6 a 20 °C (Laetitia y Tomasula, 2008). Las proteínas del suero son relevantes por su importancia nutricional y tecnológica (Drgalic *et al.*, 2005; Legarová y Kourimská, 2010); además, tienen un alto valor biológico aún superior a las proteínas del huevo, soya y las mismas caseínas presentes en la leche, esto debido a su alto contenido de aminoácidos esenciales ramificados como valina, isoleucina y leucina, que proporcionan mayor energía metabólica que el resto (Pescuma *et al.*, 2010).

Suero de Queso

El suero de queso es un líquido resultante de la precipitación y separación de las caseínas de la leche durante la elaboración del queso (Prazares *et al.*, 2012). Se clasifica de acuerdo al pH, y según el tipo de queso



del cual se separe, puede ser ácido o dulce. El primero se obtiene de la producción de yogurt y quesos como el cottage y tiene un pH menor de 5.1. El suero dulce es extraído de los procesos de queso tipo Cheddar (como el queso Chihuahua) y tienen un pH mayor a 5.6 (Tunick, 2008). Este último retiene cerca del 55 % de los nutrientes de la leche y está compuesto por: 93 % agua, 5 % lactosa, 0.85 % proteínas, 0.53 % minerales y 0.36 % grasa. Por cada 10 lt de leche, se puede elaborar 1 kg de queso tipo Cheddar, como el Chihuahua obteniéndose como subproducto 9 lt de suero (Pescuma *et al.*, 2010). En algunos de los casos éste subproducto es desechado al drenaje (Miranda *et al.*, 2007). En relación a esto, la norma mexicana NOM-001-ECOL-1996 permite verter en ríos sustancias con una demanda bioquímica de oxígeno (DBO) máxima de 150 mg/lt, ya que no existe regulación para drenaje. Por consiguiente, el suero de leche es considerado un contaminante, ya que presenta una DBO de 35 - 50 kg/lt (Tunick, 2008). La producción diaria de suero varía entre países, sin embargo, independientemente de la cantidad producida, el manejo de este subproducto representa un problema ambiental. Se estima que alrededor del mundo se generan cerca de 40.7×10^6 ton de suero de queso por año (Prazares *et al.*, 2012). Tunick (2008), cita el trabajo realizado por Marwaha y Kennedy (1998), quienes investigaron en Estados Unidos de América, que la producción diaria promedio de suero en una lechería, se estimaba en 4000 lt; dicha contaminación producida por este volumen de suero equivale a la generada por 1900 personas. En algunos países, el suero de leche es producido en grandes cantidades vertiéndose a los ríos como parte de



los efluentes de las fabricas, representando así un grave problema ambiental, por lo tanto se ha sugerido darle un uso alternativo (Miranda *et al.*, 2007).

En algunos casos el suero dulce es empleado para la alimentación de cerdos, o bien en la elaboración de otros productos como requesón o suero en polvo (Tunick, 2008). La elaboración de suero en polvo, requiere la concentración, separación y/o fraccionamiento del mismo (Drgalic *et al.*, 2005); no obstante, la maquinaria para elaborarlo es muy costosa (Mahajan *et al.*, 2004). Debido a esto, recientes investigaciones se han enfocado en el estudio de la aplicación de este subproducto como ingrediente en la formulación de productos funcionales (Pescuma *et al.*, 2010).

En la actualidad no existen normas mexicanas que regulen tanto el manejo como la composición del suero de leche que se procesa, ya que en la mayoría de los casos la industria quesera lo considera un subproducto con poco o nulo valor económico. A la fecha sólo existe el proyecto de norma PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012 (Sistema producto leche - alimentos – lácteos – suero de leche líquido o en polvo – especificaciones y métodos de prueba), mismo que se basa en las normas mexicanas oficiales para el análisis de otros alimentos. Este proyecto de norma especifica que el suero dulce líquido, debe contener como máximo 10, 000 UFC/mL de bacterias mesofílicas aerobias y 100 UFC/mL de coliformes.

La ecología microbiana del suero es compleja, aún así, la mayoría de los estudios microbiológicos en suero están enfocados en la identificación de bacterias ácido lácticas (BAL) presentes (Zago *et al.*, 2007), sin dar importancia a los microorganismos contaminantes. Las BAL son un grupo de bacterias



Gram positivas (G+), no esporuladas, catalasa negativa (-), anaerobias facultativas, con un metabolismo fermentativo, algunos generos son: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* entre otros (Savijoki *et al.*, 2006). El género *Bifidobacterium* es históricamente considerado una BAL, y en el manual Bergey's de 1957 fueron designadas como *Lactobacillus bifidum*, no obstante, tiene una ruta de fermentación de los carbohidratos única y filogenéticamente están más relacionadas con el grupo *Actinomycetaceae* G+. Por estas razones se les separa de las BAL (Axelsson, 2004).

Algunas BAL aisladas en suero, son los siguientes: en suero de queso argentino de pasta cocida se aisló *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (Reinheimer *et al.*, 1994); en sueros de queso Mozzarella, se identificaron *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus spp.* y *S. thermophilus* (Coppola *et al.*, 2001) y en suero de queso Parmigiano Reggiano se aisló *Lactobacillus helveticus* (Gatti *et al.* 2003); en suero de Grana Padano, se aislaron *S. thermophilus*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y subsp. *Lactis* y *L. fermentarum* (Lazzi *et al.*, 2004); y en el mismo tipo de queso otros autores reportaron haber aislado *L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y subsp. *lactis* (Andrighetto *et al.*, 2004); en suero de queso Parmigiano Reggiano, se aislaron *S. thermophilus*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y subsp. *lactis*, y *L. fermentarum* (Bottari *et al.*, 2010) y en el mismo año en México, en suero de queso Cheddar se aislaron dos cepas de *L. lactis* (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2010).

Probióticos y Prebióticos



Los probióticos son microorganismos vivos que aportan un beneficio a la salud del consumidor (Allgeyer *et al.*, 2010; Nakamura y Omaye, 2012) proporcionándole un balance a la microflora del intestino (Kailasapathy y Chin, 2000). Además de diversos beneficios generales y específicos del cuerpo humano en: el tracto gastrointestinal, ayudan a asimilar la lactosa, prevenir infecciones, diarreas, cáncer de colon y a estabilizar la barrera mucosal del intestino; en el sistema cardiovascular, ayudan a disminuir la presión arterial y presentan un efecto hipocolesterolémico; y en el sistema inmune fortalecen las defensas contra infecciones intestinales (Vinderola y Reinheimer, 1999; Kailasapathy y Chin, 2000). Las BAL son los microorganismos más usados como probióticos (Hözer y Kirmaci, 2009).

Los beneficios que los probióticos confieren a la salud del consumidor son conocidos desde los tiempos de Hipócrates, en los que ya se reportaba que algunas leches fermentadas podían curar algunos desórdenes del sistema digestivo. No obstante, fue hasta 1907, que el científico ruso Elie Metchnikoff propuso el concepto de probiótico conocido actualmente (Ranadheera *et al.*, 2010). Para que los microorganismos probióticos lleven a cabo su efecto benéfico en el organismo deben mantenerse viables hasta el colón y presentar cuentas que asciendan a 1×10^6 UFC/mL (Tamime *et al.*, 2005; Hözer y Kirmaci, 2009), para considerar que ejerzan un efecto terapéutico el consumo mínimo de probióticos por día debe oscilar entre 10^8 - 10^9 UFC/mL (Tharmaraj y Shah, 2003).

Los requerimientos para considerar un microorganismo probiótico son los siguientes: a) que presente un efecto fisiológico en el cuerpo; b) que no sea



tóxico ni patógeno; c) que tenga alto número de células viables; d) que pueda sobrevivir en el tracto gastrointestinal; e) que se pueda adherir a la mucosa intestinal; f) que produzca antimicrobianos; g) que la especie en uso halla sido aislada previamente; y, h) que en el producto donde se añade, sea sensorialmente agradable, se mantenga estable y que se etiquete aclarando su contenido (Kailasapathy y Chin, 2000).

Por otra parte, los prebióticos son alimentos no digeribles por el consumidor pero si por los probióticos que se localizan en el intestino grueso, beneficiándose así el crecimiento y/o actividad de uno o un limitado número de especies probióticas (Drgalic *et al.*, 2005; Cruz, 2010). Los prebióticos son oligosacáridos con diferente grado de polimerización (Angus *et al.*, 2005), algunos ejemplos son: los galactooligosacáridos o los fructooligosacáridos como la inulina (Ranadheera *et al.*, 2010). No obstante, los prebióticos también influyen positivamente de otras maneras en el organismo, como por ejemplo: ayudando en la absorción de minerales como calcio o hierro en el intestino delgado, ya que ejercen acción enlazante o secuestradora; se sabe también que las inulinas tipo fructanos ejercen efectos en el metabolismo de lípidos disminuyendo los triglicéridos séricos tanto en animales como humanos, reduciendo así el riesgo de padecer enfermedades tales como: diarrea, osteoporosis y cáncer de colon (Roberfroid, 2000).

Los prebióticos deben cumplir con los siguientes requisitos: a) resistir la hidrólisis y absorción en el tracto gastrointestinal superior; b) ser un sustrato selectivo para uno ó un limitado número de especies bacterianas; c) alterar benéficamente la microbiota en el colon; y, d) inducir efectos inmunes o



sistemáticos benéficos en el consumidor para su salud (Kailasapathy y Chin, 2000).

Los alimentos funcionales son los alimentos o nutrientes que ejercen un cambio fisiológico benéfico en el cuerpo, tal es el caso de los alimentos adicionados con probióticos y prebióticos (Duggan *et al.*, 2002). Así bien, cuando los probióticos y prebióticos son combinados ejercen una acción sinérgica, proporcionando beneficios adicionales al consumidor (Allgeyer *et al.*, 2010). Se estima que durante la década pasada más de 500 nuevos productos funcionales fueron introducidos al mercado (Silveira *et al.*, 2015).

Bebidas Fermentadas

Una bebida láctea fermentada puede definirse como una mezcla de leche con cultivos microbianos y otros productos lácteos (Castro *et al.*, 2009). Desde 1913, Jolles, desarrolló una bebida a base de suero esterilizada y adicionada con ácidos, sales y medicamentos (Holsinger *et al.*, 1974). Desde entonces las bebidas lácteas formuladas con suero de leche han ido ganando terreno en el mercado global, debido a que son producidas usando tecnología simple, además han sido bien aceptadas por consumidores de diferentes edades (Silveira *et al.*, 2015). El suplementar el suero con probióticos y prebióticos representa una nueva opción para dar valor agregado a este subproducto de la industria quesera y a las bebidas lácteas *per se* (Castro *et al.*, 2013). Existe gran diversidad de bebidas fermentadas a base de suero; usando granos de kéfir como cultivos iniciadores (Teixeira *et al.*, 2011), a base de suero liofilizado rehidratado en agua (Beucler *et al.*, 2005; Pescuma *et al.*, 2010), solamente el



suero fermentado con probióticos (Maity *et al.*, 2008), o bien empleando mezclas de suero y leche como en este proyecto.

González y González (2002), elaboraron varias bebidas fermentadas a base de suero-leche (75-25 %, 50-50 %, 0-100 % v/v) usando carboximetilcelulosa como estabilizante, logrando una vida en anaquel de 7 d, en este caso los consumidores prefirieron la bebida sin suero, después la que contenía mitad de suero y mitad de leche y por último la de mayor contenido de suero. Gutiérrez (2006) evaluó sensorialmente bebidas fermentadas a base suero-leche (20-80 % v/v) adicionadas con probióticos, observando mayor agrado por las bebidas sin estabilizantes y con saborizantes logrando una vida en anaquel de 27 d. Así mismo, Miranda *et al.* (2007) elaboraron bebidas fermentadas a base de suero y evaluándose como “me gusta mucho”, a la bebida con estabilizante y fermentada con *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*, reportaron una vida en anaquel de 7 d. Por otra parte, Legarová y Kourimská, (2010) elaboraron bebidas de cero, tres y cuatro h de fermentación a base de suero-leche (100-0 %, 75-25 % y 50-50 % v/v), obteniendo los valores más bajos de aceptación en las bebidas de 100 % suero y los valores más altos en las bebidas no fermentadas con igual proporción leche-suero.

Biopéptidos

Los péptidos bioactivos o biopéptidos son generados por la hidrólisis de las proteínas, estos aunado a su función nutricional ejercen efectos biológicos benéficos específicos (Costa *et al.*, 2007; Dziuba *et al.*, 2009) que impactan positivamente la salud del consumidor actuando en el sistema inmune,



gastrointestinal, nervioso, cardiovascular y/o en el estado nutricional del mismo (Dziuba y Darewicz, 2007; Jauhianen y Korpela, 2007; Hajirostamloo, 2010; Ruíz-Giménez *et al.*, 2012). Los biopéptidos son fragmentos de proteínas que no presentan actividad biológica cuando se encuentran formando parte de una proteína, sin embargo, cuando esta se hidroliza, los péptidos se separan y comienzan a ejercer su función bioactiva (Foltz *et al.*, 2007; Weimann *et al.*, 2009; Kim y Wijesekara, 2010). La bioactividad de los péptidos depende de la secuencia y número de aminoácidos, pudiendo contener entre 2 y 20 residuos (Korhonen y Pihlanto, 2006). A la fecha, se han aislado una gran variedad de biopéptidos provenientes de suero (Ijas *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010) en diferentes productos, principalmente de leches fermentadas con BAL (Minervini *et al.*, 2009; Nielsen *et al.*, 2009).

Mecanismos de Generación de los Biopéptidos

Los biopéptidos se generan por hidrólisis enzimática, la cual puede llevarse a cabo de tres maneras: a) con enzimas digestivas, b) por microorganismos proteolíticos y c) con enzimas proteolíticas derivadas de microorganismos o plantas (Madureira *et al.*, 2010; Pritchard *et al.*, 2010). Por su importancia tecnológica con frecuencia sobresalen dos métodos de hidrólisis; el uso de enzimas digestivas y la fermentación microbiana, en el entendido de que las enzimas proteolíticas aisladas para hidrolizar las proteínas son producidas por microorganismos principalmente como bacterias u hongos o bien provenientes de plantas (Kumar y Bhalla, 2005; Korhonen, 2009; Ruíz-Giménez *et al.*, 2012). Adicionalmente a estas rutas, también se liberan biopéptidos por la acción de enzimas endógenas que se encuentran presentes



en la leche, tales como la plasmina y la catepsina (Bouhallab y Bouglé, 2004; Ong y Shah, 2008).

Hidrólisis por enzimas digestivas. Las principales enzimas gastrointestinales que producen biopéptidos son la: pepsina, tripsina, quimiotripsina, enzima convertidora de angiotensina (ECA), pancreatina y las combinaciones de éstas con otras enzimas bacterianas (Korhonen, 2009; Wang *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2012).

Proteólisis microbiana. La fermentación de la leche se da principalmente por la acción de los microorganismos que forman parte de los cultivos usados en la manufactura de productos lácteos, particularmente las BAL (González-González *et al.*, 2011). La proteólisis es la degradación de las proteínas por la acción del sistema proteolítico de las BAL para liberar pequeños péptidos y aminoácidos (Smit *et al.*, 2005). Durante la fermentación de la leche, el sistema proteolítico de los cultivos iniciadores (Figura 1) juegan un rol crucial (Serra *et al.*, 2009). De los microorganismos que se encuentran frecuentemente formando parte de los cultivos iniciadores, los más estudiados son *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. (Ebringer *et al.*, 2008). La proteólisis es iniciada por una sola proteinasa extracelular, sin embargo, algunas BAL no sintetizan proteinasas extracelulares, en este caso dependen de otras cepas que liberen las proteinasas al medio. Siendo solo los péptidos menores a 18 residuos son los que pueden entrar a la célula, por medio de sistemas transportadores di/tri péptidos y oligopéptidos, posteriormente los péptidos son degradados intracelularmente por una gran variedad de peptidasas clasificadas en: aminopeptidasas, endopeptidasas, dipeptidasas, tripeptidasas, y peptidasas

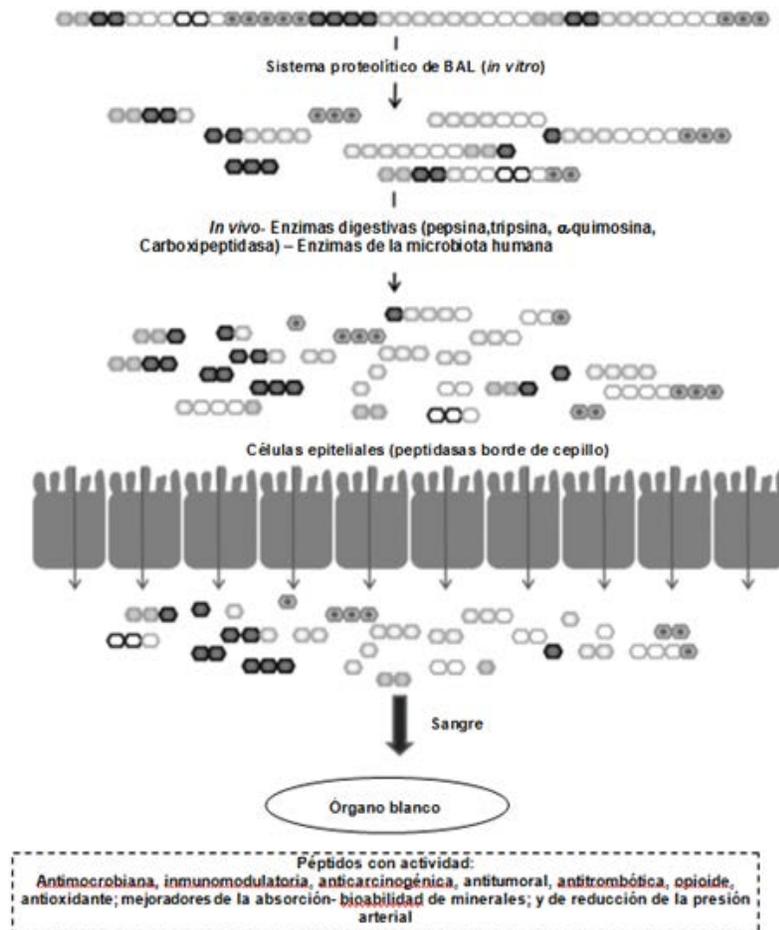


Figura 1. Hidrólisis de las proteínas por el sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas durante la digestión, misma que resulta en la liberación de péptidos bioactivos. Saavedra *et al.* (2013).



específicas sobre prolina; mismas que difieren mucho entre sí tanto en su actividad como en sus mecanismos de acción (Smit *et al.*, 2005).

Por otra parte, para inducir la síntesis *in vitro* de algunos biopéptidos, pueden usarse hongos peptidolíticos, como: *Aspergillus oryzae* (Ebringer *et al.*, 2008; Van der Zander *et al.*, 2008) y *Saccharomyces cerevisiae* (Ong y Shah, 2008). También, se han utilizado algas unicelulares para la producción sintética de biopéptidos, como es el caso de *Chlamydomonas reinhardtii*, que a partir de proteínas lácteas, hidrolizó péptidos con actividad antihipertensiva, opioide, antimicrobiana e hipocolesterolémica (Campos-Quevedo *et al.*, 2013).

Biopéptidos con Actividad Antihipertensiva

Diversos estudios han reportado biopéptidos que presentan actividad antihipertensiva (Ong y Shah, 2008; Losurdo *et al.*, 2014), la cual está directamente relacionada con la ECA (Peptidil dipéptido hidrolasa - EC 3.4.15.1), que es un dipéptido liberador de una exopeptidasa asociada a la regulación de la presión arterial, ya que participa en la conversión de angiotensina-I en angiotensina-II (Seppo *et al.*, 2003; Ahn *et al.*, 2009; Losurdo *et al.*, 2014). Algunos biopéptidos pueden inhibir la acción de esta enzima, logrando un efecto antihipertensivo que a su vez beneficia al sistema inmune y nervioso del consumidor ya que favorece el estado de homeostasis (Miguel *et al.*, 2007; Minervini *et al.*, 2009; Otte *et al.*, 2011). Así mismo, hidrolizados de origen lácteo producidos con tripsina han mostrado una actividad inhibitoria relevante de la ECA (Pripp, 2005) principalmente los péptidos cuyo tamaño es menor de 3 kDa (Alvarado y Guerra, 2010; Ruíz-Giménez *et al.*, 2012).



Los péptidos antihipertensivos contienen residuos hidrófobos como Trp, Tyr o Phe en una de las tres últimas posiciones de su secuencia; tal estructura peptídica al unirse a los sitios activos de la ECA bloquean la actividad de ésta (Shahidi y Zhong, 2008). Dicho bloqueo incrementa al aumentar la cantidad de cargas positivas, esto debido a la presencia de residuos de Lys o Arg en posiciones terminales del péptido, así como residuos de Pro solos o en combinación con residuos hidrófobos (Alvarado y Guerra, 2010). Algunos ejemplos de esta clase de tripéptidos son: Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro (Hözer y Kirmaci, 2009; Jauhiainen *et al.*, 2010; Udenigwe y Aluko, 2012) los cuales disminuyen significativamente la presión arterial en personas hipertensas (Van Mierlo *et al.*, 2009). Así mismo, se ha mostrado que al aislar dichos péptidos de leches agrias y administrarlos a ratas hipertensas, éstos inhiben la actividad de la ECA (Sipola *et al.*, 2001). Por otro lado, Jakala *et al.* (2009) al monitorear en ratas el tránsito del péptido radiomarcado Ile-Pro-Pro, por el sistema digestivo hasta su adsorción, concluyeron que el enlace Pro-Pro es resistente a las enzimas proteolíticas presentes en el aparato digestivo y por lo tanto, este puede llegar a la sangre y a otros órganos para desempeñar la actividad ECA inhibitoria, también probaron los péptidos Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro en ratas hipertensas, observando que estos presentan una función protectora del endotelio de las arterias. Jauhiainen *et al.* (2007 y 2010) mencionan que estos mismos tripéptidos presentan actividad antihipertensiva en personas hipertensas. Otros péptidos que han presentado actividad de la ECA son: el dipéptido Tyr-Pro, aislado de las proteínas del suero (Korhonen y Pihlanto, 2006) y los tripéptidos Leu-Ala-Met-Ala y Val-Phe-Lys provenientes de las β -



lactoglobulinas (Kamau *et al.*, 2010b). Los fragmentos Trp-Leu-Ala-His-Lys y Tyr-Gly-Leu de las α -lactoalbúminas también han mostrado actividad inhibitoria de la ECA (Kamau *et al.*, 2010a). Por otra parte Ruíz-Giménez *et al.* (2012) aislaron 11 péptidos de lactoferrina, los cuales ejercieron actividad inhibitoria de la ECA. Así mismo, se ha observado que el consumo de proteína hidrolizada de suero ejerce una reducción significativa en la presión sanguínea de personas hipertensas (FitzGerald *et al.*, 2004; Martínez y Martínez, 2006). Algunos otros péptidos que *in vitro* han mostrado acción inhibitoria de la actividad de la ECA incluyen: Leu-Pro-Pro, Ala-Trp, Ile-Trp, Leu-Trp, Val-Tyr, Ile-Tyr y Phe-Tyr, los cuales fueron aislados de yogurt (Foltz *et al.*, 2007). Tsai *et al.* (2008) inocularon leche con *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, y al separar el suero de la misma, observaron que la capacidad inhibitoria de la ECA se concentraba en el suero, misma que se atribuyó a la secuencia Tyr-Pro-Tyr-Tyr, posteriormente al administrar el suero a ratas hipertensas se observaron disminuciones significativas en la presión sistólica y diastólica. Nielsen *et al.* (2009) analizaron leches fermentadas con cepas específicas de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* observando un efecto ECA inhibitorio. Por otro lado, Rodríguez-Figueroa *et al.* (2010) encontraron que leche fermentada con cepas nativas de *L. lactis* de diversos ecosistemas podían biogenerar fracciones peptídicas con actividad antihipertensiva; mientras que Sánchez *et al.* (2011), al administrar caseína bovina hidrolizada a ratas hipertensas por 6 semanas, observaron reducción de la presión arterial sistólica y diastólica.



LITERATURA CITADA

- Ahn, J. E., S. Y. Park, A. Atwa, B. F. Gibbs y B. H. Lee. 2009. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey fermented by *Lactobacillus* species. *J. Food Biochem.* 33: 589-602.
- Allgeyer, L. C., M. J. Miller y S. Y. Lee. 2010. Sensory and microbiological quality of yogurt drinks with prebiotics and probiotics. *J. Dairy Sci.* 93:4471-4479.
- Alvarado, C. C. y M. Guerra. 2010. Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *Anales Venezolanos de Nutrición.* 23:42-49.
- Andrighetto, C., G. Marcazzan y A. Lombardi. 2004. Use of RAPD-PCR and TTGE for the evaluation of biodiversity of whey cultures for Grana Padano cheese. *Letters Appl. Microbiol.* 38:400-405.
- Angus, F. S. Smart y C. Shortt. 2005. Prebiotic ingredients with emphasis on galacto-oligosaccharides and fructo-oligosaccharides. En *Probiotic Dairy Products*. Tamime, A. Primer ed. Editorial: Blackwell publishing. Ayr UK.
- Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. En *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Seppo, S., A. V. Wrighth y A. Ouwehand. Tercera edición. Editorial CRC Press. USA.
- Beucler, J., M. Drake y E. A. Foegeding. 2005. Design of a beverage from whey permeate. 70:S277-S285.
- Bottari, B., M. Santarelli, E. Neviani y M. Gatti. 2010. Natural whey starter for Parmigiano Reggiano: culture-independent approach. *J. Appl. Microbiol.* 108:1676-1684.
- Bouhallab, S. y D. Bouglé. 2004. Biopeptides of milk: caseinophosphopeptides and mineral bioavailability. *Reprod. Nutr. Dev.* 44:493-498.
- Campos-Quevedo, N., S. Rosales-Mendoza, L. M. T. Paz-Maldonado, L. Martínez-Salgado, J. C. Guevara-Arauz y R. E. Soria-Guerra. 2013. Production of milk-derived bioactive peptides as precursor chimeric proteins in chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Tiss. Org.* 113:217-225.
- Castro, W. F., T. M. Cunha, P. J. Ogliari, R. F. Teófilo, M. M. C. Ferreira y E. S. Prudencio. 2009. Influence of different content of cheese whey and oligofructose on the properties of fermented lactic beverages: study using response surface methodology. *LWT-Food Sci. Technol.* 42: 993-997.
- Castro, W. F., A. G. Cruz, M. S. Bisinotto, L. M. R. Guerreiro, J. A. F. Faria, H. M. A. Bolini, R. L. Cunha y R. Deliza. 2013. Development of probiotic dairy beverages:



Rheological properties and application of mathematical models in sensory evaluation. *J. Dairy Sci.* 96:16–25.

- Choi, J., L. Sabikhi, A. Hassan y S. Anand. 2012. Bioactive peptides in dairy products. *International J. Dairy Technol.* 65: 1- 12.
- Coppola, S., G. Blaiotta, D. Ercolini y G. Moschetti. 2001. Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *J. Appl Microbiol.* 90:414 – 420.
- Costa, E. L., J. A. Rocha y F. Netto. 2007. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *Int. Dairy J.*17:632–640.
- Cruz, K. 2010. Determinación de la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*. Tesis Doctoral. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Instituto Politécnico Nacional, México D.F.
- Devries, M. y S. M. Phillips. 2015. Supplemental protein in support of muscle mass and health: Advantage Whey. *J. Food Sci.* 80:A8-A15
- Drgalic, I., L. Tratnik y R. Bozanic. 2005. Growth and survival of probiotic bacteria in reconstituted whey. *EDP Sci.* 85:171-179.
- Duggan, C., J. Gannon, y W. A. Walker. 2002. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 75:789-808.
- Dziuba, M., B. Dziuba y A. Iwaniak. 2009. Milk proteins as precursors of bioactive peptides. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 8:71-90.
- Dziuba, M. y M. Darewicz. 2007. Food proteins as precursors of bioactive peptides-classification into families. *Food Sci. Technol. Int.* 13:393-404.
- Ebringer, L., M., Ferencik y J. Krajcovi. 2008. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products – review. *Folia Microbiol.* 53:378–394.
- FitzGerald, R. J., B. A. Murray y D. J. Walsh. 2004. The emerging role of dairy proteins and bioactive peptides in nutrition and health. *J. Nutr.* 134:980S-988S.
- Foltz, M., E. E. Meynen, V. Bianco, C. Van Platerink, T. M. M. G. Koning y J. Kloek. 2007. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotripeptide-enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation. *J. Nutr.* 137:953–958.



- Fox, P. F. y P. L. H. Mc Sweeney. 2008. Capítulo4: Milk proteins. En Dairy Chemistry and Biochemistry. Fox, P. F. y P. L. H. Mc Sweeney. 1a. ed. Editorial Thompson Science. Cork, Irlanda.
- Gatti, M., C. Lazzi, L. Rossetti, G. Mucchett y E. Neviani. 2003. Biodiversity in *Lactobacillus helveticus* strains present in natural whey starter used for Parmigiano Reggiano cheese. J. Appl. Microbiol. 95:463–470.
- González, H. X. R. y R. J. R. González. 2002. Utilización del suero de leche para la elaboración de una bebida fermentada. Tesis de Licenciatura. Universidad EARTH. Guácimo, Costa Rica.
- González-González, C. R., K. M. Tuohy y P. Jauregi. 2011. Production of angiotensin - I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. Int. Dairy J. 21: 615-622.
- Gutiérrez, F. E. 2006. Desarrollo de una bebida dulce derivado de la fabricación de queso fresco, fermentada con cultivos *Lactobacillus helveticus* y *Streptococcus salivarius* var *thermophilus* (TCC-20), adicionada con cultivos probióticos *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LC-01. Tesis de Licenciatura. Universidad de Costa Rica. Facultad de Ciencias Agroalimentarias. Escuela de Tecnología de Alimentos. Costa Rica.
- Gutiérrez-Méndez, N., J. C. Rodríguez-Figueroa, A. F. González-Córdova, G. V. Nevárez-Moorillón, B. Rivera-Chavira y B. Vallejo-Cordoba. 2010. Phenotypic and genotypic characteristics of *Lactococcus lactis* strains isolated from different ecosystems. Can. J. Microbiol. 56:432–439.
- Hajirostamloo, B. 2010. Bioactive component in milk and dairy product. World Acad. Sci. Eng. Technol. 72:162-166.
- Holsinger, V. H., L. P. Posati y E. D. Devilbiss. 1974. Whey beverages. J. Dairy Sci. 57: 849-859
- Hözer, B. y H. A. Kirmaci. 2009. Functional milks and dairy beverages. Int. J. Dairy Technol. 63:1-15.
- Ijas, H., M. Collin, P. Finckenberg, A. Pihlanto-Leppala, H. Korhonen, R. Korpela, H. Vapaatalo y M.A. Nurminen. 2004. Antihypertensive opioid-like milk peptide a-lactorphin: lack of effect on behavioural tests in mice. Int. Dairy J. 14:201–205.
- Jakala, P., T. Jauhiainen, R. Korpela y H. Vapaatalo. 2009. Milk protein-derived bioactive tripeptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro protect endothelial function *in vitro* in hypertensive rats. J. Funct. Food. 1:266–273.



- Jauhiainen, T., K. Woulle, H. Vapaatalo, O. Kerojoki, K. Nurmela, C. Lowrie y R. Korpela. 2007. Oral absorption, tissue distribution and excretion of a radiolabelled analog of a milk-derived antihypertensive peptide, Ile-Pro-Pro, in rats. *Int. Dairy J.* 17: 1216-1223.
- Jauhiainen, T., M. Ronnback, H. Vapaatalo, K. Wuolle, H. Kautiainen, P. H. Groop y R. Korpela. 2010. Long-term intervention with *Lactobacillus helveticus* fermented milk reduces augmentation index in hypertensive subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64: 424–431.
- Kailasapahty, K. y J. Chin. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidocabetrium* spp. *Inmunol. Cell Biol.* 78:80-88.
- Kamau, S. M., L. Rong, W. Chen, X. M. Liu, F. W. Tian, Y. Shen y T. Gao. 2010b. Functional significance of bioactive peptides derived from milk proteins. *Food Rev. Int.* 26:386–401.
- Kamau, S. M., S. C. Cheison, W. Chen, X. M. Liu y L. Rong. 2010a. Alpha-lactalbumin: its production technologies and bioactive peptides. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety.* 9:197-212.
- Kim, S. y I. Wijesekara. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides. *J. Funct. Food* 2:1-9.
- Korhonen, H. 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *J. Funct Food.* 1:177–187.
- Korhonen, H. y A. Pihlanto. 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *Int. Dairy J.* 16: 945-960.
- Kumar, D. y T. C. Bhalla. 2005. Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:726–736.
- Laetitia, M. B. y P. M. Tomasula. 2008. Whey protein fractionation. En *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*. Onwulata, C. y P. Huth. Editorial: Blackwell publishing. USA.
- Lagrange, V., D. Whitsett y C. Burris. 2015. Global market for dairy proteins. *J. Food Sci.* 80:A16-A22.
- Lazzi, C., L. Rossetti, M. Zago, E. Neviani y G. Giraffa. 2004. Evaluation of bacterial communities belonging to natural whey starters for Grana Padano cheese by length heterogeneity-PCR. *J. Appl. Microbiol.* 96:481–490.
- Legarová, V. y L. Kourimská. 2010. Sensory quality evaluation of whey-based beverages. *Mljekarstvo.* 60:280-287.



- Losurdo, L., L. Quintieri, L. Caputo, R. Gallerani, B. Mayo y F. De Leo. 2014. Cloning and expression of synthetic genes encoding angiotensin-I converting enzyme (ACE)-inhibitory bioactive peptides in *Bifidobacterium pseudocatenulatum*. FEMS Microbiology Letters. 340: 24–32.
- Madureira, A. R., T. Tavares, A. M. P. Gomes, M. E. Pintado y F. X. Malcata. 2010. Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. J. Dairy Sci. 93: 437-455.
- Mahajan, S. S., L. Goddi y M. C. Qian. 2004. Aroma compounds in sweet whey powder. J. Dairy Sci. 87:4057-4063.
- Maity, T. K., R. Kumar y A. K. Misra. 2008. Development of healthy whey drink with *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum* and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. Mljekarstvo 58:315-325.
- Martínez, A. O. y V. M. E. Martínez. 2006. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. Nutrt. Hospitalaria 21:1-14.
- Miguel, M., M. Manso, A. Aleixandre, M. J. Alonso, M. Salaices y R. López-Fandiño. 2007. Vascular effects, angiotensin I-converting enzyme (ACE) Inhibitory activity, and antihypertensive properties of peptides derived from egg white. J Agric Food Chem. 55: 10615-10621.
- Minervini, F., M. A. Bilancia, S. Siragusa, M. Gobbetti y F. Caponio. 2009. Fermented goats' milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food. Food Microbiol. 26: 559-564.
- Miranda, M. O., P. L. Fonseca, I. Ponce, C. Cedeño, L. S. Rivero y L. M. Vázquez. 2007. Elaboración de una bebida fermentada a partir del suero de queso. Características distintivas y control de calidad. Rev. Cub. Alim. Nutrit. 17:103-108.
- Nakamura, Y. K. y S. T. Omaye. 2012. Metabolic diseases and pro- and prebiotics: Mechanistic insights. Nutr. Metab. 9:1-9.
- Nielsen, M. S., T. Martinussen, B. Flambard, K. I. Sorensen y J. Otte. 2009. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. Int. Dairy J. 19: 155-165.
- Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación. Enero de 1996.



- Ong, L. y N. P. Shah. 2008. Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *Food Sci. Technol. LEB.* 41:1555-1566.
- Otte, J., T. Lenhard, B. Flambard y K. I. Sorensen. 2011. Influence of fermentation temperature and autolysis on ACE-inhibitory activity and peptide profiles of milk fermented by selected strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactococcus lactis*. *Int. Dairy J.* 21: 229-238.
- Pescuma, M., E. M. Hébert, F. Mozzi y G. Font de Valdez. 2010. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 141:73–81.
- Plaisancié, P., J. Claustre, M. Estienne, G. Henry, R. Boutrou, A. Paquet y I. Léoni. 2013. A novel bioactive peptide from yoghurts modulates expression of the gel-forming MUC2 mucin as well as population of goblet cells and paneth cells along the small intestine. *J. Nutr. Biochem.* 24:213-221.
- Prazares, A. R., F. Carvalho y J. Rivas. 2012. Cheese whey management: A review. *J. Environ. Manage.* 110:48-68.
- Pripp, H. 2005. Initial proteolysis of milk proteins and its effect on formation of ACE-inhibitory peptides during gastrointestinal proteolysis: a bioinformatic, *in silico*, approach. *Eur Food Res Technol.* 221:712–716.
- Pritchard, S. R., M. Phillips y K. Kailasapathy. 2010. Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Res Int.* 43:1545-1548.
- Proyecto de Norma Mexicana. PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012. Sistema producto leche – alimentos – lácteos – suero de leche (líquido o en polvo) - especificaciones y métodos de prueba. Organismo nacional de normalización del COFOCALEC. 2012.
- Ranadheera, R. D. C. S., S. K. Baines, y M. C. Adams. 2010. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res. Int.* 43:1-7.
- Reinheimer, J. A., N. Bailo, V. Suárez, A. Quiberoni, A. Binetti y C. A. Meinardi. 1994. Microflora láctica de fermentos naturales de suero. *Rev. Arg. Lactol.* 10: 12-23
- Roberfroid, M. B. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods. *Am J. Clin Nutr.* 71:1682s-7s.
- Rodríguez-Figueroa, J. C., R. Reyes-Díaz, A. F. González-Córdova, R. Troncoso-Rojas, I. Vargas-Arispuro, y B. Vallejo-Córdoba. 2010. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk fermented by wild and industrial *Lactococcus lactis* strains. *J. Dairy Sci.* 93: 5032-5038.



- Ruiz-Giménez, P., J. B. Salom, J. F. Marcos, S. Vallés, D. F. Martínez-Maqueda, I. Recio, G. Torregrosa, E. Alborch y P. Manzanares. 2012. Antihypertensive effect of a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate: Identification of novel active peptides. *Food Chem.* 131:266–273.
- Saavedra, L., E. M. Hebert, C. Minahk y P. Ferranti. 2013. An overview of “omic” analytical methods applied in bioactive peptide studies. *Food Res Int.* 54:925–934.
- SAGARPA. 2015. Boletín de leche Enero-Marzo 2015. Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Producción anual. México.
- Sánchez, D., M. Kassan, M. M. Contreras, R. Carrón, I. Recio, M. J. Montero y M. A. Sevilla. 2011. Long-term intake of a milk casein hydrolysate attenuates the development of hypertension and involves cardiovascular benefits. *Pharmacol Res.* 63:398-404.
- Sanlidere, H. A. y Z. Oner. 2011. Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. *J. Dairy Sci.* 94:5305–5314.
- Savijoki, K, H. Ingmer y P. Varmanen. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:394–406
- Seppo, L., T. Jauhiainen, T. Pouss y R. Korpela. 2003. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure–lowering effect in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 77:326–30.
- Serra, M., A. J. Trujillo, B. Guamis y V. Ferragut. 2009. Proteolysis of yogurts made from ultra-high-pressure homogenized milk during cold storage. *J. Dairy Sci.* 92:71-78.
- Shahidi, F. y Y. Zhong. 2008. Bioactive peptides. *J AOAC Int.* 91:914-931.
- Silveira, E. O., J. H. Lopes- Neto, L. A. Silva, A. E.S. Raposo, M. Magnani y H. R. Cardarelli. 2015. The effects of inulin combined with oligofructose and goat cheese whey on the physicochemical properties and sensory acceptance of a probiotic chocolate goat dairy beverage. *LWT-Food Sci. Technol.* 62:445–451.
- Sipola, M., P. Finckenberg, J. Santisteban, R. Korpela, H. Vapaatalo y M. L. Nurminen. 2001. Long-term intake of milk peptides attenuates development of hypertension I spontaneously Hypertensive rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 52: 745–754.
- Smit, G., B. Smit y W. Engels. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:591-560.



- Tamime, A. Y., M. Saarela, A. Korlund, V. V. Mirasty y N. P. Shah. 2005. Production and maintenance of viability of probiotic micro-organism in dairy products. En Probiotic Dairy Products. Tamime, A. Primer ed. Editorial: Blackwell publishing. Ayr UK.
- Teixeira, K., D. Ribeiro, G. V. De Melo, J. M. Oliveira, L. Domingues, J. A. Teixeira, J. B. De Almeida y R. F. Schwan. 2011. Chemical composition and sensory analysis of cheese whey-based beverages using kefir grains as starter culture. *Int. J. Food Sci. Technol.* 46:871–878.
- Tharmaraj, N. y N. P. Shah. 2003. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. *J. Dairy Sci.* 86: 2288-2296.
- Tsai, J. S., T. J. Chen, B. S. Pan, S. D. Gong y M. Y. Chung. 2008. Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. *Food Chem.* 106:552-558.
- Tunick, M.H. 2008. Whey protein production and utilization. En *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*. Onwulata, C. y P. Huth. Editorial: Blackwell publishing. USA.
- Udenigwe, C. U. y R. E. Aluko. 2012. Food protein-derived bioactive peptides: production processing and potential health benefits. *J. Food Sci.* 71:R11-R24.
- Van der Zander, K., M. L. Bots, A. A. A. Bak, M. M. G. Koning y P.W. Leeuw. 2008. Enzymatically hydrolyzed lactotripeptides do not lower blood pressure in mildly hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 88:1697–1702.
- Van Mierlo, L. A. J., M. M. G. Koning, K. Van der Zander y R. Draijer. 2009. Lactotripeptides do not lower ambulatory blood pressure in untreated whites: results from 2 controlled multicenter crossover studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 89: 617–623.
- Vinderola, C. G. y J. A. Rehinheimer. 1999. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yogurt bacteria. *Int. Dairy J.* 9:497-505.
- Wang, L., X. Mao, X. Cheng, X. Xiong y F. Ren. 2010. Effect of enzyme type and hydrolysis conditions on the in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and ash content of hydrolysed whey protein isolate. *International J. Food Sci. Technol.* 45: 807–812.



Weimann, C., H. Meisel y G. Erhardt. 2009. Short communication: Bovine κ -casein variants result in different angiotensin I converting enzyme (ACE) Inhibitory peptides. *J. Dairy Sci.* 92:1885–1888.

Zago M., V. Suarez, J. A. Reinheimer, D. Carminati y G. Giraffa. 2007. Spread and variability of the integrase gene in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* strains and phages isolated from whey starter cultures. *J. Appl Microbiol.* 102: 344–351.

ESTUDIO I. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL SUERO DE LECHE EN LA INDUSTRIA DEL QUESO CHIHUAHUA

Montoya, P. P., A. Chávez Martínez, J. C. Rodríguez Figueroa, N. Aguilar Palma, A. L. Rentería Monterrubio y G. Rodríguez Hernández. Características fisicoquímicas y microbiológicas de suero de leche de queso Chihuahua. 2014. Revista Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. 62:11-16.

RESUMEN

Se analizó la calidad microbiológica de 30 muestras de suero lácteo, cuantificándose tres variables: mesofílicos aerobios, coliformes totales y mohos y levaduras. El objetivo de este muestreo, fue realizar una evaluación preeliminar del suero en la industria quesera, para considerar la asociación con una de ellas y trabajar en la formulación de una bebida funcional. Las muestras fueron recolectadas de febrero a agosto del año 2011, de diferentes queserías ubicadas en siete ciudades del Estado de Chihuahua: Camargo, Chihuahua, Cuauhtémoc, Delicias, Meoqui, Rosales y Saucillo. Entre las queserías monitoreadas las tres variables mostraron diferencias ($p < 0.05$). Posteriormente, las variables fueron sometidas a un análisis cluster, observándose diferencias en los conteos microbiológicos del suero, formándose tres grupos iniciales con un 35 % de similitud. Demostrándose de ésta manera que no existe una asociación en la calidad microbiológica del suero, según la ciudad monitoreada, ya que entre éstos grupos primarios no hubo un patrón de incidencia. Según el proyecto de norma PROY-F-721-COFOCALEC-2012, de las 30 muestras monitoreadas, estuvieron por encima de lo establecido: 27 para mesofílicos aerobios, 21 para coliformes totales y 12 de mohos y levaduras. Dichos resultados denotan la variabilidad en los procesos y diferencias entre la materia prima, así como, las malas prácticas de higiene y manejo empleadas en la obtención del suero. Con base a la variabilidad observada y las altas cuentas microbianas, se optó por elaborar el suero en el laboratorio, para controlar las condiciones del proceso y no se eligió la asociación con ninguna de las empresas monitoreadas.

ABSTRACT

The microbiological qualities of 30 samples of whey were analyzed in terms of yeasts and molds, aerobic mesophiles and total coliforms. The aim was to evaluate the quality of the whey produced in Chihuahua in order to formulate a functional beverage. Samples were collected from February to August 2011 in seven cities of Chihuahua: Camargo, Chihuahua, Cuauhtémoc, Delicias, Meoqui, Rosales and Saucillo. The variables had differences ($p < 0.05$). The cluster analysis showed statistical differences in the microbial counts. The three initial groups with 35 % similarity, demonstrated that there is not association between the microbiological quality of the whey and the city monitored. Among these primary groups there was not a pattern of incidence. According to standard project (PROY-F-721-COFOCALEC-2012) the limits were surpassed in 27 out of the 30 samples for aerobic mesophiles, in 21 for total coliforms and in 12 for moulds and yeasts. These results expose the variability of the processes and the differences between the raw materials, as well as poor hygiene and the handling practices employed in the production of whey. Based on the variability and the high microbial accounts, it was decided not to use the commercial whey and prepare it in the laboratory to control the conditions.

INTRODUCCIÓN

El queso Chihuahua es un tipo de queso prensado, de pasta semidura a blanda, sometido a maduración mediante microorganismos, bajo condiciones de tiempo, temperatura y humedad controladas (NOM-121-SSA1-1994). Es uno de los principales quesos producidos en el Norte de México y es una variante de queso Cheddar joven (de 2-4 semanas de maduración) y fue desarrollado por la comunidad Menonita en el Estado de Chihuahua (Van Hekken *et al.*, 2007). Chihuahua ocupa la cuarta posición en producción de leche a nivel nacional, con más de mil millones de litros en el año 2014, de los cuales se destinaron 342, 870 ton para producción de quesos. Específicamente en queso Chihuahua se generó un ingreso mayor a 2, 432 millones de pesos con una producción de 39, 712 ton y de éstos últimos se produjeron más de 357 mil lt de suero (SAGARPA, 2015), ya que por cada kilo de queso producido, se generan 9 lt de suero aproximadamente (Pescuma *et al.*, 2010).

La industria láctea está asociada con la producción de distintos subproductos líquidos contaminantes, mismos que varían según el producto del cual sean obtenidos (yogurt, mantequilla, queso u otros productos lácteos). La calidad de estos, se define en gran medida por las condiciones dadas durante su procesamiento (Prazeres *et al.*, 2012).

El suero es la parte líquida de la leche que se obtiene después de la separación de la cuajada (caseína) durante la elaboración del queso. Su composición varía en función de la leche utilizada, el tipo de queso del cual proviene, del método de coagulación y de los procesos a los que es sometido para obtener propiedades funcionales específicas (PROY-NMX-F-721-

COFOCALEC-2012: Sistema producto leche – alimentos – lácteos – suero de leche líquido o en polvo - especificaciones y métodos de prueba).

El suero se clasifica de acuerdo al pH y según el tipo de queso del cual se separe puede ser ácido ó dulce. El primero se obtiene de la producción de yogurt y quesos como el cottage y tiene un pH menor de 5.1. El suero dulce es extraído de los procesos de quesos tipo Cheddar (como el queso Chihuahua) y tiene un pH mayor a 5.6 (Tunick, 2008). El suero retiene cerca del 55 % de los nutrientes de la leche (González-Siso, 1996); y debido a la concentración de riboflavina (vitamina B₂), se caracteriza por su color amarillo verdoso (Prazeres *et al.*, 2012). Se estima que el suero dulce, está conformado por 7 % de sólidos totales de los cuales: 74 % es lactosa, 10-12 % son proteínas, 8 % son minerales, 3 % es grasa y 1-3 % es ácido láctico (Miranda *et al.*, 2007). En general, por cada 10 lt de leche, se elabora 1 kg de queso tipo Cheddar como el queso Chihuahua obteniendo como subproducto 9 lt de suero (González-Siso, 1996; Tunick, 2008). En cuanto a los usos del suero dulce en la industria quesera de nuestro Estado, se ha observado que es empleado principalmente en la alimentación de cerdos, y en algunos casos en la elaboración de otros productos como requesón. En otros países se produce suero en polvo concentrado (WPC, por sus siglas en inglés) y/o separado o fraccionado (WPI, por sus siglas en inglés), siendo estos últimos especialmente usados por su calidad nutrimental (Wright *et al.*, 2008). No obstante, la maquinaria para concentrar, deshidratar y separar el suero es muy costosa (Mahajan *et al.*, 2004). Por lo anterior, en muchos de los casos este subproducto es desechado al drenaje o a los cuerpos de agua representando un fuerte contaminante

debido a su alta demanda bioquímica de oxígeno de 35 - 50 kg/lit (Miranda *et al.*, 2007), sobrepasando lo que marca la norma mexicana, la cual permite verter en ríos, sustancias con una demanda bioquímica de oxígeno de 150 mg/lit máximo (NOM-001-ECO-1996), cabe hacer mención que no existe regulación para drenaje. Respecto al suero producido en nuestro país, se desconoce que proporción se utilizó para realizar otros subproductos lácteos y cuanto se vertió al drenaje.

Por otra parte, en la actualidad no existen normas mexicanas que regulan el manejo y análisis del suero de queso, ya que como se mencionó anteriormente, éste se considera un subproducto de la manufactura del queso de poco o nulo valor en la industria alimentaria. Sin embargo, existe el proyecto de norma PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012, "Sistema producto leche - alimentos – lácteos – suero de leche (líquido o en polvo) – especificaciones y métodos de prueba". Mismo que se basa en las normas mexicanas oficiales para el análisis de otros alimentos. La norma NOM-109-SSA1-1994, establece el procedimiento para la toma, manejo y transporte de muestras para el análisis microbiológico en alimentos. La norma NOM-110-SSA1-1994, indica la preparación y dilución de muestras y la NOM-243-SSA1-2010 menciona los microorganismos a determinar en leche pasteurizada y productos lácteos. Dichas normas podrían usarse para el análisis de suero.

Los análisis microbiológicos reportados en suero lácteo son escasos, y generalmente están enfocados en cuantificar e identificar bacterias ácido lácticas (BAL). A la fecha no existe información sobre la calidad sanitaria de los sueros que se obtienen de la producción de la industria quesera Chihuahuense.

Dicha calidad según el PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012, establece que los límites para mesofilos aerobios son 100 UFC/mL y para coliformes totales de 10, 00 UFC/mL, para mohos y levaduras no lo menciona. Los mesofílicos aerobios determinan el contenido total de los microorganismos presentes en el alimento, presentan una temperatura óptima de crecimiento de 35 ± 2 °C en condiciones aeróbicas (NOM-092-SSA1-1994), es por ello, que este conteo incluye a los microorganismos iniciadores utilizados durante la manufactura del queso, que están presentes en suero, así como también a los microorganismos contaminantes que pudieran estar presentes en el mismo. La determinación de coliformes es una prueba ampliamente utilizada en microbiología de alimentos como indicador de las prácticas higiénicas, esta puede aplicarse para: detectar prácticas sanitarias deficientes en la elaboración y manipulación de los alimentos y del equipo empleado; aunque su presencia no necesariamente implica un riesgo sanitario (NOM-113-SSA1-1994). Los mohos y levaduras pueden encontrarse en los alimentos como agentes contaminantes provocando su deterioro, ya que son capaces de metabolizar carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos que alteran el sabor, color y olor del alimento, además de que algunos de ellos son capaces de producir metabolitos tóxicos termoresistentes. Es por ello que cuantificar mohos y levaduras en alimentos es un indicador de prácticas sanitarias inadecuadas durante el procesamiento de los alimentos y/o del manejo de la materia prima (NOM-111-SSA1-1994). Por las razones anteriormente expuestas es importante el monitoreo de dichos microorganismos en el suero, para poder evaluar su calidad y poder considerarlo para su uso como ingrediente o alimento.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la calidad sanitaria de 30 muestras de suero en términos de: mesofílicos aerobios, coliformes totales y mohos y levaduras, de diferentes muestras de suero de queso Chihuahua de 30 diferentes queserías del Estado, con la finalidad de elegir una de ellas para usar el suero en un estudio posterior.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Área de Estudio

El presente estudio se efectuó del día 6 de Febrero al día 22 de Agosto del año 2011, mismo que comprendió la recolección de 30 diferentes muestras de suero, todas ellas de distintas queserías localizadas en siete ciudades del Estado de Chihuahua. Los análisis se realizaron en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua (FZYE-UACH).

Recolección de las Muestras

Las muestras de suero de queso Chihuahua se colectaron de 30 queserías diferentes distribuidas en siete ciudades del Estado de Chihuahua, de las cuales: cuatro procedían de la Ciudad de Camargo, cinco de Chihuahua, cuatro de Cuauhtémoc, ocho de Delicias, cinco de Meoqui, una de Rosales y tres de Saucillo. Estas fueron transportadas en hieleras con refrigerante hasta el laboratorio de Microbiología (FZYE-UACH) para su análisis.

Análisis Microbiológico

El análisis microbiológico, constó de las determinaciones de mesófilos aerobios (NOM-092-SSA1-1994), incubados en condiciones de carboxifilia, coliformes totales (NOM-113-SSA1-1994) y mohos y levaduras (NOM-111-SSA1-1994). Como lo sugieren dichas normas, todos los conteos se realizaron por duplicado y se seleccionaron las placas que contenían entre 15 y 150 colonias, para su cuantificación.

Análisis Estadístico

Los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico SAS (2006).

Primeramente se llevó a cabo un análisis de varianza con el PROC GLM y para la comparación de medias entre queserías, se utilizó la prueba de TUKEY, usando como variables clasificatorias las queserías monitoreadas y las dos repeticiones, y como las variables de respuesta: 1) mesofílicos aerobios, 2) coliformes totales y 3) mohos y levaduras. Considerando el siguiente modelo:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

y_{ij} = variable de respuesta en la j -ésima repetición de la i -ésima muestra de suero.

μ = media general.

τ_i = efecto fijo de la i -ésimo quesería.

ε_{ij} = error aleatorio distribuido en forma normal con media cero y varianza, donde $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$.

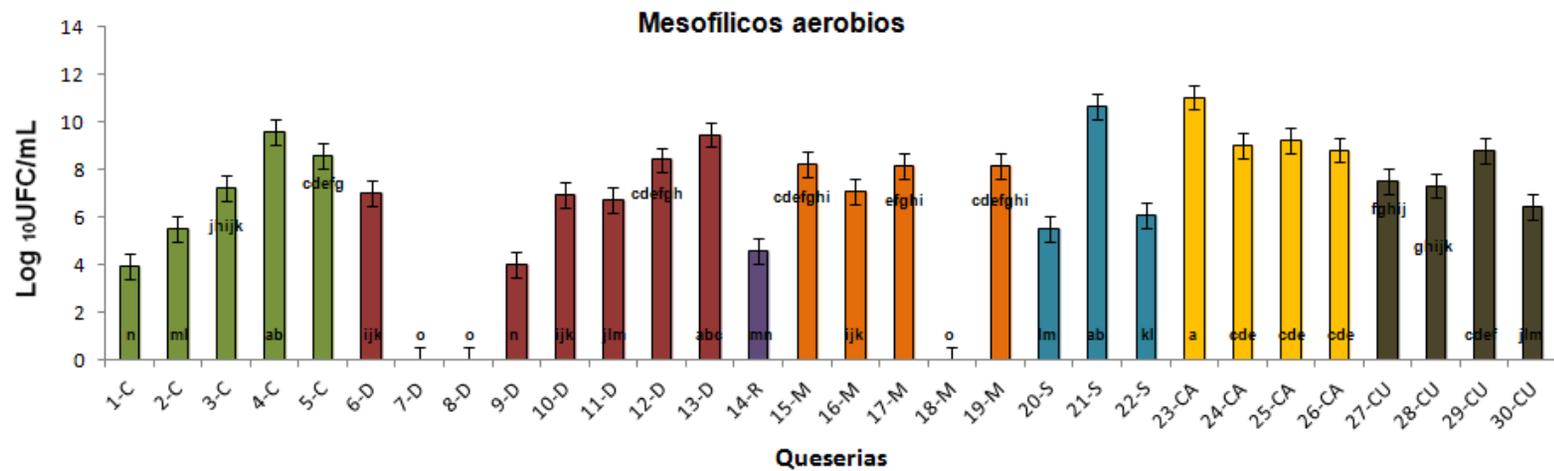
A continuación, se llevó a cabo un análisis de conglomerados (cluster) para observar si existían semejanzas entre las 30 muestras en base a las mismas tres variables. Se usó el procedimiento ACECLUS, para la transformación canónica de los datos y el procedimiento CLUSTER para la agrupación. El objetivo del análisis cluster es agrupar las muestras de las queserías para lograr la máxima homogeneidad en cada grupo y la mayor heterogeneidad entre grupos, y se representa gráficamente con un dendograma. El procedimiento ACECLUS obtiene una estimación aproximada de la matriz de covarianzas dentro de grupos y a partir de ella crea variables canónicas (no correlacionadas entre sí) que sustituyen a las variables originales

y son utilizadas en el análisis Cluster posterior. La transformación canónica implica la creación de combinaciones lineales de las variables originales para generar variables que establezcan una máxima separación entre grupos. Las variables canónicas resumen la variación existente entre grupos (Fernández-Santana, 1991). Es por ello que para el análisis de los datos se usó dicho procedimiento con el objetivo de identificar si existiera algún patrón de asociación entre la procedencia de las muestras y la calidad microbiológica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mesofílicos Aerobios, Coliformes Totales, Mohos y Levaduras

Los conteos para mesofílicos aerobios mostraron diferencias ($p < 0.05$) entre la procedencia de las muestras, como se muestran en la Gráfica 1, donde se puede apreciar que en algunas muestras no fueron detectados microorganismos mesofílicos (muestras números 7, 8, 18), lo cual pudo deberse a que para la elaboración de esos quesos no fueron empleados cultivos iniciadores, ya que según la NOM-121-SSA1-1994, se pueden usar para la obtención de la cuajada ácidos como: acético, láctico o cítrico (máximo 40 g/kg); o bien para prolongar la vida en anaquel de la leche la adición de peróxido de hidrógeno (máximo 0.05 %). Todo ello afectando directamente la microbiota presente. No obstante, en dichas muestras si fueron detectados coliformes totales, lo cual se puede explicar ya que por medio de las técnicas convencionales empleadas para la cuantificación de microorganismos en placa, no crecen todos los microorganismos presentes en la muestra, solo es una aproximación del conteo real que está presente en el alimento, como lo menciona la NOM-092-SSA1-1994, misma que textualmente menciona lo siguiente: “Cuando se requiere investigar el contenido de microorganismos viables en un alimento, la técnica comúnmente utilizada es la cuenta en placa. Así mismo, esta técnica no pretende poner en evidencia todos los microorganismos presentes. La variedad de especies y tipos diferenciables por sus necesidades nutricionales, temperatura requerida para su crecimiento, oxígeno disponible, etc., hacen que el número de colonias contadas constituyan una estimación de la cifra realmente presente la cual refleja si el manejo



Gráfica 1. Conteo de mesófilicos aerobios en suero de queso Chihuahua. En 7 diferentes ciudades del Estado de Chihuahua: C-Chihuahua, D-Delicias, R-Rosales, M-Meoqui, S-Saucillo, CA-Camargo, CU-Cuauhtémoc. Las barras de error indican la desviación estándar entre las repeticiones de los conteos.

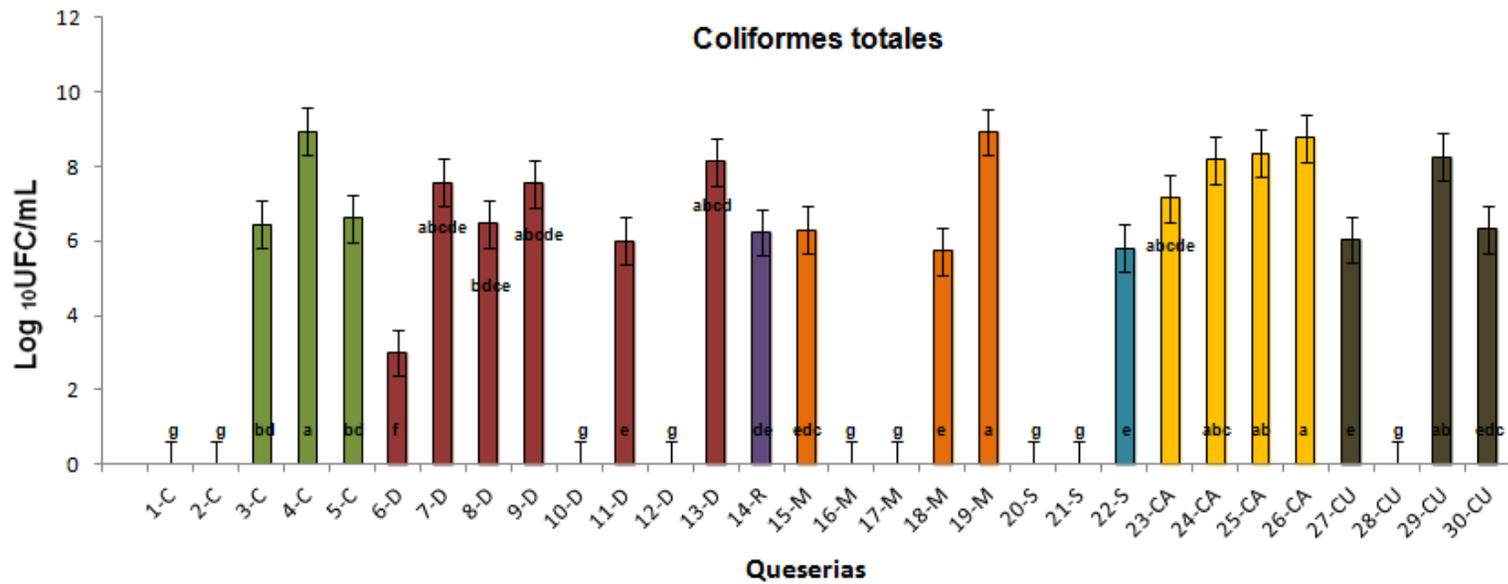
sanitario del producto ha sido el adecuado". Es por ello entendido que la cuenta en placa es una estimación aproximada de la carga bacteriana medida, así como también, es de considerarse que los microorganismos pueden crecer selectivamente en un medio y en otro no, si comparamos los resultados obtenidos por las técnicas de mesofílicos y coliformes, además de que en ambos procedimientos puede crecer sólo una parte de los microorganismos presentes en la misma muestra. Este estudio representa una estimación de la calidad microbiológica que existe en los sueros de queso Chihuahua, producidos en el Estado de Chihuahua, en el cual, se determinó analizar 30 muestras diferentes, para poder establecer una distribución normal en dicha estimación. Sin embargo, para poder realizar una caracterización microbiológica de los sueros, sería necesario llevar a cabo un estudio más detallado, así como un número de muestras estadísticamente representativa de la industria quesera chihuahuense. Además, realizar un análisis por técnicas de biología molecular, para identificar la microbiota de los sueros como: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o hibridación fluorescente *in situ* (FISH) como los realizados para otros tipos de suero (Ercolini *et al.*, 2008; Bottari *et al.*, 2009).

Por otra parte, el proyecto de norma PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012, referente al suero de leche líquido dulce y/o ácido pasteurizado, establece que el límite máximo para mesofílicos aerobios es 1×10^4 UFC/mL equivalentes a 4 Log UFC/mL. Considerando este límite se observó que 90 % (27/30) de los sueros monitoreados superaron dicho valor. El proyecto de norma y la NOM-243-SSA1-2010, en quesos de suero, para coliformes totales establecen como límite máximo una carga de 100 UFC/mL equivalentes a 2 Log

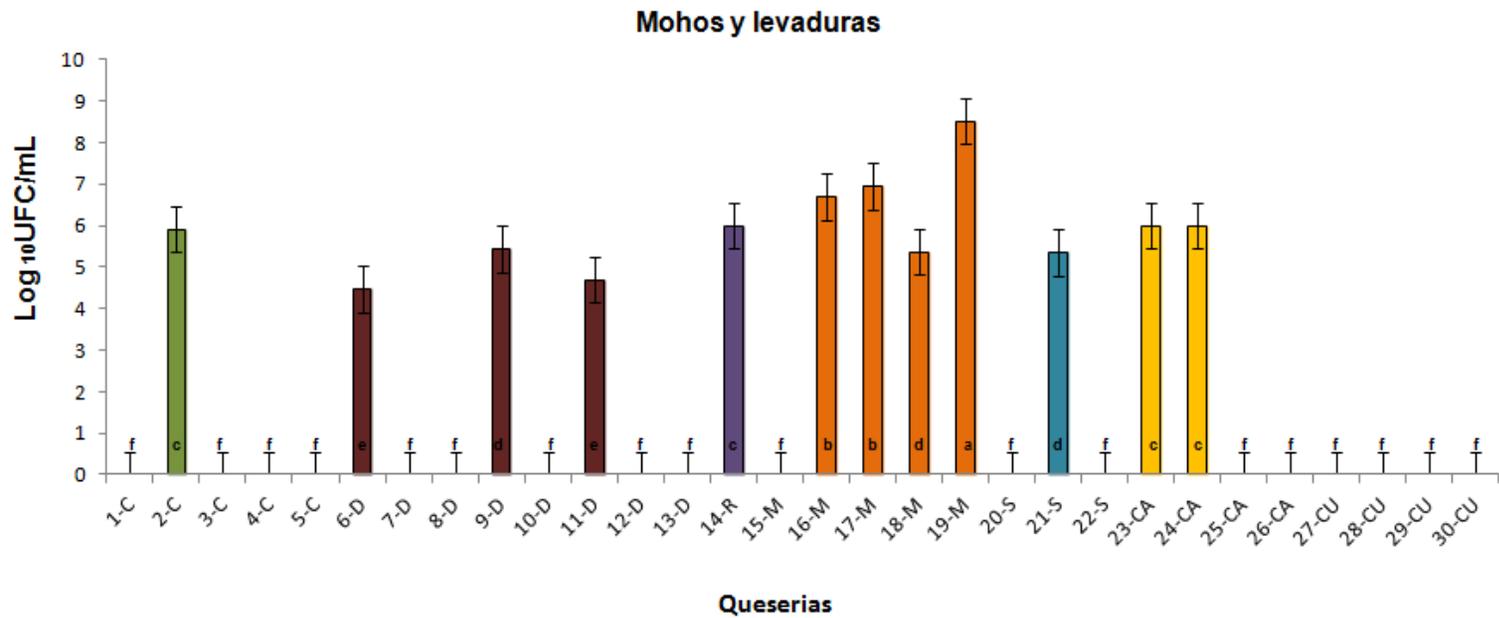
UFC/mL, considerando este valor, 70 % (21/30) de los sueros no cumplieron con esta especificación, como se observa en la Gráfica 2. Donde se aprecia que existieron diferencias ($p < 0.05$) entre las queserías monitoreadas. Para el contenido de mohos y levaduras, también existieron diferencias ($p < 0.05$) como se muestra en la Gráfica 3. La NOM-243-SSA1-2010 establece como límite máximo en suero de queso una carga de mohos y levaduras de 500 UFC/mL equivalentes a 2.7 Log UFC/mL, lo cual indica que 40 % (12/30) de las muestras sobrepasó éste límite. Los límites máximos establecidos con los cuales fueron comparadas las cargas microbianas totales corresponden a valores establecidos para sueros pasteurizados. Las cuentas microbiológicas en el presente estudio presentaron valores por arriba de los permitidos, lo que pudiera deberse al hecho de que en el Estado de Chihuahua existen muchas queserías que no pasteurizan la leche, o bien pasteurizan, pero el manejo que se le da al suero no es el adecuado.

Análisis Cluster

El procedimiento cluster mostró que la primera variable explicó el 41.8 % de la varianza total, la segunda variable el 30.9 % y la tercera el 27.1 %. Existiendo una distancia cuadrática media entre observaciones de 7.70. Es decir, existe diferencia entre las cargas microbianas totales (mohos y levaduras, mesofílicos y coliformes totales) para cada uno de los sueros según su procedencia. Con los resultados del análisis cluster, se observó que existió heterogeneidad entre las queserías analizadas, en otras palabras no hay un patrón de asociación entre la procedencia de los sueros y las cuentas microbiológicas que se le realizaron a las muestras analizadas. De dicha

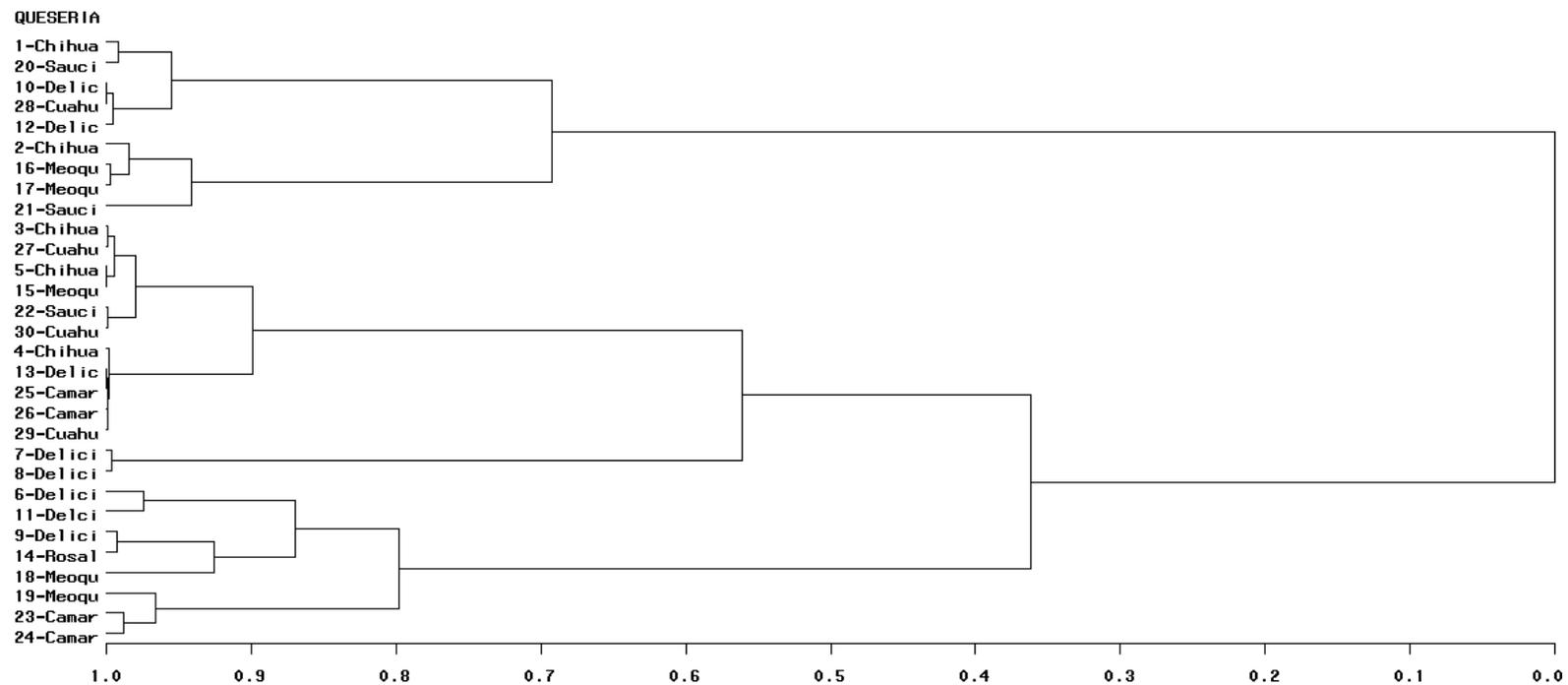


Gráfica 2. Conteo de coliformes totales en suero de queso Chihuahua. En 7 diferentes ciudades del Estado de Chihuahua: ■ C-Chihuahua, ■ D-Delicias, ■ R-Rosales, ■ M-Meoqui, ■ S-Saucillo, ■ CA-Camargo, ■ CU-Cuauhtémoc. Las barras de error indican la desviación estándar entre las repeticiones de los conteos.



Gráfica 3. Conteo de mohos y levaduras en suero de queso Chihuahua. En 7 diferentes ciudades del Estado de Chihuahua: C-Chihuahua, D-Delicias, R-Rosales, M-Meoqui, S-Saucillo, CA-Camargo y CU-Cuauhtémoc. Las barras de error indican la desviación estándar entre las repeticiones de los conteos.

manera se formaron tres grupos iniciales para asociar las queserías, como se muestra en el dendograma o diagrama de árbol (Gráfica 4), en el cual el eje de las abscisas corresponde el coeficiente de determinación (R^2) mismo que indica la proporción de la varianza total controlada en cada nivel de agrupamiento, o bien, a mayor número de grupos formados más cercana es la R^2 al 100 % de la variación. En el eje de las ordenadas se muestran las queserías Identificadas con números del 1 al 30 seguidos del nombre de la ciudad de procedencia. Los primeros tres grupos armados mostraron alrededor de 35 % de similitud de los datos, por lo cual, se corrobora que existió variación entre la carga microbiana total para cada una de las queserías. De la misma manera se puede observar que no existió un patrón de asociación entre el lugar de procedencia de las muestras de suero con el grupo al cual fueron asociadas. Es decir, microbiológicamente el suero no es similar entre queserías de la misma ciudad, lo cual, es factible ya que las características sensoriales y microbiológicas de los productos lácteos son altamente influenciadas por tres factores principalmente: a) la calidad de la leche, b) los cultivos lácticos y c) el proceso de elaboración de los mismos (Sangronis y García, 2007; Acevedo *et al.*, 2010). Relativo a la leche empleada como materia prima, sus características fisicoquímicas dependen primordialmente de: la raza del animal, tipo de alimentación, época del año, estado general de salud y/o etapa de lactación, entre otros (Prazeres *et al.*, 2012). Dichos aspectos van a favorecer la presencia o ausencia de diversos microorganismos nativos de la leche, aunado a estos, los cultivos adicionados a la leche durante su procesamiento también



Grado de similitud del 0 al 100 %.

Gráfica 4. Diagrama de árbol del análisis cluster (Dendograma), muestra el grado de similitud del 0 al 100 %, entre 30 muestras de suero de queso Chihuahua. En 7 diferentes ciudades del Estado de Chihuahua: Chihuahua, Delicias, Rosales, Meoqui, Saucillo, Camargo y Cuauhtémoc.

afectarán las características del suero, ambos en función de su concentración y características metabólicas, que propician diferentes asociaciones antagónicas o simbióticas (Ustok *et al.*, 2007). Por último, el proceso de manufactura del queso, específicamente, si se pasteuriza la leche o no, los tiempos y temperaturas empleados durante el proceso, así como la medida de implementación de buenas prácticas de manufactura; todos estos factores tienen un impacto en la calidad de los sueros obtenidos (Sangronis y García, 2007; Acevedo *et al.*, 2010).

Los resultados sugieren, que se requiere llevar a cabo, una caracterización del suero lácteo producido en el Estado de Chihuahua, para identificar la microbiota de los sueros, así como, correlacionar las condiciones del proceso de elaboración y la materia prima con la calidad del suero.

Este conocimiento ayudaría a infundir la concientización del valor nutricional del suero y sus aplicaciones para darle un valor agregado a este subproducto y deje de ser un foco de contaminación. Y con todo ello que sea una herramienta que sustente la necesidad de una normativa que regule el manejo del suero lácteo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las muestras analizadas, mostraron diferencias en torno a las variables analizadas: mohos y levaduras, mesofílicos aerobios y coliformes totales, es decir, las cargas microbianas totales para los sueros fueron diferentes y no existió relación entre el lugar de procedencia del suero y la carga microbiana. Así bien, se observó una alta heterogeneidad entre las variables analizadas para cada una de las muestras.

La presente investigación sustenta la necesidad de una normativa que regule el manejo del suero. Aunado a esto, se debe concientizar a los productores de la industria quesera de llevar a cabo buenas prácticas de manufactura en el proceso de elaboración de los quesos y por lo tanto del suero, para que éste pueda y sea aprovechado como materia prima para la elaboración de otros productos lácteos aprovechando su alto valor nutricional.

Las cargas microbianas de los sueros fueron muy altas en comparación en lo establecido con el proyecto de norma para suero PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012. Por tal hecho no se eligió de entre ninguna quesería monitoreada para proceder a trabajar en conjunto con ellos para la posterior formulación de un producto funcional a base de suero. Se recomienda la elaboración propia del suero en el laboratorio para poder tener controladas mayormente las variables del proceso y con ello reducir en la mayor medida posible, el error experimental.

LITERATURA CITADA

- Acevedo, D., A. Rodríguez y A. Fernández. 2010. Efecto de las variables de proceso sobre la cinética de acidificación, la viabilidad y la sinéresis del suero costeño colombiano. *Información Tecnológica*. 21:29-36.
- Bottari, B., M. Santarelli, E. Neviani y M. Gatti. 2010. Natural whey starter for Parmigiano Reggiano: culture-independent approach. *J. Appl. Microbiol.* 108:1676-1684.
- Ercolini, D., G. Frisso, G. Mauriello, F. Salvatore y S. Coppola. 2008. Microbial diversity in natural whey cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 124:164-170.
- Fernández-Santana, O. 1991. El análisis de cluster: aplicación, interpretación y validación. *Papers*. 37:65-67.
- González-Siso, M. I. 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technol.* 57:1-11.
- Lagrange, V., D. Whitsett y C. Burris. 2015. Global market for dairy proteins. *J. Food Sci.* 80:A16-A22.
- Mahajan, S. S., L. Goddi y M. C. Qian. 2004. Aroma compounds in sweet whey powder. *J. Dairy Sci.* 87:4057-4063.
- Miranda, M. O., P. L. Fonseca, I. Ponce, C. Cedeño, L. S. Rivero y L. M. Vázquez. 2007. Elaboración de una bebida fermentada a partir del suero de queso. Características distintivas y control de calidad. *Rev. Cub. Alim. Nutr.* 17:103-108.
- Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. *Diario Oficial de la Federación*. Enero de 1996.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. *Diario Oficial de la Federación*. 12 de Diciembre de 1995.
- Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1996, proyecto de norma oficial mexicana, bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. 26 de Mayo de 1994.
- Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, que establece los bienes y servicios, preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. 10 de Mayo de 1995.

- Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Diario Oficial de la Federación. 10 de Mayo de 1995.
- Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994. Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación. 28 de Mayo de 1996.
- Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Diario Oficial de la Federación. 10 de Mayo de 1995.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación. 27 de Septiembre de 2010.
- Pescuma, M., E. M. Hébert, F. Mozzi y G. Font de Valdez. 2010. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 141:73–81.
- Prazeres, A. R., F. Carvalho y J. Rivas. 2012. Cheese whey management: A review. *J. Environ Manage.* 110:48-68.
- Proyecto de Norma Mexicana. PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012. Sistema producto leche – alimentos – lácteos – suero de leche (líquido o en polvo) - especificaciones y métodos de prueba. Organismo nacional de normalización del COFOCALEC. 2012.
- SAGARPA. 2015. Boletín de leche Enero-Marzo 2015. Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Producción anual. México.
- Sangronis, E. y J. García. 2007. Efecto de la adición de nisina en los parámetros físicos, químicos y sensoriales del queso “telita”. *Anales. Venezolanos de Nutrición.* 20:12-16.
- SAS, Statistical Analysis System. 2006. Version 9.1.3 for Windows. SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Tunick, M. H. 2008. Whey protein production and utilization. En *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*. Onwulata, C. y P. Huth. Editorial: Blackwell publishing. USA.

- Ustok, F. I., C. Tari y S. Harsa. 2007. Effect of symbiotic relationship of *Lactobacillus bulgaricus* 77 and *Streptococcus thermophilus* 95/2 on betagalactosidase and lactic acid production. J. Biotechnol. 131:S211–S241.
- Van Hekken, D. L., M.H. Tunick, P. M. Tomasula, F. J. Molina-Corral y A. A. Gardea. 2007. Mexican Queso Chihuahua: rheology of fresh cheese. Int. J. Dairy Technol. 60:5-12.
- Wright, B. J., S. E. Zevchak, J. M. wright, y M. A. Drake. 2008. The Impact of Agglomeration and Storage on Flavor and Flavor Stability of Whey Protein Concentrate 80% and Whey Protein Isolate. J. Food Sci. 74:S17-S19.

**ESTUDIO II. FORMULACIÓN Y EVALUACIÓN DE UNA BEBIDA
FERMENTADA CON PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS ELABORADA CON
SUERO DE LECHE**

RESUMEN

Este estudio constó de varias etapas para llegar a la formulación de una bebida fermentada a base de suero de queso Chihuahua adicionada con los probióticos: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* y *Streptococcus thermophilus*. Se evaluaron sensorialmente tres mezclas de suero-leche (con las proporciones: 90/10, 80/20, 70/30 % v/v), existiendo diferencias en su aceptación ($p < 0.05$). Se eligió la 80/20 %. Posteriormente se seleccionó de entre dos prebióticos, inulina y mezcla de fosfooligosacáridos (MFO), seleccionando MFO por estimular mayormente la viabilidad de los probióticos ($p < 0.05$). Después se realizaron cinéticas de crecimiento con los probióticos empleados, en las cuales se observó un efecto sinérgico entre el Avicel® (estabilizante) y la MFO ($p < 0.05$). A continuación, se realizó la estandarización de la bebida, con la mezcla 80/20, MFO (1 %), Avicel® (0.5 %), sacarosa (9 %) y saborizante artificial (0.05 %). Posteriormente se analizó la viabilidad de 12 tratamientos variando los probióticos y con y sin prebiótico y un control carente de ambos, durante su vida en anaquel (21 d) y tomando como mínimo (1×10^6 UFC/mL), se eligieron los tres (ABC, ABT-4 y BCT-1) que mantuvieron más alta y constante su viabilidad y el control. Los cuales fueron probados en una evaluación sensorial de preferencia y ordenamiento, evaluándose los atributos de: textura, acidez, sabor y aceptabilidad general, observándose que los consumidores prefirieron la bebida control respecto a las otras ($p < 0.05$), lo cual nos indica que los consumidores prefieren la dicha bebida sin probióticos.

ABSTRACT

It was formulated a fermented beverage of Chihuahua cheese whey with probiotics: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Streptococcus thermophilus*. Firstly, mixes whey/milk (proportions: 90/10, 80/20, 70/30 % v / v) were evaluated sensory and there were differences in their acceptance ($p < 0.05$). The mix 80/20 % was chosen. Secondly, two prebiotics (inulin and mixtures of phospho-oligosaccharides (MFO) were assessed. MFO was selected as it stimulated the viability of the probiotics ($p < 0.05$). The growth kinetics exposed a synergism between Avicel® (stabilizer) and MFO ($p < 0.05$). The final formulation of the beverage was as follows: 80/20 whey/milk, MFO (1 %), Avicel® (0.5 %), sucrose (9 %) and artificial flavouring (0.05 %). Afterwards, the viability of 12 treatments was evaluated for 21 d, varying the probiotics, prebiotic (with and without it) and a control group, which was free of both ingredients. The minimum level of probiotics accepted was 1×10^6 CFU/mL. Only three groups (ABC, ABT-4 y BCT- 1) and the control were chosen, as they had the highest and the most constant. These four treatments were evaluated sensory in terms of; texture, acidity, flavour and overall acceptance. The consumers preferred the control beverage over the others ($p < 0.05$), which indicates that consumers preferred the beverage without probiotics.

INTRODUCCIÓN

La leche es el líquido producido por las glándulas mamarias de los mamíferos y es regularmente consumida por los humanos desde hace cientos de años como un alimento importante en su dieta (Li y Drake, 2015). El suero de queso es la parte líquida de la leche que se obtiene después de la separación de la cuajada o caseína durante la elaboración del queso. Su composición varía en función de la leche utilizada, el tipo de queso del cual proviene, el método de coagulación y de las condiciones de procesamiento (PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012). Puede ser dulce o ácido según el pH que presente y esto es debido al tipo de queso del cual se separe (Tunick, 2008). El suero constituye cerca del 85-90 % del volumen de la leche usado para la elaboración del queso (Pescuma *et al.*, 2010). El suero dulce se obtiene de proceso de elaboración de quesos tipo Cheddar, como el queso Chihuahua y tienen un pH mayor a 5.6 (Tunick, 2008). Se estima que el suero dulce, está conformado aproximadamente por 7 % de sólidos totales de los cuales 74 % es lactosa, 10-12 % son proteínas, 8 % son minerales, 3 % es grasa y 1-3 % ácido láctico (Tunick, 2008).

El queso Chihuahua es un queso prensado, de pasta semidura a blanda, sometido a maduración mediante microorganismos, bajo condiciones de tiempo, temperatura y humedad controladas (NOM-121-SSA1-1994). Es uno de los principales quesos producidos en el Norte de México y es una variante de queso Cheddar joven (Van Hekken *et al.*, 2007).

Por otra parte, en la actualidad los consumidores demandan alimentos que además de cumplir con su objetivo primordial nutricional aporten beneficios

a la salud. Los alimentos o nutrientes que permiten un cambio fisiológico benéfico en el cuerpo son llamados alimentos funcionales, tal es el caso de los alimentos adicionados con probióticos y prebióticos (Duggan *et al.*, 2002; Drgalic *et al.*, 2005). Los probióticos son microorganismos vivos que aportan un beneficio a la salud del consumidor (Allgeyer *et al.*, 2010; Nakamura y Omaye, 2012) proporcionándole un balance en la microflora del intestino, además de diversos beneficios: al sistema gastrointestinal, donde ayudan a asimilar la lactosa, prevenir infecciones y diarreas, cáncer de colon y estabilizar la barrera mucosal del intestino; a nivel cardiovascular, por ayudar a disminuir la presión arterial y tener un efecto hipocolesterolémico; y en el sistema inmune al reforzar las defensas contra infecciones intestinales (Vinderola y Reinheimer, 1999; Kailasapathy y Chin, 2000). Por otra parte, los prebióticos son alimentos no digeribles por el consumidor pero si por los probióticos en el intestino grueso con ello beneficiando el crecimiento y/o actividad de uno o un limitado número de especies probióticas (Drgalic *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2010). Cuando los probióticos y prebióticos son combinados ejercen una relación simbiótica, al aumentar la tasa de sobrevivencia de los probióticos proporcionando beneficios adicionales al consumidor (Allgeyer *et al.*, 2010). Los microorganismos más usados como probióticos son las bacterias ácido lácticas (BAL), principalmente los lactobacilos (Hözer y Kirmaci, 2009). Las BAL son microorganismos Gram positivos, anaerobios aerotolerantes, no esporuladas, ácido tolerantes y estrictamente fermentativos que producen ácido láctico como principal producto. Basado en el metabolismo de los carbohidratos, las BAL, se dividen en dos grupos: a) homofermentativas, las cuales utilizan la ruta de Embden-Meyerhof

para transformar su fuente de carbono en ácido láctico, como algunos *Streptococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. y b) heterofermentativas, usan la ruta de las fosfocetalosas y adicionalmente al ácido láctico también producen etanol, CO₂ ó acetato como algunos *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp. (Vasiljevic y Shah, 2008).

Para que los microorganismos probióticos lleven a cabo su efecto benéfico en el organismo deben mantenerse viables hasta el colón en cuentas que asciendan 1×10^6 UFC/mL (Hözer y Kirmaci, 2009) y para considerar que ejerzan un efecto terapéutico el consumo mínimo de probióticos por día debe oscilar entre 10^8 - 10^9 UFC/mL (Tharmaraj y Shah, 2003).

Una bebida láctea fermentada puede definirse como una mezcla de leche con cultivos microbianos y otros productos lácteos (Castro *et al.*, 2009). Las leches fermentadas son los alimentos mayormente usados y preferidos por los consumidores como vehículos para los probióticos (Cruz *et al.*, 2012). Así mismo, en diversos estudios han comprobado que al adicionar prebióticos a las bebidas lácteas fermentadas se lograron potenciar y/o mantener la viabilidad de los probióticos durante su vida en anaquel de los productos (Allgeyer *et al.*, 2010; Ranadheera *et al.*, 2010).

El suplementar el suero con probióticos y prebióticos representa una excelente opción para dar valor agregado a las bebidas lácteas (Castro *et al.*, 2013), esto debido al valor nutricional de las proteínas sericas, a su contenido de vitaminas, minerales y ácidos grasos, además de ser una alternativa para utilizar el suero generado durante la elaboración del queso, el cual es un potente contaminante cuando es desechado (Silveira *et al.*, 2015).

Con la finalidad de que sea aprovechado el suero generado como subproducto en la elaboración de queso Chihuahua, se plantea crear una alternativa para su uso en la industria quesera. Por lo cual el objetivo del presente estudio, fue formular, elaborar y evaluar una bebida láctea funcional con probióticos y prebióticos preparada a base de suero de queso Chihuahua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Área de Estudio

El presente estudio se efectuó del día 5 de Septiembre del año 2011 al día 10 de Octubre del año 2013, con el objetivo de formular, elaborar y evaluar una bebida láctea funcional a base de suero fermentada con microorganismos probióticos, así como monitorear su viabilidad durante la vida en anaquel, según la estrategia experimental mostrada en la Figura 2. Dichos experimentos fueron realizados en los laboratorios de Microbiología, Nutrición y Bioquímica de la Facultad de Zootecnia y Ecología y en el laboratorio de alimentos II de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

Obtención del Suero de Queso Chihuahua

Para cada uno de las pruebas elaboradas en este estudio, se prepararon diferentes volúmenes de suero, mediante el siguiente proceso: la leche se pasteurizó a 65 °C por 30 min, posteriormente se enfrió a 40 °C y se adicionó 0.2 g/lit de cloruro de calcio (CaCl_2). Se mantuvo a temperatura constante de 37 °C y se agregó el cultivo comercial MM101 (Danisco México S.A de C.V.), el cual contiene tres cepas: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovariedad *diacetylactis*. Una vez inoculada la leche, se adicionó renina de fuerza 1: 35 000 lt (CHR HANSEN de México S.A. de C.V.). Se dejó reposar 30 min a 37° para que se formara el coágulo y se procedió a cortar en cubos de aproximadamente 1 cm³. Una vez cortada la cuajada se calentó con agitación hasta alcanzar la textura adecuada y se desueró (Figura 3).

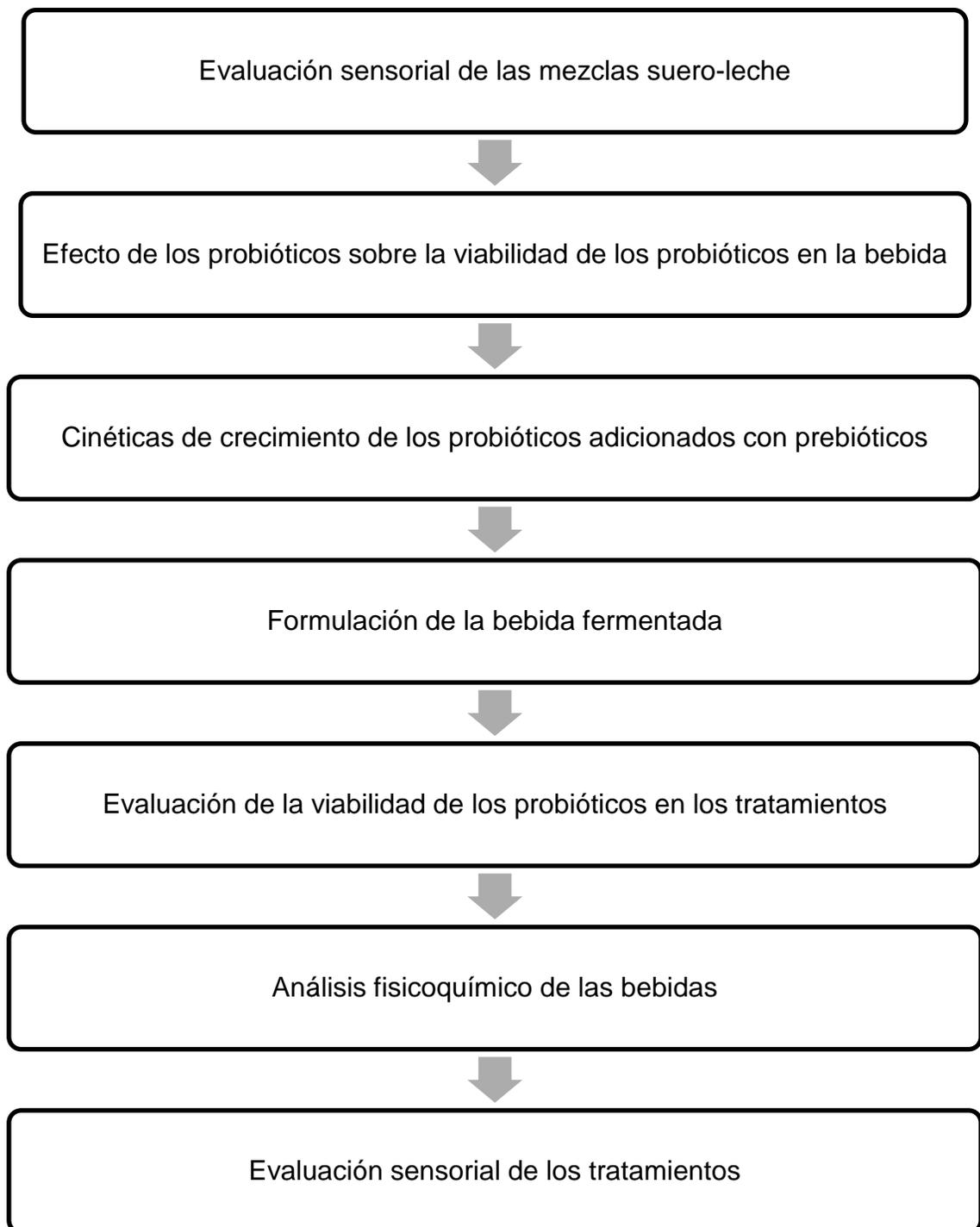


Figura 2. Estrategia experimental para la formulación y evaluación de la bebida fermentada.



Figura 3. Diagrama de elaboración de suero de queso Chihuahua.

Evaluación Sensorial de las Mezclas Suero-Leche

Para evaluar la aceptación de las bebidas, se realizó una prueba afectiva (Apéndice 1) con 64 consumidores de entre 16 a 60 años según Anzaldúa-Morales, (2005). Los consumidores fueron preseleccionados descartando a los fumadores, intolerantes a la lactosa y personas con aditamentos dentales metálicos. Las tres bebidas se les presentaron a todos panelistas a una temperatura de 4 °C, y en un volumen de 25 mL por muestra, pidiéndoles que las evaluaran de izquierda a derecha, para lo cual se alternó el orden de presentación de las muestras para evitar el “error de tiempo”, además de asignárseles códigos aleatorios de cuatro dígitos a las mismas, para no agregar error por efecto de la codificación. Las evaluaciones se realizaron en un horario de 10 am a 12 pm del día. Se probaron tres diferentes mezclas suero-leche (70, 80 ó 90 % de suero y el resto respectivo de leche). Las bebidas fueron elaboradas con el cultivo BCT-1 (CHR HANSEN de México S.A. de C.V.) por ser de rápida fermentación y aroma suave, para esto se incubaron las mezclas por 12 h a 37 °C y una vez transcurrida la fermentación se adicionó el 9 % de edulcorante (sacarosa) y 0.05 % de saborizante artificial de mora (Alimentos y Nutrición S.A. de C.V.).

Efecto de los Prebióticos Sobre la Viabilidad de los Probióticos en la Bebida

Con el fin de elegir un prebiótico (inulina o MFO) que estimulara mayormente el crecimiento de cada uno de los probióticos, para lo cual, se prepararon las bebidas por triplicado con la mezcla elegida de suero-leche 80-20 % (v/v). Se adicionó 1 % del prebiótico correspondiente y se inocularon los

probióticos por separado: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* o *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (CHR HANSEN de México S.A. de C.V.). Se incubaron por 12 h a 37 °C, después se adicionó 9 % de edulcorante (azúcar refinada) y 0.05 % de saborizante artificial de mora (Alimentos y Nutrición S.A. de C.V.), mismos que fueron cuantificados según Vinderola y Rehinheimer, (2000), en las siguientes condiciones: *Lactobacillus acidophilus* en agar MRS-B (Man Rogosa Sharpe adicionado con 0.15 % p/v de bilis) en condiciones aeróbicas, *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* en agar MRS-LP (MRS adicionado con 0.2 % p/v de cloruro de litio más 0.3 % p/v de propianato de sodio) en condiciones de carboxifilia, todos incubados a 37 °C durante 24 h. Todos los conteos se realizaron por duplicado y se seleccionaron las placas que contenían entre 15 y 150 colonias.

Cinéticas de Crecimiento de los Probióticos Adicionados con Prebióticos

Con el fin de observar el comportamiento de los probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* o *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) en presencia de diferentes prebióticos (inulina o MFO, ambos marca alimentos y nutrición S.A. de C.V.) y el estabilizante Avicel BV-1518® (FMC) conformado por: caroximetilcelulosa de sodio, celulosa microcristalina, sucrosa y CaCl₂ se realizaron las cinéticas de crecimiento por triplicado en un microlector de placas (BIOTEK EL-808, USA) a 630 nm. En las microplacas se depositaron 200 µL por pozo, y se fijaron las siguientes condiciones de incubación: 37 °C por 24 h tomando lecturas las primeras 12 h cada 30 min (ya que durante las primeras horas se observan mayormente las diferencias entre tratamientos) y las 12 h restantes en intervalos de 60 min. Antes de cada lectura

se homogenizó la microplaca con agitación correspondiente al equipo como lenta durante 5 segundos. Se realizaron soluciones primarias en tubo de ensaye en caldo MRS para cada tratamiento, donde los probióticos fueron inoculados al 0.5 % (p/v) y se les adicionó a cada tratamiento 1 % de los prebióticos o bien 0.5 (p/v) del estabilizante. Ya que era posible un efecto sinérgico del Avicel® y la MFO, se agregó una mezcla de ambos a cada uno de los probióticos y un control, mismo que no contenía prebióticos ni estabilizante (Cuadro 1), las concentraciones empleadas de los probióticos y prebióticos fueron las mismas establecidas en la formulación de la bebida con el fin de estudiar el comportamiento de los probióticos en presencia de los diferentes prebióticos.

Las densidades ópticas registradas fueron analizadas con el software DMFit versión 2.0 (Norwich, UA) mismo que se basa en la ecuación desarrollada por Baranyi y Roberts, (1994). La cual, analiza el crecimiento de los microorganismos descritos por una curva sigmoidea, caracterizada por su forma de “S”, es decir, crecimiento inicial lento, luego se acelera exponencialmente, para sufrir una desaceleración y llegar a la declinación o muerte. Los parámetros analizados en las curvas sigmoideas fueron: rate (máximo potencial de crecimiento), lag (constante de ambientación o proceso de adaptación de la bacteria), yo (punto inicial de la curva sigmoidea), yend (punto final de la curva sigmoidea) y R^2 (Coeficiente de ajuste a la ecuación).

Formulación de la Bebida Fermentada

La elaboración de las bebidas el suero se obtuvo según el procedimiento mostrado en la Figura 2. El procedimiento se indica en la Figura 4. Para lo cual,

Cuadro 1. Porcentajes de adición de los prebióticos en las soluciones primarias para evaluar las cinéticas de crecimiento de diferentes probióticos

Prebióticos	Probióticos		
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium lactis</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
Inulina	1.0 %	1.0 %	1.0 %
Fosfooligosacáridos	1.0 %	1.0 %	1.0 %
Avicel®	0.5 %	0.5 %	0.5 %
Fosfooligosacáridos + Avicel®	1.0 %+0.5 %	1.0 %+0.5 %	1.0 %+0.5 %
Control	---	---	---

*Avicel®: Celulosa microcristalina, Sucrosa, CMC-Na y CaCl₂.

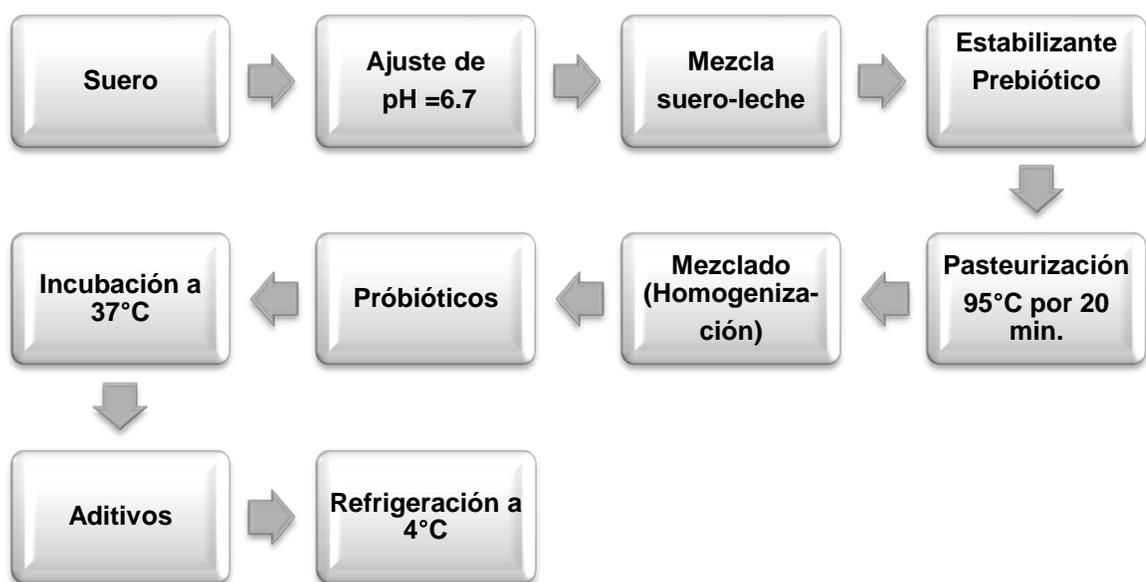


Figura 4. Proceso de elaboración de las bebidas fermentadas a base de suero.

se ajustó el pH a 6.7 con Hidróxido de Calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) al 10 % (v/v), se procedió a realizar la mezcla suero-leche 80-20 % (v/v), se separaron los lotes para adicionar el estabilizante Avicel® 0.5 % (p/v) y los prebióticos 1 % (p/v) en el caso de las bebidas que los contenían. Después se les dio un tratamiento térmico a las mezclas de 95 °C / 20 min, (con la finalidad de desnaturalizar las proteínas del suero para que se incorporaran las caseínas adicionadas en la leche y con ello retener mayor cantidad de agua) y se homogenizaron las unidades experimentales. Para lo cual se tomaron 400 mL y se mezclaron por 2 min a velocidad 8 en una licuadora (Osterizer modelo 6663-13 de 60 Hz). Posteriormente se adicionaron los probióticos 0.5 % (p/v) correspondientes a cada tratamiento excepto el control (sin probióticos). Se incubaron a 37 °C hasta alcanzar un pH=4.5, se usó un potenciómetro electrónico (Thermo scientific modelo A09683), según la metodología de la AOAC 981.12. (1998). Una vez alcanzado el pH, se adicionaron los aditivos: sacarosa (edulcorante) 9 % (p/v), saborizante artificial 0.05 % (v/v) y se refrigeraron a 4 °C durante su vida en anaquel. La formulación de las bebidas se resume en el Cuadro 2.

Evaluación de la Viabilidad de los Probióticos en los Tratamientos

Se llevaron a cabo 12 diferentes tratamientos de las bebidas con distintas mezclas de los probióticos, solo seis de ellos contenían el prebiótico MFO, y un control sin probióticos ni prebióticos (Cuadro 3). El análisis de viabilidad de cada uno de los tratamientos se llevó a cabo por medio de cuenta en placa según Vinderola y Rehinheimer (2000), se usaron los agares SMA (Skim Milk Agar), MRS-B y MRS-LP, específicamente *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus*

Cuadro 2. Formulación de bebidas fermentadas con probióticos elaboradas a base de suero

Componente	Porcentaje (%)	Referencia
Suero leche	80.0-20.0	González-González, 2002 – Miranda <i>et al.</i> , 2007
Probióticos	0.5	Allegeyer <i>et al.</i> , 2010 - Nielsen <i>et al.</i> , 2009
Prebióticos	1.0	Gustaw <i>et al.</i> , 2011 – Aryana <i>et al.</i> , 2007
Estabilizante*	0.5	Allgeyer <i>et al.</i> , 2010
Edulcorante**	9.0	Tripathi y Jha, 2004 – Tranjan <i>et al.</i> , 2009
Saborizante	0.05	-----

*Avicel® (FMC): Celulosa microcristalina, Sucrosa, CMC-Na y CaCl₂. **Azúcar refinada.

Cuadro 3. Descripción de tratamientos y agares usados para la evaluación de viabilidad de los probióticos

Tratamientos	Probióticos	Prebióticos	Agares
1	A	MF	SMA, MRS-B
2	B	MF	SMA, MRS-LP
3	C	MF	SMA, MRS-LP
4	ABC	MF	SMA, MRS-B, MRS-LP
5	BCT-1	MF	SMA, MRS-LP
6	ABT-4	MF	SMA, MRS-B, MRS-LP
7	A	-----	SMA, MRS-B
8	B	-----	SMA, MRS-LP
9	C	-----	SMA, MRS-LP
10	ABC	-----	SMA, MRS-B, MRS-LP
11	BCT-1	-----	SMA, MRS-LP
12	ABT-4	-----	SMA, MRS-B, MRS-LP
13	CONTROL	-----	SMA

A: Lactobacillus acidophilus, B: Bifidobacterium lactis, C: L. paracasei subsp. paracasei, T: Streptococcus thermophilus marca CHR HANSEN de México S.A. De C.V. SMA: Skim Milk Agar. MRS-B: Man Rogosa Sharpe adicionado con bilis. MRS-LP Man Rogosa Sharpe adicionado con cloruro de litio y propianato de sodio, MF: Mezcla de fosfoligosacáridos.

paracasei subsp. paracasei fueron cuantificados en una sola caja de agar MRS-LP en condiciones de carboxifilia, no obstante las colonias son diferenciables

por su morfología colonial macroscópica. Todos los probióticos usados en los tratamientos son cultivos comerciales de la marca CHR HANSEN de México S.A. De C.V. y solamente el ABC, es una mezcla del A, B y C por separado. Todas las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h, monitoreándose la viabilidad durante su vida en anaquel a los 0, 7, 14 y 21 d. Los conteos se realizaron por duplicado, seleccionándose las placas que contenían entre 15 y 150 colonias (NOM-092-SSA1-1994).

Análisis Fisicoquímico de las Bebidas

Se evaluaron cada uno de los 12 tratamientos y el control por triplicado para los siguientes parámetros: humedad, por pérdida de volumen (NOM-116-SSA1-1994); lactosa, por titulación (NOM-155-SCF1-2012); grasa, por el método butirométrico de Gerber (NOM-155-SCF1-2012); proteína, por el método de Kjeldahl (NOM-155-SCF1-2012); y acidez, por titulación (NOM-155-SCF1-2012).

Evaluación Sensorial de los Tratamientos

Con base a los resultados de viabilidad, se seleccionaron los tratamientos números: 10, 11, 12 y el 13 (BCT-1, ABC, ABT-4 y el control), ya que estos fueron los que obtuvieron mayor viabilidad de los probióticos durante la vida en anaquel. Como el prebiótico no tuvo efecto sobre el crecimiento de los probióticos, se decidió no emplearlo en la formulación de la bebida. Se realizó una prueba de preferencia y ordenamiento con 81 consumidores de entre 18 a 51 años de edad, los cuales fueron preseleccionados descartando a los fumadores, intolerantes a la lactosa y personas con aditamentos dentales metálicos. Las cuatro bebidas se les presentaron a todos panelistas a una

temperatura de 4°C, y en un volumen de 25 mL por muestra, pidiéndoles que las evaluaran de izquierda a derecha, para lo cual se alternó el orden de presentación de las muestras para evitar el “error de tiempo”, además de asignárseles códigos aleatorios de cuatro dígitos a las mismas, para no agregar error por efecto de la codificación. Las evaluaciones se realizaron en un horario de 10 am a 12 pm del día. Se realizó un análisis de cuatro atributos medidos asociando la frecuencia de consumo de bebidas lácteas fermentadas de los panelistas. Para la prueba de preferencia (Apéndice 2) se empleó una escala hedónica no escalonada del 0 al 9 evaluándose los atributos de acidez, textura, sabor y aceptabilidad general según Hekmat y McMahon (1992).

Análisis Estadístico

Todos los análisis se realizaron en el paquete estadístico SAS (2006).

Evaluación sensorial de las mezclas, efecto del prebiótico sobre el probiótico en la bebida y análisis proximal de las bebidas. Para la evaluación sensorial de las mezclas y el análisis proximal de las bebidas se llevó a cabo un análisis de varianza con el procedimiento ANOVA con comparación múltiple de medias con la instrucción TUKEY. Para evaluar el efecto de los prebióticos sobre los probióticos en la bebida; se ajustó un modelo lineal general con el método de mínimos cuadrados correspondientes a los procedimientos GLM con LSMEANS, de cada uno de los probióticos por separado. Se usaron como variables clasificatorias los tratamientos, y como variables de respuesta la calificación del panelista, la viabilidad obtenida y los porcentajes obtenidos, respectivamente para cada uno de los análisis realizados. Considerando el siguiente modelo:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

y_{ij} = variable de respuesta en la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento.

μ = media general.

τ_i = efecto fijo del i-ésimo tratamiento.

ε_{ij} = error aleatorio distribuido en forma normal con media cero y varianza, donde $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$.

Cinéticas de crecimiento de los probióticos adicionados con prebióticos. Para este análisis se usó la ecuación descrita por Baranyi y Roberts (1994); y una vez ajustados los datos a la ecuación, se analizaron los datos empleando los procedimientos GLM con un MANOVA y LSMEANS, haciendo comparación de medias por TUKEY. Se usaron como variables clasificatorias los tratamientos y las tres repeticiones, y como variables de respuesta, los parámetros de las cinéticas: rate, lage, y_0 , y_{end} y R^2 . El modelo utilizado fue el mismo al descrito previamente.

Evaluación de la viabilidad de los probióticos en los tratamientos.

Se usó el procedimiento MIXED, considerando un diseño en bloques (tres lotes) al azar con mediciones repetidas a través del tiempo, Se usaron como variables clasificatorias los tratamientos, y como variables de respuesta los conteos de viabilidad. Considerando el siguiente modelo:

$$y_{ijkl} = \mu + \tau_i + D_j + (\tau D)_{ij} + \beta_k + \rho_{(ij)} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

y_{ijkl} = variable de respuesta medida a través del tiempo.

μ = media general.

τ_i = efecto fijo del i -ésimo tratamiento.

D_j = efecto del j -ésimo día (0, 7, 14, 21).

$(\tau D)_{ij}$ = efecto fijo de la interacción entre el i -ésimo tratamiento y el j -ésimo día.

β_k = efecto aleatorio del k -ésimo bloque.

$\rho_{(ij)}$ = efecto aleatorio de la j -ésima unidad experimental, anidado en el i -ésimo tratamiento.

ε_{ij} = error aleatorio distribuido en forma normal con media cero y varianza, donde $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$.

Evaluación sensorial de los tratamientos. Para evaluar la prueba de preferencia, se utilizó el procedimiento MIXED, se usaron como variables clasificatorias los tratamientos y los panelistas, y como variables de respuesta los atributos (acidez, textura, sabor y aceptabilidad general). Considerando el siguiente modelo:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + D_j + (\tau D)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

y_{ij} = variable de respuesta (atributo medido) en la j -ésima repetición (panelista) del i -ésimo tratamiento

μ = media general.

τ_i = efecto fijo del i -ésimo tratamiento.

D_j = efecto del j -ésimo panelista

$(\tau D)_{ij}$ = efecto fijo de la interacción entre el i -ésimo tratamiento y el j -ésimo panelista.

ε_{ij} = error aleatorio distribuido en forma normal con media cero y varianza, donde $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$.

Respecto a la prueba de ordenamiento, se realizó una prueba de Chi-cuadrada de Person, usando la instrucción CHISQ MEASURES. Considerando lo siguiente:

$$H_0: p_1=p_2=p_3=p_4$$

H_a : por lo menos una p_i es diferente de $\frac{1}{4}$

Donde:

p_i = probabilidad de que el panelista elija la bebida i en el caso de $i = 1, 2, 3$ y 4.

Con el estadístico de prueba chi-cuadrada como:

$$X^2 = \sum \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Donde:

X^2 = Valor calculado de chi-cuadrada.

O_i = Valor observado (elegido por cada panelista).

$E_i = np_i$ = Valores esperados en igual proporción para cada bebida.

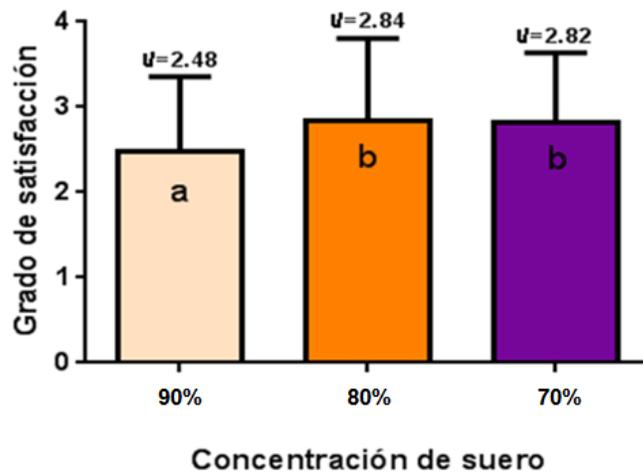
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación Sensorial de las Mezclas Suero-Leche

En el análisis sensorial efectuado para evaluar la aceptación de las tres diferentes mezclas suero leche (70, 80 ó 90 % de suero y el resto respectivo de leche) se detectaron diferencias entre la aceptación de las mismas ($p=0.036$). Las cuales, fueron dadas entre el tratamiento con 90 % de suero, respecto a los otros dos (70 y 80 % de suero). Las bebidas con 90 % suero fueron menormente aceptadas por los panelistas, y entre las dos restantes, no se observó diferencia en la aceptación (Gráfica 5). Lo anterior coincide con González-González (2002), quienes al evaluar sensorialmente bebidas fermentadas a base suero- leche observaron que los panelistas prefirieron las bebidas con menor porcentaje de suero. Para la formulación de la bebida se eligió la mezcla con 80 % de suero, ya que el objetivo de este estudio fue maximizar el uso del mismo, aunque la de 70 % de suero fuera igualmente aceptada.

Efecto del Prebiótico sobre el Probiótico en la Bebida

Se evaluaron por separado los efectos de cada prebiótico con los tres diferentes probióticos (Cuadro 4). En el caso de los lactobacilos, se observó diferencia entre el efecto de los prebióticos (inulina o MFO), para *L. acidophilus* ($p=0.0002$) y *L. paracasei* subsp. *paracasei* ($p=0.0226$), en ambos casos la MFO estimuló más su crecimiento. En el caso de *Bifidobacterium lactis* no existió diferencia significativa entre el uso de los dos prebióticos ($p=0.2042$). Los cuales difieren en su estructura química considerablemente, pues la inulina es un polisacárido de fructosa y la MFO, son polisacáridos fosforados (Angus et



Gráfica 5. Aceptación sensorial de diferentes mezclas fermentadas de suero leche (70, 80 ó 90 % de suero y el resto respectivo de leche). ^{ab} Literales diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

Cuadro 4. Efecto de dos prebióticos, sobre la viabilidad de los probióticos

Probióticos	Prebióticos	
	Inulina	Fosfooligosacáridos
	Log UFC/mL	Log UFC/mL
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	8.05 ± 0.27 ^a	8.96 ± 0.85 ^b
<i>Bifidobacterium lactis</i>	7.97 ± 0.61 ^a	8.56 ± 0.79 ^a
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	6.63 ± 0.53 ^a	7.98 ± 0.27 ^b

^{ab}Literales diferentes en un mismo renglón, indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

al., 2005). Por lo cual, los probióticos metabólicamente actúan diferente con cada uno como en los siguientes casos: Allgeyer *et al.*, (2010), observaron diferencias en el crecimiento de probióticos al emplear los prebióticos: inulina, polidextrosa y fibra soluble de maíz en sus bebidas fermentadas, así como también el efecto fue distinto para los lactobacilos respecto a las bifidobacterias, no obstante, observaron mayor viabilidad al adicionar la polidextrosa. Por otra parte, Bedani *et al.*, (2013), al probar los prebióticos, inulina y okara, en bebidas fermentadas con lactobacilos y bifidobacterias, no lograron estimular el crecimiento de los mismos con ninguno. Por lo cual, aunque se espera un efecto simbiótico al combinar prebióticos y probióticos, depende del metabolismo de estos últimos para observar dicho efecto (Allgeyer *et al.*, 2010). Es decir, bioquímicamente las diferencias en la viabilidad de los microorganismos ante la estimulación con diferentes prebióticos, corresponde al metabolismo de cada uno de ellos aunque *Bifidobacterium lactis* y *L. paracasei* subsp. *paracasei* son heterofermentativos y *L. acidophilus* son homofermentativos (Axelsson, 2004). Para poder definir con exactitud la afinidad por determinado sustrato se tendría que hacer un análisis de biología molecular (FISH) para primeramente definir las enzimas que participan en el metabolismo de los carbohidratos de cada una de las cepas empleadas y posteriormente exponerlas a los diferentes prebióticos. Lo cual, se recomienda para estudios posteriores. No obstante, es sabido que el efecto de determinado prebiótico es diferente según el probiótico empleado, el o los sustratos presentes y las condiciones de incubación (Akalin *et al.*, 2007).

En este experimento se potenció más el crecimiento de ambos lactobacilos empleados con el uso de la MFO, por ello se eligió el uso de este prebiótico en las bebidas para la evaluación de la viabilidad de los probióticos en los distintos tratamientos.

Se tenía contemplado en la metodología de la elaboración de la bebida, el uso de un homogenizador para unificar el tamaño de partículas de la mezcla suero leche y con ello prolongar la vida en anaquel (28 d) de la bebida evitando la sinéresis. No obstante, el equipo se dañó y se tuvo que contemplar la adición del estabilizante Avicel® (FMC) compuesto de: celulosa microcristalina, sucrosa, carboximetilcelulosa de sodio y CaCl₂. Sin embargo, con la adición de este nuevo componente no se tenía contemplado que los probióticos elegirían los componentes del Avicel® para estimular su crecimiento, en lugar de la MFO. Con el objetivo de determinar si los probióticos eligían el Avicel® como prebiótico en vez de la MFO, se realizaron cinéticas de crecimiento.

Cinéticas de Crecimiento de los Probióticos Adicionados con Prebióticos

Se realizaron cinéticas de crecimiento de los probióticos (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*), usando la ecuación desarrollada por Baranyi y Roberts (1994), empleando una curva sigmoidea en ausencia y presencia de los distintos prebióticos (inulina, MFO y Avicel®). Se observaron diferencias significativas en los parámetros analizados: velocidad máxima de crecimiento (rate), fase lag (lag), punto inicial de la curva (y_0), punto final de la curva (y_{end}) y R^2 de las curvas de crecimiento entre los diversos prebióticos y probióticos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Parámetros estimados en las curvas de crecimiento de tres probióticos con distintos prebióticos

Prebióticos	Rate	Lag	Y_o	Y_{end}	R²
<i>L. acidophilus</i>					
Control	0.002±0.00 ^{bc}	268.3±67.42 ^b	0.570±0.15 ^e	0.993±0.11 ^d	0.982±0.03 ^a
Inulina	0.001±0.00 ^c	258.4±67.42 ^b	1.291±0.15 ^{bcd}	1.682±0.11 ^{bc}	0.983±0.03 ^a
MFO	0.001±0.00 ^c	261.3±67.42 ^b	1.434±0.15 ^{bc}	1.782±0.11 ^{abc}	0.961±0.03 ^a
Avicel®	3x10 ⁻⁴ ±0.00 ^d	613.1±82.58 ^a	1.810±0.18 ^{ab}	1x10 ⁻⁴ ±0.00 ^e	0.652±0.03 ^e
Avicel®-MFO	0.002±0.00 ^{ab}	0.000±82.58 ^b	1.401±0.18 ^{bcd}	1.692±0.13 ^{bc}	0.770±0.03 ^{dc}
<i>Bifidobacterium lactis</i>					
Control	0.003±0.00 ^{ab}	2x10 ⁻⁵ ±0.00 ^b	0.775±0.15 ^{de}	1.971±0.11 ^{abc}	0.991±0.03 ^a
Inulina	0.002±0.00 ^{ab}	1x10 ⁻⁵ ±0.00 ^b	1.023±0.15 ^{cde}	2.100±0.11 ^{ba}	0.990±0.03 ^a
MFO	0.002±0.00 ^{ab}	3x10 ⁻⁵ ±0.00 ^b	1.152±0.15 ^{cde}	2.134±0.11 ^{ba}	0.993±0.03 ^a
Avicel®	0.001±0.00 ^c	1x10 ⁻⁵ ±0.00 ^b	1.601±0.25 ^{bc}	1.823±0.18 ^{abc}	0.704±0.04 ^{de}
Avicel®-MFO	0.003±0.00 ^a	1x10 ⁻⁵ ±0.00 ^b	1.080±0.15 ^{cde}	1.513±0.11 ^c	0.920±0.03 ^{ab}
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>					
Control	-0.002±0.00 ^e	223±116.78 ^b	2.264±0.25 ^a	2.073±0.18 ^{ab}	0.661±0.04 ^e
Inulina	-0.002±0.00 ^e	143±116.78 ^b	2.423±0.25 ^a	2.242±0.18 ^a	0.822±0.04 ^{bc}
MFO	0.003±0.00 ^a	0.000±67.42 ^b	1.201±0.15 ^{bcd}	1.790±0.11 ^{abc}	0.983±0.03 ^a
Avicel®	-0.002±0.00 ^e	223.1±116.78 ^b	2.260±0.25 ^a	2.071±0.18 ^{ab}	0.661±0.04 ^e
Avicel®-MFO	0.002±0.00 ^{ab}	3x10 ⁻⁵ ±116.78 ^b	1.354±0.25 ^{bdc}	1.801±0.18 ^{abc}	0.930±0.04 ^a

Rate (máximo potencial de crecimiento), lag (constante de ambientación o proceso de adaptación de la bacteria), y_o (punto inicial de la curva sigmoidea), y_{end} (punto final de la curva sigmoidea), R² (Coeficiente de ajuste a la ecuación). Avicel® -FMC (Celulosa microcristalina, Sucrosa, CMC-Na y CaCl₂), MFO (Mezcla de fosfooligosacáridos). ^{abcde} Literales diferentes en un mismo renglón, indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0.05).

En “Rate” (μ_{max}), parámetro de mayor importancia a analizar, por ser el máximo potencial de crecimiento. Como se esperaba, existieron variaciones ($p < 0.05$) entre el comportamiento de los probióticos según el prebiótico usado. Incluso las diferencias ($p < 0.05$) se observaron entre los probióticos en presencia del mismo prebiótico. Para *L. acidophilus*, no existieron diferencias al adicionar inulina, MFO o ningún prebiótico (control). No obstante, al agregar Avicel® y la mezcla Avicel®- MFO, se observaron diferencias significativas, mostrando mayor crecimiento con ambos (Apéndice 3). Sin embargo, para este parámetro, no existieron diferencias en el crecimiento de *B. lactis*, al adicionar inulina, MFO o ningún prebiótico (control), únicamente mostrando menor crecimiento cuando se adicionó Avicel® solamente (Apéndice 4). Con respecto a *L. paracasei* subsp. *paracasei*, no se observó diferencia entre la adición de inulina, Avicel® o el control, ya que se observaron valores negativos, es decir, no se detectó crecimiento o bien no fue significativo para estos casos, no obstante cuando se adicionaron la MFO y la combinación Avicel® -MFO se estimuló el crecimiento de dicho probiótico (Apéndice 5). Sugiriendo, que funcionan como un prebiótico que estimula el crecimiento de *L. paracasei* subsp. *paracasei* en las condiciones dadas en dicha cinética. De manera general, se observaron diferencias al emplear el Avicel® solo y en combinación con los MFO para los tres probióticos analizados, potenciándose con la mezcla empleada, lo cual sugiere que los probióticos usan el estabilizante Avicel® y la MFO como prebiótico. En los casos donde se observan valores negativos, se pueden expresar como lisis celular, los cuales han sido reportado anteriormente por otros autores como Boutrou *et al.* (1998), en otras cinéticas con BAL.

La fase “lag”, es la constante de ambientación o proceso de adaptación de los microorganismos, y esta determinada por la concentración del inóculo y las condiciones de incubación durante la cinética (Baranyi y Roberts, 1994). En esta fase no fueron observadas diferencias significativas ni entre prebióticos ni probióticos, a excepción de *L. acidophilus* adicionado con Avicel®, mismo que presenta un periodo más largo de adaptación con respecto a los demás tratamientos y probióticos. Como se aprecia en el Cuadro 5, para la mayoría de los tratamientos existieron valores muy altos de la fase “Lag” (tardan mucho en adaptarse al medio para poder crecer), por lo cual las velocidades de crecimiento son muy lentas, en comparación con los valores altos de “rate” (μ_{max}), que es la velocidad de crecimiento específica máxima, ya que éstos valores son inversamente proporcionales como lo indican Grijspeerdt y Vanrolleghem (1999). Así mismo, Baranyi y Roberts (1994), mencionan que en células con el mismo historial de condiciones de pre-inoculación, el producto de “rate y “lag”, es una simple transformación del estado fisiológico inicial. Por lo cual, una importante consecuencia en este estudio es que se estandarizaron las condiciones de incubación y a partir de ahí se realizaron las cinéticas.

Concerniente a los parámetros “ y_o ” y “ y_{end} ”, que corresponden a los puntos iniciales y finales de las curvas sigmoideas, se observaron diferencias significativas entre los diversos probióticos y prebióticos. Resaltando que los valores iniciales más altos registrados fueron para *L. paracasei* subsp. *paracasei*, al usar inulina, Avicel® y en el control y para *L. acidophilus* con Avicel®. Lo anterior pueda deberse a que *L. paracasei*, es el único de los tres probióticos estudiados que sintetiza una proteínasa extracelular, la cual como

se mencionó con anterioridad no todas las BAL la producen. Esta proteína llamada PrtP en *L. paracasei*, acelera el proceso de proteólisis y por ende el metabolismo (Savijoki *et al.*, 2006), lo cual se ve reflejado en un crecimiento más acelerado y en un aumento en la densidad óptica. No obstante, los valores finales más bajos de todos los tratamientos de las curvas, se observaron en *L. acidophilus* con Avicel®, lo cual nos habla de que su máximo potencial de crecimiento se da al inicio de su fase de crecimiento y declinando fuertemente en comparación con los otros probióticos y prebióticos empleados.

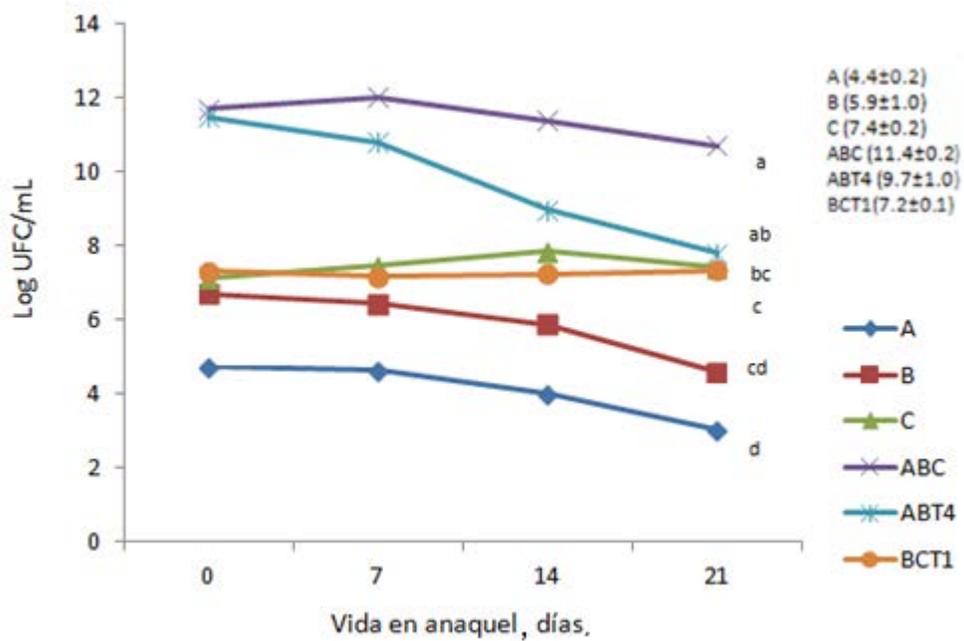
Con respecto a las R^2 (coeficiente de ajuste de regresión), se obtuvieron en general, datos que se ajustaron muy bien (obteniéndose valores mayores a 0.9) a los modelos analizados. No obstante, para el caso de *L. paracasei* subsp. *paracasei*, sin prebióticos y con Avicel® se observaron los valores más bajos de R^2 (0.66 en ambos casos). Nótese que al adicionar el Avicel® se obtuvieron coeficientes de ajuste bajos (0.65 – 0.70), para los tres probióticos empleados, ya que el Avicel® aumenta las densidades ópticas registradas por opacar las muestras, lo cual fue una limitante en la medición en éstos tratamientos, por ello que los experimentos con avicel se desarrollaron en un ensayo independiente.

Con respecto al diferente comportamiento de los probióticos en las cinéticas, puede explicarse por las características metabólicas de cada una de ellas; lo cual, es determinante para la asimilación de los nutrientes del medio (Smit *et al.*, 2005) y por ende en su comportamiento como biomasa y su densidad óptica.

Evaluación de la Viabilidad de los Probióticos en los Tratamientos

Se monitoreó la viabilidad de los probióticos en los 12 tratamientos y el control, durante su vida en anaquel (0, 7, 14 y 21 d). El control por tratarse de una bebida pasteurizada y no contener probióticos adicionados no presentó crecimiento durante la vida en anaquel, así que solo funcionó como testigo negativo de viabilidad. Existió diferencia entre tratamientos ($p < 0.05$), es decir, los probióticos crecieron en distinta medida, lo cual respalda los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, donde se observa que los probióticos difieren en su comportamiento (Gráfica 6).

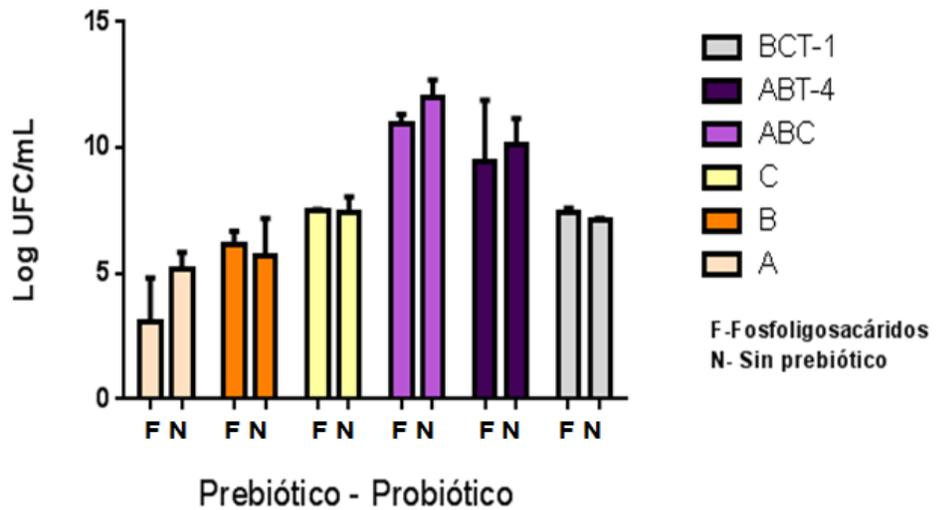
Para que los microorganismos probióticos puedan ejercer su efecto en el organismo, en el alimento antes debe de superar la concentración de 1×10^6 UFC/mL y para que su efecto sea terapéutico debe oscilar entre 10^8 - 10^9 UFC/mL, (Tharmaraj y Shah, 2003). Por ello, estas concentraciones fueron la referencia para evaluar la viabilidad de los tratamientos durante su vida en anaquel (Gráfica 6). Se observó que los tratamientos A y B no cumplieron con las concentraciones establecidas. No obstante, los restantes cuatro tratamientos (ABC, ABT-4, BCT-1 y C) lograron las cuentas requeridas para considerarse alimentos con función probiótica. De éstos, el ABC, mantuvo la mayor concentración requerida para una función terapéutica durante toda su vida en anaquel. Y para el ABT-4, solo los primeros 14 d, ya que a partir de éste día comenzó su declinación. El segundo tratamiento con la mayor viabilidad fue ABC, notándose una fuerte declinación a partir del séptimo día, no obstante mantuvo las cuentas requeridas para considerar un efecto probiótico. En los tratamientos C y BCT-1, estos mantuvieron más uniforme su concentración



Gráfica 6. Viabilidad de diversos probióticos en bebidas fermentadas durante vida en anaquel (A: *Lactobacillus acidophilus*, B: *Bifidobacterium lactis*, C: *Lactobacillus casei*, T: *Streptococcus thermophilus*).^{abcd} Literales diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

destacando a este último respecto a los restantes tratamientos analizados durante toda su vida en anaquel. Por lo anterior, se deduce que las mezclas entre los probióticos estimulan una relación simbiótica entre ellos; ya que este tipo de relaciones se dan en algunas especies probióticas, en donde uno de los microorganismos genera un metabolito específico que asimila el otro y viceversa. Esto con el fin de potenciar su crecimiento y desfavorecer el crecimiento de microorganismos contaminantes o de otras especies, o bien eliminarlos como en el caso de la producción de bacteriocinas u otros antimicrobianos, que esta bien caracterizada en algunas especies de BAL (Smit *et al.*, 2005).

La adición de la MFO en la bebidas no estimuló el crecimiento de los probióticos, es decir, que el prebiótico no tuvo efecto sobre el crecimiento de los probióticos ($p=0.77$), (Gráfica 7), esto coincide con el experimento realizado por Bedani *et al.* (2013), donde en bebidas fermentadas no lograron estimular el crecimiento de lactobacilos ni bifidobacterias adicionadas con dos prebióticos (inulina y okara). Por lo tanto se puede deducir que el efecto de cierto prebiótico sobre un probiótico en particular depende de las condiciones y el medio de fermentación y así como la composición química del prebiótico adicionado (Aryana *et al.*, 2007). En este estudio, los probióticos asimilaron los componentes del estabilizante Avicel® (Celulosa microcristalina, Carboximetilcelulosa de sodio, Sucrosa y CaCl_2), ya que los dos primeros componentes son polisacáridos que pueden ser empleados por los probióticos como prebióticos (Angus *et al.*, 2005). Esta información se puede respaldar, por los resultados obtenidos en las cinéticas realizadas anteriormente, ya que se



Gráfica 7. Efecto de la adición de dos prebióticos en la viabilidad de los probióticos en bebidas fermentadas (A: *Lactobacillus acidophilus*, B: *Bifidobacterium lactis*, C: *Lactobacillus casei*, T: *Streptococcus thermophilus*) durante vida en anaquel. No se encontraron diferencias significativas dentro de un mismo tratamiento ($p > 0.05$).

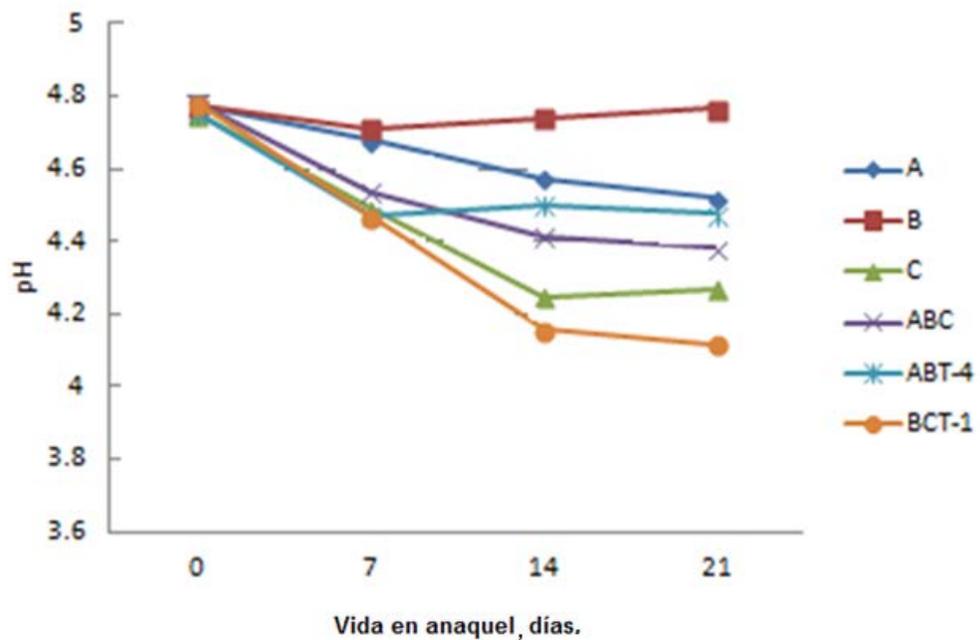
observó que en presencia del Avicel® y la MFO los probióticos potencian su crecimiento. Respecto al pH (Gráfica 8) no se encontraron diferencias ($p=0.56$) entre los tratamientos analizados. Una vez detenida la fermentación, la variación del pH durante la vida en anaerobio es muy poca, ya que el metabolismo bacteriano se hace más lento y por ende se deja de producir el ácido láctico.

Análisis Fisicoquímico de las Bebidas

Se evaluaron cada uno de los 12 tratamientos y el control por triplicado una vez terminado el proceso de fermentación de las bebidas a un $pH=4.5$, obteniéndose los siguientes promedios: humedad de 82.92 ± 1.51 ; grasa de 0.68 ± 0.13 ; proteína de 3.63 ± 0.81 ; lactosa de 4.54 ± 0.23 y acidez expresada como ácido láctico de 0.61 ± 0.09 (Cuadro 6). No se encontraron diferencias significativas para cada uno de los parámetros entre los diferentes tratamientos elaborados.

Evaluación Sensorial de los Tratamientos

En relación a la prueba de preferencia realizada a las bebidas elegidas con mayores valores de viabilidad, los resultados del análisis mixto obtenido, mostraron diferencias significativas entre tratamientos. Para el sabor, textura y aceptabilidad general, si hubo diferencias ($p<0.05$), y solo para el atributo de acidez no fueron detectadas diferencias ($p>0.05$), según lo percibido por los consumidores. No obstante, calificaron este atributo con promedios altos de 5.2 a 6.2 (Gráfica 9). Respecto a la evaluación del atributo de sabor, el control (que no contenía probióticos adicionales) fue el de mayor agrado, calificándose con un valor promedio de 7.1. El cual fue más alto respecto a los tratamientos con probióticos con promedios de 5.0 – 6.2 (Gráfica 10).

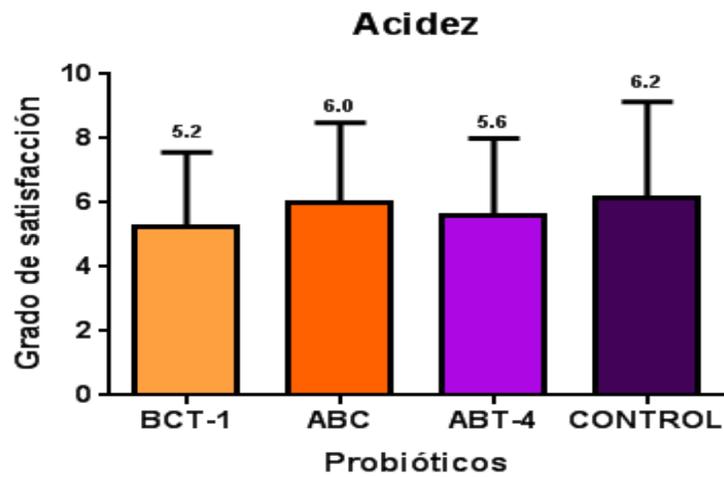


Gráfica 8. Valores de pH de bebidas fermentadas con diferentes probióticos medidos durante la vida en anaquel (A: *Lactobacillus acidophilus*, B: *Bifidobacterium lactis*, C: *Lactobacillus casei* y T: *Streptococcus thermophilus*). No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$).

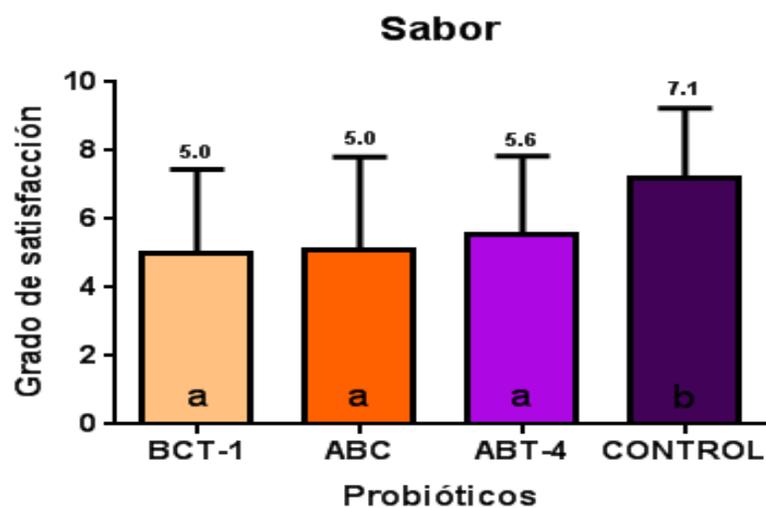
Cuadro 6. Análisis fisicoquímicos de las bebidas lácteas fermentadas elaboradas con diferentes probióticos

Parametro determinado	Procentajes estimados (%)
Humedad	82.92 ± 2.04
Grasa	0.68 ± 0.37
Proteína	3.63 ± 0.97
Lactosa	4.54 ± 2.12
Acidez	0.61 ± 0.35

Sin diferencias significativas entre las bebidas ($p>0.05$).



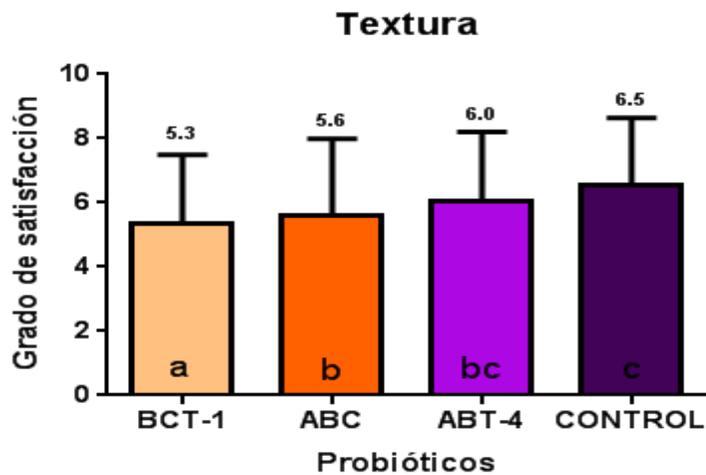
Gráfica 9. Aceptación sensorial de la acidez de bebidas fermentadas con diferentes probióticos. (A: *Lactobacillus acidophilus*, B: *Bifidobacterium lactis*, C: *Lactobacillus casei*, T: *Streptococcus thermophilus*). Sin diferencias entre las bebidas ($p > 0.05$).



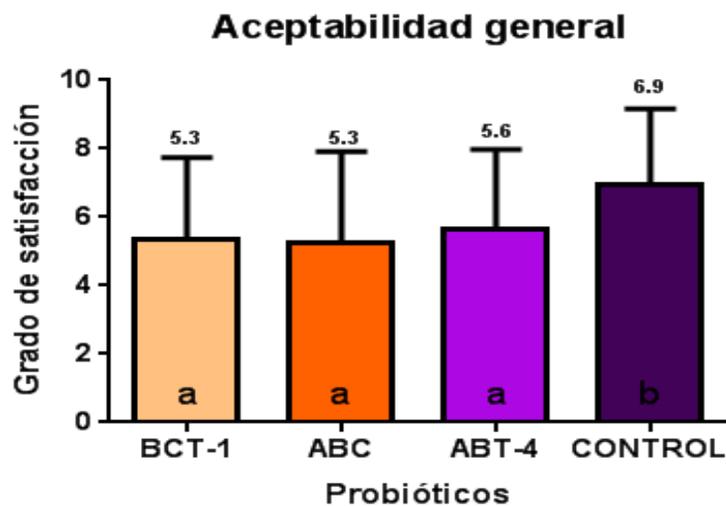
Gráfica 10. Aceptación sensorial del sabor de bebidas fermentadas con diferentes probióticos. (A: *Lactobacillus acidophilus*, B: *Bifidobacterium lactis*, C: *Lactobacillus casei*, T: *Streptococcus thermophilus*). ^{ab}Literales diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

Con relación a la textura, los panelistas calificaron con valores más altos la bebida control y la ABT-4, calificando las de 6 - 6.5 respecto a las otras con 5.3 – 5.6 en promedios generales (Gráfica 11). Referente a la aceptabilidad general la bebida control fue mayormente favorecida respecto a las tres restantes, con un promedio de 6.9 respecto al 5.5 de las restantes (Gráfica 12). Por lo cual, solo se puede deducir que los panelistas prefirieron la bebida control, respecto a las bebidas adicionadas con probióticos. Adicionalmente, a esto se les pregunto a los panelistas su frecuencia de consumo de bebidas lácteas fermentadas (Apéndice 2), para asociar si existía alguna diferencia entre la evaluación dada a los diversos atributos medidos. Sin embargo, no se encontró un efecto significativo diferenciable en este aspecto ($p>0.05$).

Respecto a la prueba de ordenamiento analizada por medio del estadístico de prueba chi-cuadrada de Person (Apéndice 6), se observó que existieron diferencias ($p<0.05$) en la elección de los panelistas al ordenar las bebidas en 1° lugar. Por lo cual, en este caso se rechazó la H_0 y se observó preferencia de los panelistas por la bebida control, ya que al calcular las proporciones muestrales, nos indican el siguiente orden: control 51.9 %, ABT4 19.8 %, BCT1 14.8 % y ABC 13.6 %. Respecto al ordenamiento de los panelistas para las bebidas en 2°, 3° y 4° lugar no existieron diferencias ($p>0.05$) en ninguno de estos casos, por lo cual se puede decir que la probabilidad de la elección de los panelista fue en la misma proporción.



Gráfica 11. Aceptación sensorial de la textura de bebidas fermentadas con diferentes probióticos. (A: *Lactobacillus acidophilus*, B: *Bifidobacterium lactis*, C: *Lactobacillus casei*, T: *Streptococcus thermophilus*).
^{abc}Literales diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$).



Gráfica 12. Aceptación sensorial de la aceptabilidad general de bebidas fermentadas con diferentes probióticos (A: *Lactobacillus acidophilus*, B: *Bifidobacterium lactis*, C: *Lactobacillus casei*, T: *Streptococcus thermophilus*). ^{ab}Literales diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Respecto a la aceptabilidad de las mezclas suero-leche, se observó mayor agrado de los consumidores hacia las más altas proporciones de suero usadas.

En la prueba del efecto del prebiótico sobre los probióticos, se eligió MFO por tener mayor efecto en dos de los tres probióticos utilizados. No obstante, una vez formulada la mezcla se observó sinéresis entre sus fases por ser una mezcla de suero-leche, por ello se adicionó un estabilizante; observándose un efecto sinérgico entre el estabilizante y la MFO.

De los resultados de viabilidad monitoreados durante los 21 d de vida en anaquel en las bebidas fermentadas, tres de ellas (ABC, ABT-4 y BCT-1) obtuvieron los valores más altos y de éstas, las cuales fueron elaboradas con mezclas de probióticos, por lo cual se sugiere un efecto sinérgico entre éstos.

Al realizar la evaluación sensorial con las tres bebidas elegidas por mantener mayor viabilidad y la muestra control (carente de prebióticos), los consumidores mostraron altos grados de satisfacción por las cuatro bebidas. Sin embargo, en sabor, textura y aceptabilidad general evaluaron con mayor calificación a la bebida no fermentada, sin observar diferencias para el atributo de acidez, lo cual, solo se debe a que los panelistas fueron no entrenados, ya que evaluaron tres bebidas fermentadas con un pH=4.5 y una bebida control no fermentada.

LITERATURA CITADA

- Akalin, A. S., S. Gonc, G. Unal y S. Fenderya. 2007. Effects of fructooligosaccharide and whey protein concentrate on the viability of starter culture in reduced-fat probiotic yogurt during storage. *Food Microbiol Safety*. 72:M222-M227
- Allgeyer, L. C., M. J. Miller y S. Y. Lee. 2010. Sensory and microbiological quality of yogurt drinks with prebiotics and probiotics. *J. Dairy Sci.* 93:4471-4479.
- Angus, F. S. Smart y C. Shortt. 2005. Prebiotic ingredients with emphasis on galacto-oligosaccharides and fructo-oligosaccharides. En *Probiotic Dairy Products*. Tamime, A. Primer ed. Editorial: Blackwell publishing. Ayr UK.
- Anzaldúa-Morales, A. 2005. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Editorial Acriba S.A. España.
- AOAC 981.12. 1998. Métodos oficiales de Análisis. Método de determinación de potencial de iones hidrógeno (pH).
- Aryana, K. J., S. Plauche, R. M. Rao, P. McGrew y N. P. Shah. 2007. Fat-free plain yogurt manufactured with inulins of various chain lengths and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Sci.* 72:M79-M84.
- Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. En *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Seppo, S., A.V. Wrigth y A. Ouwehand. Tercera edición. Editorial CRC Press. USA.
- Baranyi, J. y T. A. Roberts. 1993. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23:277-294.
- Bedani, R., E. A. Rossi y S. M. I. Saad. 2013. Impact of inulin okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in fermented soy product and probiótico survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiol.* 34:382-389.
- Boutrou, R., A. Sepulchre, J. Gripon y V. Monnet. 1998. Simple test for predicting the lytic behavior and proteolytic activity of lactococcal strains in cheese. *J. Dairy Sci.* 81: 2321-2328.
- Castro, F., T. Cunha, P. Ogliari, R. M. Teófilo Ferreira y E. Prudencio. 2009. *LWT-Food Sci. Technol.* 42:993-997.
- Castro, W. F., A. G. Cruz, M. S. Bisinotto, L. M. R. Guerreiro, J. A. F. Faria, H. M. A. Bolini, R. L. Cunha y R. Deliza. 2013. Development of probiotic dairy beverages: Rheological properties and application of mathematical models in sensory evaluation. *J. Dairy Sci.* 96:16–25.

- Cruz, G., W. F. Castro, J. F. Faria, C. B. Lollo, J. Amaya-Farfán, Q. Freitas, D. Rodríguez, C. F. Oliveira y H. Godoy. 2012. Probiotic yogurts manufactured with increased glucose oxidase levels: postacidification, proteolytic patterns, survival of probiótico microorganisms, production of organic acid and aroma compounds. *J. Dairy Sci.* 95:2261–2269.
- Cruz, K. 2010. Determinación de la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*. Tesis Doctoral. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Instituto Politécnico Nacional, México D.F.
- Drgalic, I., L. Tratnik y R. Bozanic. 2005. Growth and survival of probiotic bacteria in reconstituted whey. *EDP Sci.* 85:171-179.
- Duggan, C., J. Gannon y W. A. Walker. 2002. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 75:789-808.
- González, H. X. R. y R. J. R. González. 2002. Utilización del suero de leche para la elaboración de una bebida fermentada. Tesis de Licenciatura. Universidad EARTH. Guácimo, Costa Rica.
- Grijpspeerd, K. y P. Vanrolleghem. 1999. Estimating the parameters of the Baranyi model for bacterial growth. *Food Microbiol.* 16:593-605.
- Gustaw, W., M. Kordowska-Wiater y J. Koziół. 2011. The influence of selected prebiotics on the growth of lactic acid bacteria for bio-yoghurt production. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 10:455-466.
- Hekmat, S. y D. J. McMahon. 1992. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *J. Dairy Sci.* 75:1415-1422.
- Hözer, B. y H. A. Kirmaci. 2009. Functional milks and dairy beverages. *Int. J. Dairy Technol.* 63:1-15.
- Kailasapahty, K. y J. Chin. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidocabetrium* spp. *Inmunol Cell Biol.* 78:80-88.
- Li, X.E. y M. Drake. 2015. Sensory perception, nutritional role, and challenges of flavored milk for children and adults. *J. Food Sci.* 80:R665-R670
- Miranda, M. O., P. L. Fonseca, I. Ponce, C. Cedeño, L. S. Rivero y L. M. Vázquez. 2007. Elaboración de una bebida fermentada a partir del suero de queso. Características distintivas y control de calidad. *Rev. Cubana Aliment. Nutrit.* 17:103-108.

- Nakamura, Y. K. y S. T. Omaye. 2012. Metabolic diseases and pro- and prebiotics: mechanistic insights. *Nutr. Metab.* 9:1-9.
- Nielsen, M. S., T. Martinussen, B. Flambard, K. I. Sorensen y J. Otte. 2009. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *Int. Dairy J.* 19:155-165.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-116-SSA1-1994. Bienes y servicios. Determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico. Método por arena o gasa. Diario Oficial de la Federación. 29 de Junio de 1995.
- Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994. Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación. 28 de Mayo de 1996.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-155-SCFI-2012. Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación. 15 de Marzo del 2012.
- Pescuma, M., E. M. Hébert, F. Mozzi y G. Font de Valdez. 2010. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 141:73–81.
- Proyecto de Norma Mexicana. PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012. Sistema producto leche – alimentos – lácteos – suero de leche (líquido o en polvo) - especificaciones y métodos de prueba. Organismo nacional de normalización del COFOCALEC. 2012
- Ranadheera, R. D. C. S., S. K. Baines y M. C. Adams. 2010. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res. Int.* 43:1-7.
- SAS, Statistical Analysis System. 2006. Version 9.1.3 for Windows. SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Savijoki, K, H. Ingmer y P. Varmanen. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:394–406.
- Smit, G., B. Smit y W. Engels. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS. Microbiol. Rev.* 29:591-560.
- Tharmaraj, N. y N. P. Shah. 2003. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. *J. Dairy Sci.* 86:2288-2296.

- Tranjan, B. C., A. G. Cruz, E.H. M. Walter, J. A. F. Faria, H. M. A. Bolini, M. R. L. Moura y L. M. J. Carvalho. 2009. Development of goat cheese whey-flavoured beverages. *Int. J. Dairy Technol.* 62:438-443.
- Tripathi, V. y Y. K. Jha. 2004. Development of whey beverage with antagonistic characteristics and probiotics. *Int. J. Food Prop.* 7:261–272.
- Van Hekken, D. L., M.H. Tunick, P. M. Tomasula, F. J. Molina-Corral, y A. A. Gardea. 2007. Mexican Queso Chihuahua: rheology of fresh cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 60:5-12.
- Vasiljevic, T. y N. P. Shah. 2008. Probiotics—from metchnikoff to bioactives. *Int. Dairy J.* 18:714–728.
- Vinderola, C. G. y J. A. Rehinheimer. 1999. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yogurt bacteria. *Int. Dairy J.* 9:497-505.
- Vinderola, C. G. y J. A. Rehinheimer. 2000. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 10:271-275

ESTUDIO III. ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA, PROTEÓLISIS Y PÉRFIL PEPTÍDICO DE UNA BEBIDA PROBIÓTICA A BASE DE SUERO

Rodríguez-Hernández, G., A. Chávez-Martínez, A. L. Rentería-Monterrubio y J. C Rodríguez-Figueroa. Biopéptidos en la leche y sus derivados: funcionamiento y beneficios a la salud. 2014. Revista Universidad y Ciencia de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 1: 281-294.

RESUMEN

Se evaluaron cuatro bebidas elaboradas a base de suero, tres de ellas fermentadas con probióticos (ABC, ABT-4 y C), y un control (no fermentado) durante su vida en anaquel (21 d), para cuantificar y correlacionar las siguientes variables: proteína total, proteólisis, actividad ECA inhibitoria, perfil peptídico y aminoácidos aromáticos. Para lo cual se llevó a cabo un análisis de componentes principales, donde se observaron diferencias significativas entre las cuatro bebidas elaboradas. Así mismo, existieron variaciones significativas en las correlaciones entre la proteólisis, perfil peptídico, aminoácidos aromáticos y actividad ECA inhibitoria entre las bebidas ($R = 0.9 - 0.0$). La concentración de péptidos totales, no se modificó en ninguna de las bebidas durante todo el monitoreo ($p > 0.05$), por ello no se observó correlación de ésta con las demás variables; no así, para la correlación entre la actividad ECA inhibitoria con los aminoácidos aromáticos y por consecuencia con el perfil peptídico, siendo para el tratamiento BCT-1 los más altos (0.913 y 0.98 respectivamente). En todas las bebidas analizadas se observó actividad ECA inhibitoria, durante su vida en anaquel siendo para el control 100 % constante, para ABT-4 de 80 a 100 %, y para ABC y BCT-1, muy variable con una fuerte declinación a los 14 d.

ABSTRACT

Four beverages were prepared from whey and evaluated throughout their shelf life (21 d). All, but the control were fermented with probiotics (ABC, ABT-4 and C) to quantify and correlate the following variables: total protein, proteolysis, ACE inhibitory activity, peptide profile and aromatic amino acids. The principal-component analysis showed significant differences among the beverages. Also, there were significant correlations among: proteolysis, peptide profile, aromatic amino acids and ACE inhibitory activity ($R = 0.9$ to 0.0). The total peptide concentration did not change in any of the beverages throughout the period ($p > 0.05$), therefore correlations with the other variables were not observed. Contrary, existed a correlation of the ACE inhibitory activity with the aromatic amino acids and consequently with the peptide profile. The BCT-1 treatment was the highest (0.913 and 0.98 respectively). In all beverages the ACE inhibitory activity was constant through the shelf life, the control kept a 100 % consistency, meanwhile, ABT-4 was between 80 to 100 %, and ABC and BCT-1 were highly variable with a sharp decline in the 14th d.

INTRODUCCIÓN

La leche y sus derivados son considerados una fuente importante de nutrientes ya que, además de suministrar energía, contienen proteínas de alta calidad, minerales y vitaminas (Park, 2009). La leche de vaca contiene alrededor de 3.5 % de proteínas, de las cuales el 80 % son caseínas (α , β , γ y κ) y el resto son proteínas del suero (β -lactoglobulina, α -lactalbumina, seroalbúmina y proteínas minoritarias) (Jauhiainen y Korpela, 2007; Fox y McSweeney, 2008). El suero de queso es la parte líquida de la leche que se obtiene después de la separación de la cuajada (caseína) durante la elaboración del queso (PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012). Las proteínas del suero, en comparación con las de otros alimentos, son de mayor calidad, por su fácil digestión, la gran mayoría de sus aminoácidos son esenciales, ramificados y gran cantidad de leucina, siendo el único aminoácido que no actúa como fuente de carbono para la síntesis de glucosa, (cetogénico y no glucogénico), sustituyendo a la glucosa en periodos de ayuno o pudiendo imitar a la insulina introduciendo la glucosa a la célula (Devries y Phillips, 2015).

La proteólisis es la degradación de las proteínas a péptidos o aminoácidos libres, esta puede ocasionarse por el sistema proteolítico (enzimas) de las bacterias ácido lácticas (BAL) (Smit *et al.*, 2005). Durante la fermentación de la leche, el sistema proteolítico de los cultivos iniciadores juegan un rol clave (Serra *et al.*, 2009), ya que la proteólisis que lleva a cabo cada microorganismo es iniciada por una sola proteinasa extracelular, sin embargo, algunas BAL no sintetizan proteinasas extracelulares dependiendo en

este caso de otras cepas que las liberen al medio. Únicamente los péptidos menores a 18 residuos son los que pueden entrar a la célula, por medio de las vías de sistemas transportadores: dipéptidos, tripéptidos y oligopéptidos. Posteriormente los péptidos son degradados intracelularmente por una variedad de peptidasas clasificadas en: aminopeptidasas, endopeptidasas, dipeptidasas, tripeptidasas, y peptidasas específicas sobre prolina; mismas que difieren mucho entre sí tanto en su actividad como en su mecanismo de acción (Smit *et al.*, 2005). La proteólisis es de suma importancia por varios aspectos: puede determinar la sobrevivencia de los cultivos iniciadores, contribuye a la formación de compuestos del sabor, olor y confiere propiedades reológicas a las leches fermentadas, así como también permite la formación de péptidos bioactivos (Serra *et al.*, 2009).

Como se mencionó anteriormente, la hidrólisis de las proteínas tiene como consecuencia la generación de péptidos. Aquellos que aunado a su función nutricional, son capaces de ejercer efectos biológicos benéficos específicos, se les denominan péptidos bioactivos o biopéptidos (Costa *et al.*, 2007; Dziuba *et al.*, 2009). Las proteínas de la leche son consideradas una de las principales fuentes de péptidos bioactivos (Sanlidere y Oner, 2011; Plaisancié *et al.*, 2013) que presentan efectos positivos sobre la salud del consumidor (Miguel *et al.*, 2007; Hajirostamloo, 2010). Los biopéptidos se generan por hidrólisis enzimática, la cual puede llevarse a cabo de tres formas: a) con enzimas digestivas, b) con microorganismos proteolíticos y c) con enzimas proteolíticas derivadas de microorganismos o plantas (Pritchard *et al.*, 2010; Rodríguez-Hernandez *et al.*, 2014). Por su importancia tecnológica, con

frecuencia sobresalen dos métodos de hidrólisis; mediante el uso de enzimas digestivas y por fermentación microbiana, en el entendido de que las enzimas proteolíticas aisladas para hidrolizar las proteínas son producidas por microorganismos principalmente bacterias, hongos y plantas (Korhonen, 2009; Ruíz-Giménez *et al.*, 2012). La bioactividad de los péptidos depende de la secuencia y número de aminoácidos que los integran, éstos pueden contener entre 2 y 20 aminoácidos (Korhonen y Philanto, 2006). Los biopéptidos pueden impactar positivamente a la salud actuando sobre el sistema inmune, gastrointestinal, nervioso, cardiovascular o bien el estado nutricional del consumidor (Hajirostamloo, 2010; Ruíz-Giménez *et al.*, 2012), ejerciendo diversas bioactividades como: antimicrobiana, antioxidante, inmunoestimulante y antihipertensiva, entre otras (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2014; Wada y Lönnnerdal, 2014).

La actividad antihipertensiva de algunos biopéptidos está dada por el bloqueo de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA), Peptidil dipéptido hidrolasa o cininasa II (EC 3.4.15.1), la cual es una ectoenzima dipéptidica localizada en diferentes tejidos, que libera una exopeptidasa asociada a la regulación de la presión arterial, ya que participa en el sistema renina angiotensina por medio de la conversión de angiotensina-I en angiotensina-II (Ahn *et al.* 2009; Qureshi *et al.*, 2013; Puchalska *et al.*, 2014). Al bloquear dicha enzima se logra un efecto antihipertensivo que a su vez beneficia el sistema inmune y nervioso del consumidor ya que favorece la homeostasis (Minervini *et al.*, 2009; Otte *et al.*, 2011). Los inhibidores sintéticos de la ECA, como el captopril, son comúnmente usados en el tratamiento de la hipertensión

(Lahogue *et al.*, 2010; Iwaniak *et al.*, 2014). La ECA es predominantemente una ectoenzima con dos sitios catalíticos (Gobbetti *et al.*, 2000) y las características que presentan los péptidos que la bloquean son las siguientes: contienen aminoácidos aromáticos hidrófobos como Trp, Tyr o Phe en una de las tres últimas posiciones de su secuencia; los residuos de Pro solos o en combinación con otros residuos hidrófobos al unirse a los sitios activos de la ECA bloquean su actividad, marcando así su capacidad antihipertensiva (Shahidi y Zhong, 2008; Alvarado y Guerra, 2010). Es por ello que resulta relevante asociar la actividad ECA inhibitoria con la cantidad de aminoácidos aromáticos (Pro, His, Phe, Tyr y Trp) en las muestras. Dicho bloqueo incrementa también al aumentar la cantidad de cargas positivas, a partir de la presencia de residuos de Lys o Arg en posiciones terminales del péptido (Shahidi y Zhong, 2008; Rodríguez-Hernandez *et al.*, 2014). Algunos péptidos que han presentado actividad ECA inhibitoria son: los tripéptidos Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro (Jakala *et al.*, 2009) y el dipéptido Tyr-Pro aislado de las proteínas del suero (Korhonen y Philanto, 2006), así mismo péptidos provenientes de las β -lactoglobulinas como: Leu-Ala-Met-Ala y Val-Phe-Lys (Kamau *et al.*, 2010b) y los fragmentos Trp-Leu-Ala-His-Lys (Kamau *et al.* 2010a; FitzGerald *et al.* 2004) y Tyr-Gly-Leu de las α -lactoalbúminas (Kamau *et al.*, 2010a). Por otra parte, Ruíz-Giménez *et al.* (2012) aislaron 11 péptidos provenientes de la lactoferrina, los cuales ejercieron actividad ECA inhibitoria. En este sentido, se ha reportado que el consumo de proteína hidrolizada de suero ejerce una reducción significativa de la presión sanguínea en personas hipertensas (FitzGerald *et al.*, 2004; Martínez y

Martínez, 2006). Además, es reconocido el uso de diferentes probióticos (solos o en combinación) como: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus*, para fermentar la leche e hidrolizar sus proteínas produciendo péptidos con actividad ECA inhibitoria (Donkor *et al.*, 2007). Siendo de los más estudiados los lactobacilos (Didelot *et al.*, 2006; Regazzo *et al.*, 2010; González-Córdova *et al.*, 2011).

Los biopéptidos pueden sufrir diversos cambios durante el proceso de fermentación (elaboración de la bebida y vida en anaquel) (Vermeirssen *et al.*, 2003), de la digestión estomacal y gastrointestinal y en base a esto pueden variar su actividad ECA inhibitoria significativamente (Bamdad *et al.*, 2009; Tavares *et al.*, 2011).

Los péptidos con actividad ECA inhibitoria, son lo biopéptidos alimenticios más estudiados, y actualmente las bases de datos registran alrededor de 600 secuencias peptídicas, algunas bases están en: <http://www.uwm.edu.pl/biochemia> y <http://erop.inbiras.ru> (Iwaniak *et al.*, 2014).

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio, fue evaluar la actividad ECA inhibitoria, proteólisis, perfil peptídico y aminoácidos aromáticos, y sus correlaciones en bebidas fermentadas con diferentes probióticos y preparadas a base de suero de queso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Área de Estudio

El presente estudio se efectuó del día 12 de Agosto al día 23 de Diciembre del año 2013. Comprendió la elaboración de cuatro diferentes bebidas elaboradas a base de suero, tres fermentadas con probióticos, y un control sin fermentar, efectuados en el laboratorio de Biotecnología de Alimentos de Origen Animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

Preparación de las Muestras

Se trabajaron tres tratamientos con los cultivos comerciales ABT-4, BCT-1 y un tercer cultivo ABC, (CHR HANSEN DE MÉXICO S.A de C.V.^R) elaborado con cada uno de los probióticos A, B, C por separado (0.333% de cada cultivo), de los cuales *A-Lactobacillus acidophilus*, *B-Bifidobacterium lactis*, *C-Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, y *T-Streptococcus thermophilus*; además de un control carente de probióticos (Cuadro 7). Se elaboró el suero en base a la metodología de elaboración de queso Chihuahua, mostrada en la Figura 2 y las bebidas correspondientes según la metodología descrita en la Figura 3. Se prepararon tres lotes de bebidas fermentadas y se mantuvieron en refrigeración (4 °C), durante cuatro sem. Tomándose muestras a los 0, 7, 14 y 21 d para determinar su: concentración peptídica total, porcentaje de proteólisis, actividad ECA inhibitoria, perfil peptídico y de aminoácidos aromáticos.

Las muestras se prepararon según lo descrito por Donkor *et al.* (2007), por lo cual, se tomaron 2.5 mL de cada una de las bebidas y se mezclaron con 5 mL de ácido tricloroacético (ATC) al 0.75 %, pasándose la mezcla a través de

Cuadro 7. Probióticos empleados en las bebidas fermentadas elaboradas a base de suero

Tratamientos	
Cultivos	Probióticos
BCT-1	<i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> .
ABC	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> .
ABT-4	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> .
Control	Sin microorganismos adicionados.

Todos los cultivos fueron donados por CHR HANSEN DE MÉXICO S.A de C.V.^R

papel filtro (Whatman no. 1 de 150 mm), obteniéndose los filtrados de las bebidas (FB), mismos que fueron congelados (-20 °C) hasta su análisis. Este filtrado permitió solo el paso de los péptidos y a la vez concentrarlos en los FB. Posteriormente, para el análisis de la actividad ECA inhibitoria, perfiles peptídicos y de aminoácidos aromáticos cada uno de los FB fueron llevados a la Liofilizadora (2.5 plus LABCONCO) durante 48 h, para obtenerse los filtrados de las bebidas liofilizadas (FBL), mismos que fueron pesados antes y después de liofilizarse para obtener por diferencia de peso la concentración de la muestra.

Determinación de la Concentración Peptídica Total

Se determinó por triplicado la concentración de los péptidos contenidos en los FB por el método de Bradford (1976). Este se basa en la reacción de las proteínas con el colorante azul brillante de comassie G-250, para formar un compuesto colorido que absorbe fuertemente a los 595 nm. Para realizar la curva de calibración, se prepararon 5 estándares de Albúmina de Suero Bovino (BSA), a las siguientes concentraciones (0.1, 0.008, 0.006, 0.003 y 0.001 mg/mL). Dicha técnica se usa para la determinación de proteína total, no obstante en los FB, solamente existían los péptidos filtrados. Todos los estándares se prepararon en solución salina 0.15 M. Se graficó la curva (Apéndice 7) y se determinó la ecuación de regresión ($y = 0.1526x - 0.0597$, $R^2 = 0.9973$). Para el análisis de las muestras se tomó 0.1 mL del FB o del estándar, y se mezcló con 1 mL del reactivo de Bradford, se agitó una vez por inmersión y se dejó reaccionar en la oscuridad a temperatura ambiente por 5 min, posteriormente se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (UV-1800 Shimadzu). La medida de absorbancia obtenida se linealizó en la

ecuación de regresión de la curva de calibración (Apéndice 7) y se determinó la concentración peptídica de cada uno de los FB. Los resultados de la cuantificación de los péptidos fueron expresados en logaritmo natural (Ln).

Actividad Proteolítica

La proteólisis de cada uno de los FB se determinó por triplicado con base en la reacción de las aminas primarias (NH_3) libres con el O-phthaldialdehído (OPA) y el β -mercaptoetanol, según el método de Church *et al.* (1983). El reactivo OPA se preparó de la siguiente manera: 25 mL de tetraborato de sodio 100mM, 2.5 mL de Sodio Duodecil Sulfato (SDS) al 20 %, 40 mg de OPA en 1 mL de metanol, 100 μL de β -mercaptoetanol, y se aforó a 50 mL con agua tridestilada. Para las lecturas se tomaron 50 μL de cada FB, y se mezclaron con 1 mL del reactivo OPA por inversión de la celda de cuarzo, con 2 min de incubación a temperatura ambiente y dentro del equipo para evitar la exposición a la luz, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (UV-1800 Shimadzu) a una longitud de onda de 340 nm. Con lo cual, se determinó el grado de proteólisis por diferencia entre las actividades proteolíticas de la bebida sin fermentar o muestra control (MC) con cada tratamiento, como se indica en el Cuadro 6 (Donkor *et al.*, 2007).

Actividad ECA Inhibitoria

La actividad ECA inhibitoria fue analizada por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC) según lo descrito por Pritchard *et al.* (2010) y Ghassem *et al.* (2011) con algunas modificaciones. La ECA (Sigma-Aldrich) comercial (1 unidad), fue diluida en 50 mM Tris-HCl (pH=7.5) con NaCl

0.3 M, para obtener una concentración de 100 mU/mL. Alícuotas de 1 mL fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso. Para llevar a cabo la reacción se tomaron muestras de los FBL y se resuspendieron en agua grado HPLC hasta alcanzar una concentración de 50 mg/mL. Posteriormente se tomaron 50 µL de los FBL para cada muestra o bien agua grado HPLC en el caso de la MC y se les adicionaron 200 µL de la solución de 2.5 mM Hipuril-L-Histidil-L-Leucina (HHL). La reacción fue parada por la adición de 250 µL de HCl 1 M. Posteriormente la solución fue pasada a través de filtros de nylon Whatman (30 mm/0.20 µm), para separar el producto de la reacción y el ácido hipúrico (HA) del HHL, y ser inyectados en un Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) acoplado con un detector UV-visible (Shimadzu). Se usó una columna Discovery^R C18 de 25 cm x 4.6 mm y 5 µm de tamaño de partícula (SUPELCO), misma que fue eluída con agua-metanol 50-50 % (v/v) más ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1 % (v/v) a una velocidad de flujo de 0.4 mL/min y una absorbancia de 228 nm. La evaluación de la inhibición de la ECA, se realizó con base en la comparación entre la concentración de HA en la MC carente del inhibidor (Apéndice 8) y con el (Apéndice 9). A cada pico de HA obtenido se le determinó el área bajo la curva. Se promedió el valor de dos determinaciones, para calcular el porcentaje de inhibición de la ECA.

$$\text{Inhibición de la ECA (\%)} = (B - A / B - C) \times 100$$

Donde: **A** es el área relativa del pico generado por HA en la presencia del inhibidor de la ECA, **B** es el área relativa de HA obtenida en ausencia del inhibidor y **C** es el área relativa de HA generada sin la ECA (correspondiente a la autólisis de HHL en el curso de la reacción). Los FBL contenían cierto grado

de HA, ya que este se encuentra de manera natural en la leche, así que fueron cuantificadas las concentraciones de HA de cada muestra, para restarlas del HA generado por efecto de la reacción y calcular el porcentaje de inhibición de la ECA de cada una de las muestras.

Perfil Peptídico y Aminoácidos Aromáticos

Las muestras fueron analizadas por RP-HPLC según lo descrito por Nielsen *et al.* (2009) y Rodríguez-Figueroa *et al.* (2012) con algunas modificaciones, en un HPLC acoplado con un detector UV-visible (Shimadzu). Los péptidos fueron separados a 40 °C con una columna Pinnacle II-C18 de 200 mm x 4.6 mm y tamaño de partícula 5 µm (RESTEK). Misma que fue equilibrada con agua grado HPLC en 0.04 % de TFA (solvente A). Se inyectaron 50 µL de cada uno de los FBL o agua grado HPLC en el caso de las muestras blancos (Apéndice 10). Los péptidos fueron eluidos con un incremento de gradiente con acetonitrilo en 0.03 % (v/v) de TFA (solvente B) desde 0 a 45 % en el solvente A por 60 min. La velocidad de flujo fue de 0.5 mL/min y las longitudes de onda para la detección fueron de 220 nm para el perfil peptídico completo y 280 nm para la detección de los anillos de los aminoácidos aromáticos (Pro, His, Phe, Tyr y Trp) (Apéndice 11). Las áreas bajo la curva fueron integradas en unidades arbitrarias para cada una de las muestras en los tiempos de retención de 6.9 a 26.5 minutos, a las cuales se les restó el area total obtenida en la muestra blanco.

Análisis Estadístico

Para el estudio global de los datos, se realizó un análisis de componentes principales con las variables medidas (proteína total, grado de

proteólisis, actividad ECA inhibitoria, perfil peptídico y cantidad de aminoácidos aromáticos) utilizándose el procedimiento PRINCOMP. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SAS (2006).

El análisis de componentes principales, es una técnica exploratoria que explica la variación en un conjunto de observaciones, a través de un limitado número de combinaciones lineales de las variables que contienen la mayor parte de la variabilidad, y que sean independientes entre ellas (Chacón-Blanco, 2007).

Además para evaluar el efecto de las mismas variables durante la vida en anaquel, se realizó un análisis usando el procedimiento MIXED, por medio de un diseño en bloques al azar con mediciones repetidas a través del tiempo, considerando como covariable la medición al tiempo cero de cada una de las variables de respuesta. Cuando hubo efecto de la interacción de los parámetros fijos del modelo sobre las variables estudiadas a través del tiempo ($p \leq 0.05$), y para determinar las diferencias entre los mismos se realizó un análisis de contrastes con la instrucción ESTIMATE. Se consideró el siguiente modelo:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + D_j + (\tau D)_{ij} + \beta_k + \rho_{(ij)} + \lambda + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$y_{ij.kl}$ = variable de respuesta medida a través del tiempo.

μ = media general.

τ_i = efecto fijo del i -ésimo tratamiento.

D_j = efecto del j -ésimo día (7, 14, 21).

$(\tau D)_{ij}$ = efecto fijo de la interacción entre el i -ésimo tratamiento y el j -ésimo día.

β_k = efecto aleatorio del k -ésimo bloque.

$\rho_{(ij)}$ = efecto aleatorio de la i -ésima unidad experimental, donde el j -ésimo tratamiento estuvo anidado en la unidad experimental.

λ = efecto de la covariable de cada una de las variables estudiadas al día cero.

ε_{ij} = error aleatorio distribuido en forma normal con media cero y varianza, donde $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$.

Actividad ECA Inhibitoria. Para el análisis de la concentración peptídica necesaria para inhibir la actividad de la enzima en un 50 % (IC₅₀), se llevó a cabo un análisis con los procedimientos GLM con LSMEANS, de cada uno de los probióticos por separado. Basándose en el siguiente modelo:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

y_{ij} = variable de respuesta en la j -ésima repetición del i -ésimo tratamiento.

μ = media general.

τ_i = efecto fijo del i -ésimo tratamiento.

ε_{ij} = error aleatorio distribuido en forma normal con media cero y varianza,

donde $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$.

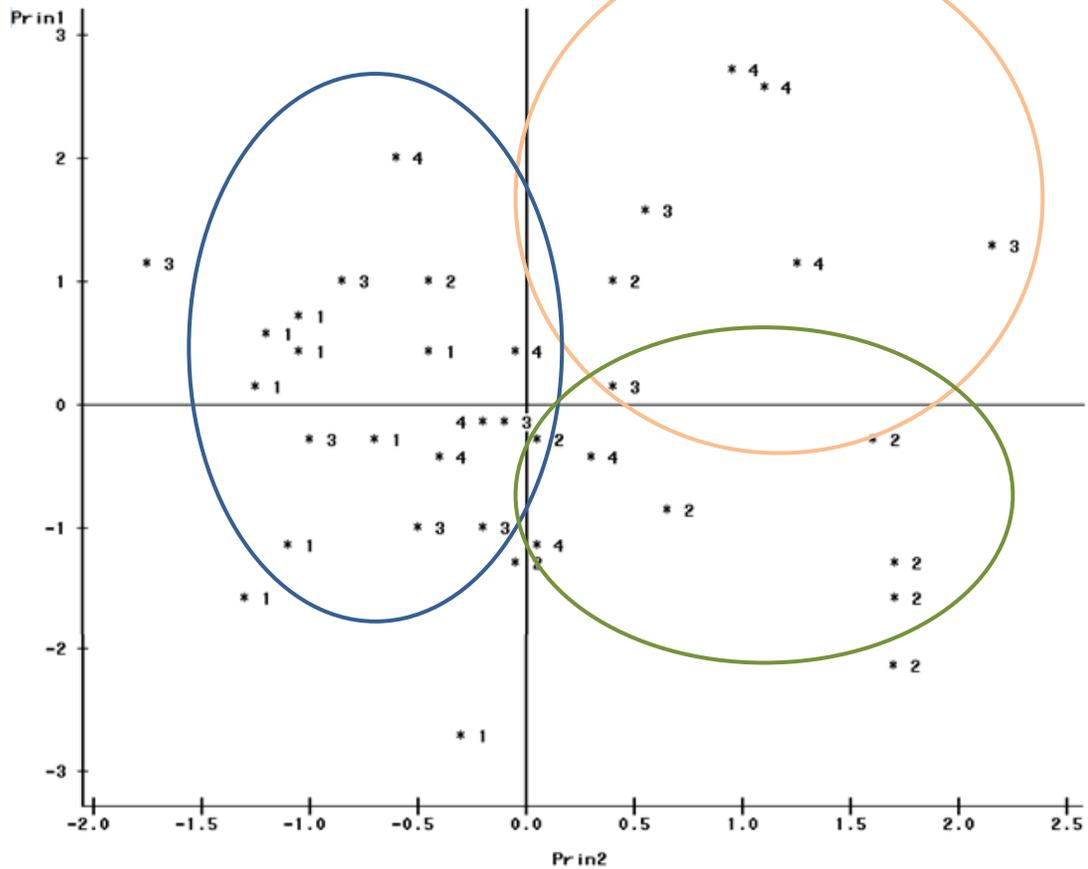
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Componentes Principales

En éste análisis, se observó que entre los tratamientos existieron diferencias significativas, los distintos cultivos inoculados en las bebidas tuvieron un efecto significativo sobre su proteólisis, perfiles peptídicos, aminoácidos aromáticos y por consecuencia su actividad ECA inhibitoria. Se identificaron las agrupaciones relacionadas con la causa más alta de su variabilidad.

En la Gráfica 13 de los componentes principales 1 y 2, para todas las variables se observa asociación entre los tratamientos 1 y 3 marcado con azul, y de manera independiente se encontró el tratamiento 2 (control) en el cuadrante inferior izquierdo marcado con color verde, lo cual es muy razonable por ser la bebida más diferente al resto.

En la Gráfica 14 correspondiente a los componentes principales 1 y 3, se observan asociaciones similares a las mostradas en la Gráfica 14, existiendo similitud entre los tratamientos 1 y 3, asociándolos en el cuadrante superior marcado con azul, por otra parte el tratamiento 4 fue ubicado en el otro extremo de la parte superior de la Gráfica con color amarillo y, en el caso del tratamiento 2 (control), éste se ubicó en la parte inferior. No obstante, existieron varias repeticiones de los diversos tratamientos que no se agruparon en un solo cuadrante, lo cual, puede explicarse con las correlaciones dadas por las diferentes variables en función de los tratamientos analizados, lo cual de manera general puede deberse del metabolismo de cada probiótico y las mezclas generadas entre los mismos (Allgeyer *et al.*, 2010).



Gráfica 13. Componentes principales 1 y 2 de las variables: proteína total, grado de proteólisis, actividad ECA inhibitoria, perfil peptídico y aminoácidos aromáticos.

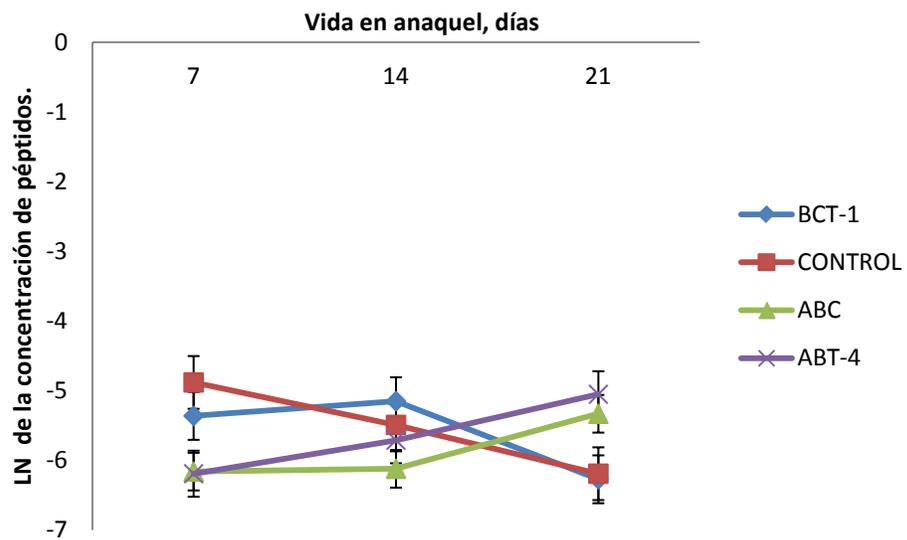
2 (control), éste se ubicó en la parte inferior. No obstante, existieron varias repeticiones de los diversos tratamientos que no se agruparon en un solo cuadrante, lo cual, puede explicarse con las correlaciones dadas por las diferentes variables en función de los tratamientos analizados, lo cual de manera general puede deberse del metabolismo de cada probiótico y las mezclas generadas entre los mismos (Allgeyer *et al.*, 2010).

Correlaciones. Los resultados se muestra en el Cuadro 8, donde se observa que aunque algunas variables mostraron correlaciones altas de hasta 0.98 esto no fue para todos los tratamientos, ni todas las variables analizadas, por lo cual, se puede decir que las variables son independientes entre sí. Para el tratamiento 1 entre la cantidad de proteína y las variables restantes no existió ninguna correlación, lo cual es debido a que la concentración de proteína total no sufrió cambio ($p > 0.05$) durante la vida en anaquel de la bebida (Gráfica 15); el resto de las variables si mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$), solo la cantidad de aminoácidos aromáticos presentes mostró 0.15 de relación inversa. Existiendo correlación entre las siguientes variables: la proteólisis se encontró correlacionada con todas las variables, excepto con la concentración peptídica, con la cual tuvo 0.01 de relación; con la actividad ECA inhibitoria se observó una correlación inversamente proporcional de 0.471, con el perfil peptídico de 0.413 y con la cantidad de aminoácidos aromáticos presentes de 0.52. No obstante, las correlaciones más altas fueron observadas entre la actividad ECA inhibitoria y el perfil peptídico, las cuales presentaron una relación inversamente proporcional de 0.986. Entre la actividad ECA inhibitoria y la presencia de aminoácidos

Cuadro 8. Coeficientes de correlaciones (R) de las variables: concentración peptídica, proteólisis, actividad ECA inhibitoria, perfil peptídico y aminoácidos aromáticos

Variables	Concentración peptídica	Proteólisis	Act. ECA inhibitoria	Perfil peptídico	Aminoácidos aromáticos
Tratamiento 1 (BCT1)					
Concentración peptídica	1				
Proteólisis	0.017	1			
Act. ECA inhibitoria	0.039	-0.471	1		
Perfil peptídico	-0.00	0.413	-0.986	1	
Aminoácidos aromáticos	-0.156	0.522	-0.913	0.919	1
Tratamiento 2 (Control)					
Concentración peptídica	1				
Proteólisis	-0.750	1			
Act. ECA inhibitoria	---	---	1		
Perfil peptídico	0.417	0.120	---	1	
Aminoácidos aromáticos	-0.233	0.684	---	0.652	1
Tratamiento 3 (ABC)					
Concentración peptídica	1				
Proteólisis	0.053	1			
Act. ECA inhibitoria	0.462	0.317	1		
Perfil peptídico	-0.444	-0.239	-0.048	1	
Aminoácidos aromáticos	-0.368	-0.416	0.074	0.928	1
Tratamiento 4 (ABT-4)					
Concentración peptídica	1				
Proteólisis	-0.549	1			
Act. ECA inhibitoria	0.384	0.406	1		
Perfil peptídico	-0.561	0.458	-0.469	1	
Aminoácidos aromáticos	-0.485	-0.330	-0.920	0.438	1

Donde: A-*Lactobacillus acidophilus*, B-*Bifidobacterium lactis*, C-*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, T-*Streptococcus thermophilus*. ECA-Enzima Convertidora de Angiotensina.



Gráfica 15. Concentración de péptidos cuantificados en bebidas a base de suero con diferentes probióticos. Donde: Control- sin probióticos, A- *Lactobacillus acidophilus*, B- *Bifidobacterium lactis*, C- *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, T- *Streptococcus thermophilus*. Sin diferencia significativa entre tratamientos ($p > 0.05$)

aromáticos, se observó una relación inversamente proporcional de 0.913, y entre el perfil peptídico y aminoácidos aromáticos de 0.919.

En la bebida control (tratamiento 2), la actividad ECA-inhibitoria durante la vida en anaquel, se mantuvo constante al 100 %, es por ello que en el Cuadro 8, no fueron calculadas las correlaciones con el resto de las variables. No obstante, para este tratamiento se observaron correlaciones entre la concentración peptídica y el resto de las variables: con la proteólisis presentó una relación inversamente proporcional de 0.75, con el perfil peptídico una relación de 0.471, con la cantidad de aminoácidos aromáticos una relación inversa de 0.233; con respecto a la proteólisis se observó una correlación de 0.12 con el perfil peptídico, y con la cantidad de aminoácidos aromáticos de 0.684; y del perfil peptídico con los aminoácidos aromáticos una relación directa de 0.652. La causa probable de que el tratamiento control mantuviera al 100 % su actividad ECA inhibidora durante todo el monitoreo, nos lleva al proceso de elaboración de la bebida, misma que lleva un tratamiento térmico de 95° por 20 min y posteriormente una homogenización, por lo que este paso fue suficiente para fraccionar las concentraciones peptídicas presentes y generar una serie de péptidos, que resultaron con alta actividad ECA inhibitoria, a diferencia de los tratamientos restantes en los cuales el metabolismo de los probióticos generó una constante proteólisis, lo que generó diferentes péptidos durante su vida en anaquel.

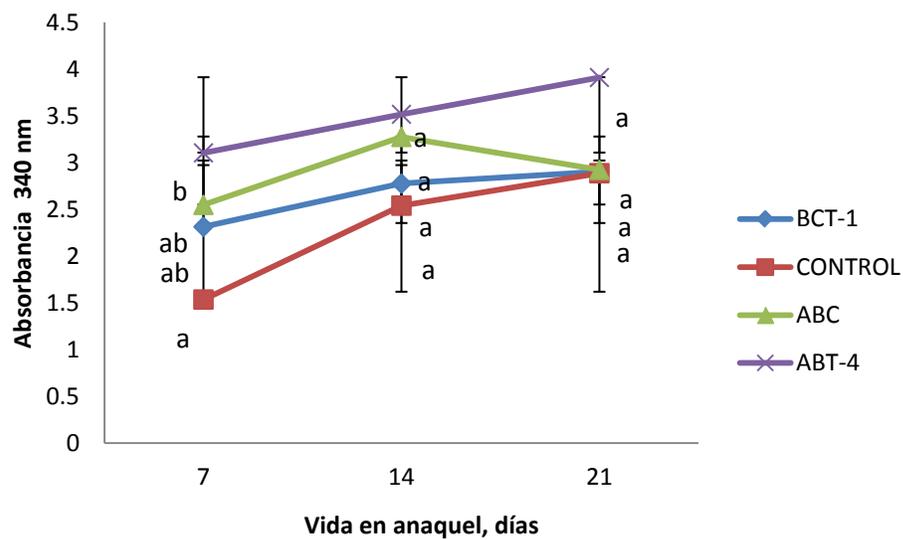
En el tratamiento 3, no fueron encontradas correlaciones tan altas como en los demás tratamientos, las más altas fueron dadas entre la proteólisis y la cantidad de aminoácidos aromáticos presentes con una relación inversamente

proporcional de 0.415, y entre la concentración peptídica y el perfil peptídico también con una relación inversa de 0.444

En el tratamiento 4, se mantuvieron todas las correlaciones entre las variables en un rango de 0.384 a 0.485, a excepción de la actividad ECA-inhibitoria con la cantidad de aminoácidos aromáticos presentes, misma que fue inversamente proporcional y de 0.920.

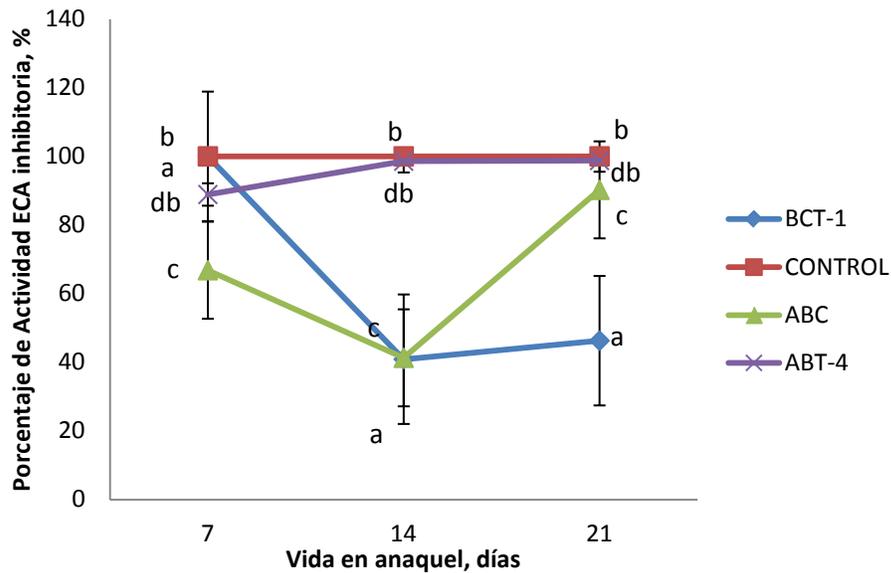
Se observó que las correlaciones entre las variables variaron mucho en función del tratamiento en cuestión, tanto en magnitud como en sentido directo o inverso, dichos resultados se comprenden, ya que las mezclas de los probióticos de cada cultivo empleado en los diversos tratamientos, fueron distintas, y en base a ello se perfilaron las características de cada bebida. Lo cual coincide con Nielsen *et al.* (2009), quienes encontraron diferencias significativas entre los valores de las correlaciones (las cuales resultaron ser no lineales) entre el perfil peptídico y la actividad ECA inhibitoria por efecto de los probióticos empleados en la fermentación de cada una de las leches analizadas. Ellos discuten que inclusive en estudios similares no se han encontrado correlaciones o bien las correlaciones detectadas han sido muy bajas (alrededor de $R=0.25$) entre las mismas variables analizadas.

Resultados del procedimiento mixed. Para la cuantificación de los péptidos (Gráfica 15), los resultados fueron expresados en Ln. No existió diferencia en la concentración peptídica entre tratamientos ($p=0.81$), ni durante su vida en anaquel ($p=0.96$), ni interacción entre éstos ($p=0.105$). Es decir, los péptidos que contenían las bebidas no sufrieron cambios cuantitativos, solo cualitativos. Respecto a la proteólisis (Gráfica 16), tanto los tratamientos



Gráfica 16. Proteólisis de bebidas a base de suero con diferentes probióticos. Donde: control sin probióticos, A-*Lactobacillus acidophilus*, B-*Bifidobacterium lactis*, C-*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, T-*Streptococcus thermophilus*. ^{ab}Literales diferentes, indican diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$).

($p=0.008$), como la vida en anaquel ($p=0.03$), tuvieron efecto sobre esta variable. Pero la interacción no fue significativa ($p=0.9$). En el análisis de contrastes se observó diferencia al día 7 y entre los tratamientos 4 y 2. En lo que respecta a la actividad ECA inhibitoria (Gráfica 17), tanto los tratamientos como la vida en anaquel y su interacción mostraron efecto ($p<0.05$), por lo cual, el análisis de contrastes resaltó diferencias notables entre los tratamientos a lo largo de su vida en anaquel (7, 14 y 21 d). En esta variable, se observó que el control, mantuvo su actividad ECA inhibitoria al 100 % durante los 21 d. Como se mencionó anteriormente los resultados pudieran atribuirse a que una vez hidrolizada la proteína después del tratamiento térmico al cual fue sometido el suero (95 °C por 20 min), lo cual sugiere que los péptidos formados se mantuvieron constantes ya que no había microorganismos que los metabolizaran, y modificaran a diferencia de los tratamientos adicionados con probióticos. Cabe sugerir que para esta variable, se recomienda realizar en un estudio posterior, elaborando diluciones para observar las concentraciones mínimas de los péptidos que ejercieron la inhibición enzimática. El tratamiento ABT-4 se mantuvo muy próximo al 100 % de actividad ECA inhibitoria, durante su vida en anaquel. Lo cual, hace corroborar que el efecto de los péptidos con dicha actividad es atribuido en mayor medida a la naturaleza de las proteínas de las bebidas, dichos resultados son coherentes con diferentes estudios donde se han observado diferencias significativas en las inhibiciones de la ECA con respecto a las proteínas de origen (Vermeirssen *et al.*, 2003; Bamdad *et al.*, 2009). Así como a los microorganismos proteolíticos empleados que metabolizan dichas proteínas (González-Córdova *et al.*, 2011). Para los otros



Gráfica 17. Porcentaje de la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en las bebidas a base de suero con diferentes probióticos. Donde: Control- sin probióticos, A-*Lactobacillus acidophilus*, B-*Bifidobacterium lactis*, C-*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, T-*Streptococcus thermophilus*. ^{abcd} Literales diferentes, indican diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$).

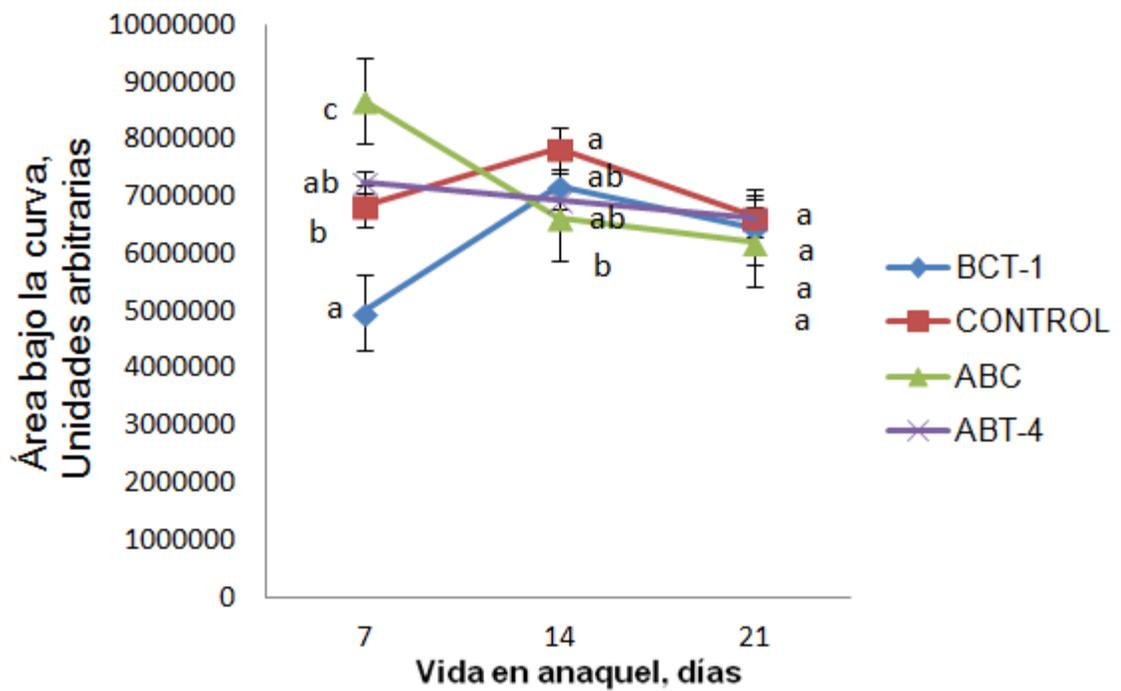
tratamientos se observaron mayores variaciones con respecto a sus actividades durante su monitoreo. Lo cual se puede atribuir al metabolismo proteolítico de cada probiótico, que aunque todos sintetizan peptidasas como aminopeptidasas y dipeptidasas, estas difieren entre sí, en diferentes proporciones, en sus puntos de corte, en eficiencia y según las condiciones en las que se encuentren variará su actividad enzimática (Shihata y Shah, 2000). De manera específica las características metabólicas de cada probiótico determinan su comportamiento en el medio de inoculación. *L. acidophilus* sintetiza una proteinasa tipo serina (Law y Haandrikman, 1995). *L. paracasei* una proteinasa inicial llamada PrtP y *S. thermophilus* la llamada PrtS y peptidasas específicas de prolina (Savijoki *et al.*, 2006) y posee mayor actividad extracelular comparado con los otros (Shihata y Shah, 2000). Las bifidobacterias, tienen una ruta de fermentación de los carbohidratos única (Axelsson, 2004), y su actividad proteolítica es menor al resto de los probióticos usados (Shihata y Shah, 2000). Es de considerarse también que entre los probióticos empleados se generan diferentes asociaciones simbióticas (Ustok *et al.*, 2007).

Respecto a la IC₅₀, de las cuatro bebidas durante su vida en anaquel no estas no presentaron diferencias entre sí ($p > 0.05$), es decir, la concentración peptídica requerida para llevar a cabo el 50 % de la inhibición de la ECA, no se vió influida por los cultivos empleados, el tiempo de monitoreo, ni el lote analizado. Lo cual refuerza lo sugerido con los datos obtenidos de la actividad ECA inhibitoria, es decir, la inhibición esta mayormente influida por la naturaleza de las proteínas de origen en sí y no por los diferentes cortes que se puedan generarse por la proteólisis microbiana. Los valores detectados de IC₅₀ se

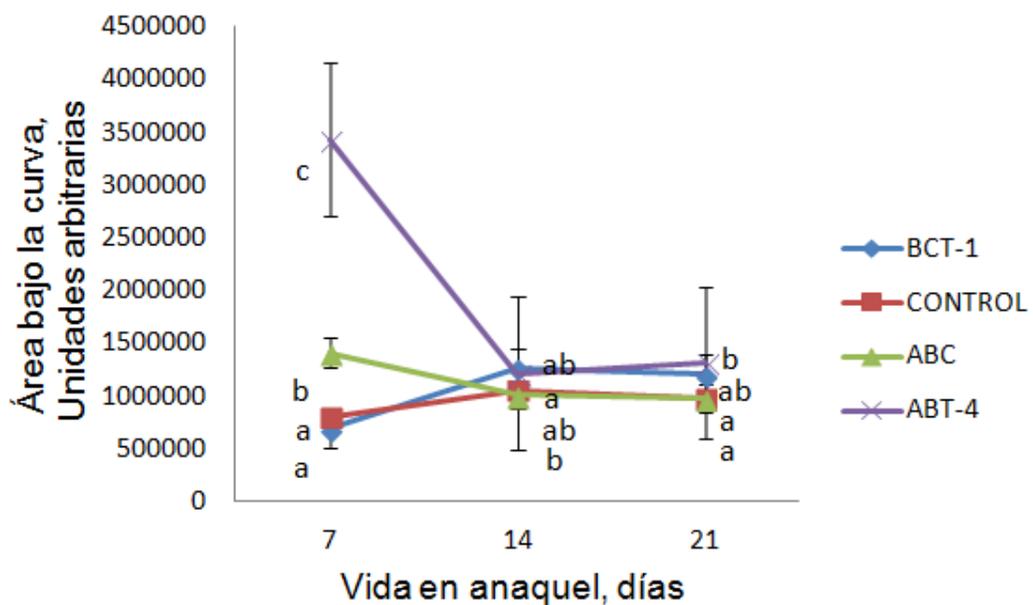
encuentran en el rango de 0.01 – 0.13 mg/mL (Apéndice 12), lo cual coincide con las IC₅₀ reportadas por Vermeirssen *et al.* (2003) de 0.07 - 0.14 mg/mL en aislado de proteína de suero y Quirós *et al.* (2005) de 0.061 - 1.18 mg/mL en péptidos obtenidos de kéfir en leche para la misma enzima.

En cuanto al perfil peptídico (Gráfica 18), tanto los tratamientos como la vida en anaquel y su interacción fueron significativas ($p < 0.05$). Aunado a esto, el análisis de contrastes únicamente no mostró diferencias al día 7 entre los tratamientos 2 y 4 y en día 21 entre los tratamientos 2 y 3. No obstante, en este gráfico también se puede observar que tanto el control como el tratamiento ABT-4, mantuvieron más constante su perfil de la misma manera como se observó con la actividad ECA inhibitoria. Lo cual, nos habla de la estabilidad que mantiene esta mezcla de probióticos en las condiciones analizadas, las cuales en el caso del control, son atribuidas a que no existía efecto proteolítico por causa microbiana.

Finalmente para la cantidad de aminoácidos aromáticos presentes, tanto los tratamientos como la vida en anaquel y su interacción fueron significativas ($p < 0.05$), mismo que se observó en el análisis de contrastes (Gráfica 19). Donde las diferencias estuvieron entre todos los tratamientos a lo largo de la vida en anaquel (7, 14 y 21 d). Como es el caso de Vermeirssen *et al.* (2003), quienes analizaron el grado de proteólisis y la actividad ECA inhibitoria en proteína de suero fermentada con *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae* observando cambios significativos en el grado de proteólisis durante la fermentación según el cultivo y el tipo de proteína empleados.



Gráfica 18. Perfil peptídico de bebidas a base de suero con diferentes probióticos. Donde: control-sin probióticos, A-*Lactobacillus acidophilus*, B-*Bifidobacterium lactis*, C-*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, T-*Streptococcus thermophilus*. ^{abc}Literales diferentes, indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).



Gráfica 19. Cuantificación de aminoácidos aromáticos en bebidas a base de suero con diferentes probióticos. Donde: control-sin probióticos, A-*Lactobacillus acidophilus*, B-*Bifidobacterium lactis*, C-*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, T-*Streptococcus thermophilus*. ^{abc}Literales diferentes, indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

Observando que de manera general se aumentaba la actividad ECA inhibitoria de un 18 a 30 % después de la fermentación. Misma que fue más alta usando solo los lactobacilos, que al combinarse con las levaduras. Por otra parte, Regazzo *et al.* (2010), fermentaron leche con *Enterococcus faecalis* y *Lactobcillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, observando que la leche fermentada con los enterococos mostró una significativa actividad ECA inhibitoria más alta (69.43 ± 3.12 %), que la leche con lactobacilos (60.86 ± 1.01 %). Lo cual lo asocian directamente a que los enterococos tiene un sistema proteolítico altamente activo. En este caso al medir la concentración peptídica esta fue de 14.78 mg/mL, a diferencia de 4.89 mg/mL de los lactobacilos. Por lo cual, los estudios realizados por dichos autores y el presente sugieren que la habilidad para producir péptidos pequeños (2-20 residuos), está directamente implicada con la actividad ECA inhibitoria.

Así mismo, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos elaborados con respecto a las variables analizadas, a excepción de la cantidad de péptidos presentes. Mismos que se mantuvieron constantes entre los tratamientos y la vida en anaquel. Es decir, se observaron efectos de los probióticos inoculados en las bebidas durante la vida en anaquel para la proteólisis y perfil peptídico y por lo tanto para la actividad ECA inhibitoria.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las bebidas formuladas a base de suero de queso Chihuahua, mostraron actividad ECA inhibitoria, misma que se relacionó ampliamente con la proteólisis, el perfil peptídico y los aminoácidos aromáticos presentes. Observándose diferentes niveles de correlación en los distintos tratamientos analizados.

La proteólisis se correlacionó con el perfil peptídico, la presencia de aminoácidos aromáticos y la actividad ECA inhibitoria. Así como, la actividad inhibitoria con el perfil peptídico y los aminoácidos aromáticos presentes en la misma.

Se observó mayor actividad inhibitoria en el tratamiento control, resultado atribuido al proceso térmico, mecánico y homogenización, que se llevó a cabo en la elaboración de las bebidas.

Se recomienda un estudio adicional de los FB para separar por peso las fracciones, y determinar así en qué rango de peso molecular se encuentra la mayor cantidad de péptidos que presentaron la inhibición enzimática, principalmente en la bebida control que presentó un 100 % de ésta inhibición y por lo cual no fue posible estimar sus correlaciones con las restantes variables.

Se recomienda llevar a cabo la secuenciación de los péptidos responsables de la actividad ECA inhibitoria, y por último llevar a cabo la evaluación *in vivo* de los mismos.

LITERATURA CITADA

- Ahn, J. E., S. Y. Park, A. Atwa, B. F. Gibbs y B. H. Lee. 2009. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey fermented by *Lactobacillus* species. *J. Food Biochem.* 33:589-602.
- Alvarado, C. C. y M. Guerra. 2010. Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *Anales Venezolanos de Nutrición* 23:42-49.
- Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. En *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Seppo, S., A.V. Wrigth y A. Ouwehand. Tercera edición. Editorial CRC Press. USA.
- Bamdad, F., S. Dokhani, J. Keramat y R. Zareie. 2009. The impact of germination and *in vitro* digestion on the formation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from lentil proteins compared to whey proteins. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 37: 36-46.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72:248-254.
- Chacón-Blanco, I. I. 2007. Aplicación del análisis multivariado y de modelos lineales para analizar el color en alimentos. Tesina presentada como requisito para obtener el grado de Maestría Profesional en Estadística Aplicada. De la Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia y Ecología. Secretaría de Investigación y Posgrado. Chihuahua Chihuahua México. Pg. 60
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., D. H. Porter y G. L. Catignani. 1983. Department of food science spectrophotometric assay using o-phthaldialdehy de for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins *J. Dairy Sci.* 66: 1219-1227.
- Costa, E. L., J. A. Rocha y F. Netto. 2007. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *Int. Dairy J.*17:632–640.
- Devries, M. y S. M. Phillips. 2015. Supplemental protein in support of muscle mass and health: advantage whey. *J. Food Sci.* 80:A8-A15
- Donkor, O. N., A. Henriksson, T. K. Singh, T. Vasiljevic y N. P. Shah. 2007. ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *Int. Dairy J.* 17:1321–1331.
- Dziuba, M., B. Dziuba y A. Iwaniak. 2009. Milk proteins as precursors of bioactive peptides. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 8:71-90.

- FitzGerald, R. J., B. A., Murray y D. J. Walsh. 2004. The emerging role of dairy proteins and bioactive: peptides in nutrition and health. *J. Nutr.* 134:980S- 988S.
- Fox, P. F. y P. L. H. Mc Sweeney. 2008. Chapter 4: Milk proteins. En *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Fox, P. F. y P. L. H. Mc Sweeney. 1a. ed. Editorial Thompson Science. Cork, Irlanda.
- Ghassem, M., K. Arihara, A. S. Babji, M. Said y S. Ibrahim. 2011. Purification and identification of ACE inhibitory peptides from Haruan (*Channa striatus*) myofibrillar protein hydrolysate using HPLC–ESI-TOF MS/MS. *Food Chem.* 129:1770–1777.
- Gobbetti, M., P. Ferranti, E. Smacchi, F. Goffredi y F. Addeo. 2000. Production of angiotensin-i-converting-enzyme-inhibitory. peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3898–3904.
- Hajirostamloo, B. 2010. Bioactive component in milk and dairy. Product. *World Acad Sci Eng Technol.* 72:162-166.
- Iwaniak, A., P. Minkiewicz y M. Darewicz. 2014. Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food. components in blood pressure reduction. *Compr. Rev. Food Sci. Food safety.* 13:114-134.
- Jakala, P., T. Jauhiainen, R. Korpela y H. Vapaatalo. 2009. Milk protein-derived bioactive tripeptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro protect endothelial function *in vitro* in hypertensive rats. *J. Funct. Foods* 1: 266–273.
- Jauhiainen, T. y R. Korpela. 2007. Milk Peptides and Blood Pressure. *J. Nutr.* 137: 825S–829S.
- Kamau, S. M., L. Rong, W. Chen, X. M. Liu, F. W. Tian, Y. Shen y T. Gao. 2010b. Functional significance of bioactive peptides derived from milk proteins. *Food Rev. Int.* 26:386–401.
- Kamau, S. M., S. C. Cheison, W. Chen, X. M. Liu y L. Rong. 2010a. Alpha-lactalbumin: its production technologies and bioactive peptides. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety* 9:197-212.
- Korhonen, H. 2009. Milk-derived bioactive peptides: From Sci. to applications. *J. Funct. Food.* 1:177–187.
- Korhonen, H., Y A. Pihlanto. 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *Int. Dairy J.* 16: 945-960.

- Lahogue, V., K. Réhel, L. Taupin, D. Haras y P. Allaume. 2010. A HPLC-UV method for the determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Food Chem.* 118:870-875.
- Law, J. y A. Haandrikman. 1995. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 7:1-11.
- Martínez, A. O. y V. M. E. Martínez. 2006. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutr. Hosp.* 21:1-14.
- Miguel, M, M. Manso, A. Aleixandre, M. J. Alonso, M. Salaices y R. López-Fandiño. 2007. Vascular effects, Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity, and antihypertensive properties of peptides derived from egg white. *J. Agric. Food Chem.* 55:10615-10621.
- Minervini, F., M. A. Bilancia, S. Siragusa, M. Gobbetti y F. Caponio. 2009. Fermented goats' milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food. *Food Microbiol.* 26:559-564.
- Nielsen, M. S., T. Martinussen, B. Flambard, K. I. Sorensen y J. Otte. 2009. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *Int. Dairy J.* 19:155-165.
- Otte, J., T. Lenhard, B. Flambard y K. I. Sorensen. 2011. Influence of fermentation temperature and autolysis on ACE-inhibitory activity and peptide profiles of milk fermented by selected strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactococcus lactis*. *Int. Dairy J.* 21:229-238.
- Park, Y. W. 2009. Bioactive components in milk and dairy. Products. Athenas Georgia, USA: Wiley-Blackwell. 396 pp.
- Plaisancié, P., J. Claustre, M. Estienne, G. Henry, R. Boutrou, A. Paquet y I. Léoni. 2013. A novel bioactive peptide from yoghurts modulates expression of the gel-forming MUC2 mucin as well as population of goblet cells and paneth cells along the small intestine. *J. Nutr. Biochem.* 24:213-221.
- Pritchard, S. R., M. Phillips y K. Kailasapathy. 2010. Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Res. Int.* 43:1545-1548.
- Proyecto de Norma Mexicana. PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012. Sistema producto leche – alimentos – lácteos – suero de leche (líquido o en polvo) - especificaciones y métodos de prueba. Organismo nacional de normalización del COFOCALEC. 2012

- Puchalska, P., M. C. García y M. L. Marina. 2014. Identification of native angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in commercial soybean based infant formulas using HPLC-Q-ToF-MS. *Food Chem.* 157:62–69.
- Quirós, A., B. Hernández-Ledesma, M. Ramos, L. Amigo y I. Recio. 2005. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Peptides Derived from Caprine Kefir. *J. Dairy Sci.* 88:3480–3487
- Qureshi, T. M., G. E. Vegarud, R.K. Abrahamsen y S. Skeie. 2013. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity of the Norwegian autochthonous cheeses Gamalost and Norvegia after *in vitro* human gastrointestinal digestion. *J. Dairy Sci.* 96:838–853.
- Regazzo, D., L. D. Dalt, A. Lombardi, C. Andrighetto, A. Negro y G. Gabai. 2010. Fermented milks from *Enterococcus faecalis* TH563 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LA2 manifest different degrees of ACE-inhibitory and immunomodulatory activities. *Dairy Sci. Technol.* 90:469–476.
- Rodríguez-Figueroa, J. C., A. F. González-Córdova, M. J. Torres-Llanez, H. S. García y B. Vallejo-Córdoba. 2012. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides produced in fermented milk by specific wild *Lactococcus lactis* strains. *J. Dairy Sci.* 95: 5536-5543.
- Rodríguez-Hernández, G., A. Chávez-Martínez, A. L. Rentería-Monterrubio y J.C Rodríguez-Figueroa. Biopéptidos en la leche y sus derivados: funcionamiento y beneficios a la salud. 2014. *Revista Universidad y Ciencia de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.* 1: 281-294.
- Ruiz-Giménez, P., J. B. Salom, J. F. Marcos, S. Vallés, D. F. Martínez-Maqueda, I. Recio, G. Torregrosa, E. Alborch y P. Manzanares. 2012. Antihypertensive effect of a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate: Identification of novel active peptides. *Food Chem.* 131:266–273.
- Sanlidere, H. A. y Z. Oner. 2011. Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. *J. Dairy Sci.* 94: 5305–5314.
- Serra, M., A. J. Trujillo, B. Guamis y V. Ferragut. 2009. Proteolysis of yogurts made from ultra-high-pressure homogenized milk during cold storage. *J. Dairy Sci.* 92:71-78.
- SAS, Statistical Analysis System. 2006. Version 9.1.3 for Windows. SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Shahidi, F. y Y. Zhong. 2008. Bioactive peptides. *J. AOAC Int.* 91:914-931.
- Shihata, A. y N.P. Shah. 2000. Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 10:401-408.

- Smit, G., B. Smit y W. Engels. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS. Microbiol. Rev.* 29:591-560.
- Tavares, T., M. M. Contreras, M. Amorim, M. Pintado, I. Recio y F. X. Malcata. 2011. Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-converting enzyme: In vitro effect and stability to gastrointestinal enzymes. *Peptides.* 32:1013-1019.
- Vermeirssen, V., J. Van Camp, K. Decroos, L. Van Wijmelbeke y W. Verstraete. 2003. The impact of fermentation and *in vitro* digestion on the formation of angiotensin-i-converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein. *J. Dairy Sci.* 86:429–438.
- Wada, Y. y B. Lönnnerdal. 2014. Bioactive peptides derived from human milk proteins - mechanisms of action. *J. Nutr. Biochem.* 25:503–514.
- Williams, A. y J. M. Banks. 1997. Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) Isolated from Cheddar Cheese Manufactured in the United Kingdom. *Int. Dairy J.* 763-774

APÉNDICE 1

Prueba afectiva de bebidas fermentadas elaboradas con diferentes mezclas suero-leche

Género: F___ M___ Edad: _____ Fecha: _____

Por favor evalúe las 3 muestras de la bebida fermentada que tiene ante usted, en el orden de izquierda a derecha, y enjuague su boca antes de probar cada una de ellas, a continuación indique que tanto le gusta o disgusta marcando la frase apropiada para cada una.

- Me gusta mucho
- Me gusta
- No me gusta ni me disgusta
- Me desagarda
- Me desagarda mucho

- Me gusta mucho
- Me gusta
- No me gusta ni me disgusta
- Me desagarda
- Me desagarda mucho

- Me gusta mucho
- Me gusta
- No me gusta ni me disgusta
- Me desagarda
- Me desagarda mucho

Comentarios

¡Muchas gracias!

APÉNDICE 2

Formato de la prueba de preferencia de las bebidas lácteas fermentadas.

Edad _____

Fecha _____

¿Cada cuando consume usted bebidas lácteas fermentadas?

a) 1 vez al año o nunca

b) 1 vez al mes.

C) 1 vez por semana o más.

Ante usted tiene 4 muestras de bebidas, pruébelas de izquierda a derecha y evalúelas según corresponda considerando el valor más alto 9 para me gusta mucho y el más bajo 0 para me disgusta mucho. Entre cada muestra limpie su paladar con la galleta salada y el agua que se le proporciona.

Bebida número _____

Acidez

0 _____ 9

Textura

0 _____ 9

Sabor

0 _____ 9

Aceptabilidad general

0 _____ 9

Bebida número _____

Acidez

0 _____ 9

Textura

0 _____ 9

Sabor

0 _____ 9

Aceptabilidad general

0 _____ 9

Bebida número _____

Acidez

0 _____ 9

Textura

0 _____ 9

Sabor

0 _____ 9

Aceptabilidad general

0 _____ 9

Bebida número _____

Acidez

0 _____ 9

Textura

0 _____ 9

Sabor

0 _____ 9

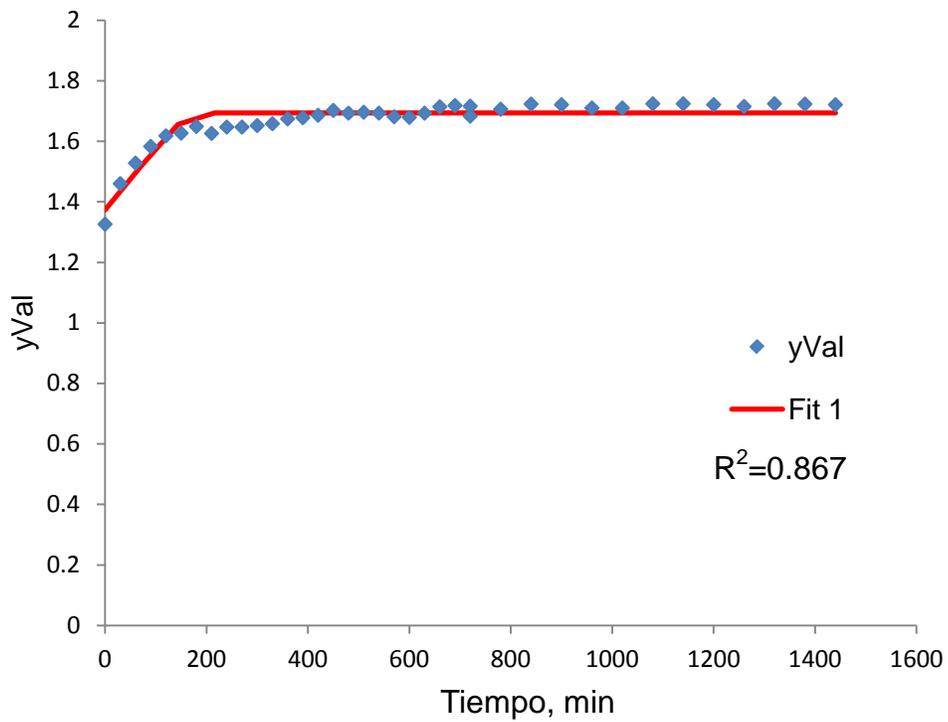
Aceptabilidad general

0 _____ 9

Comentarios. _____

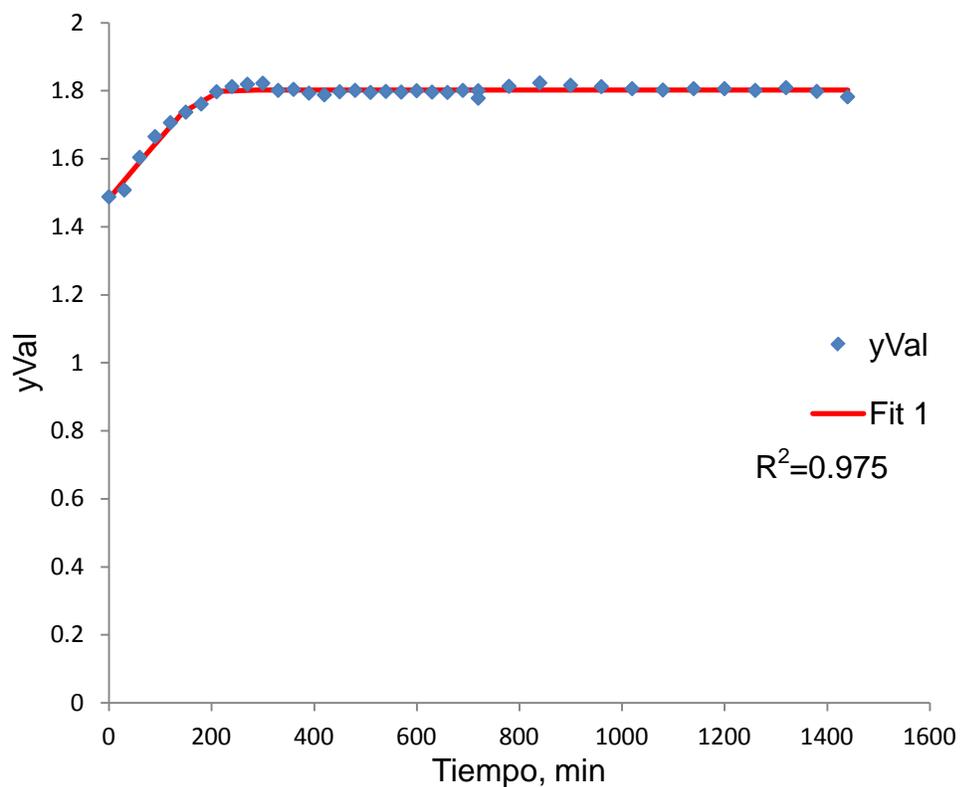
¡Muchas gracias!

APÉNDICE 3



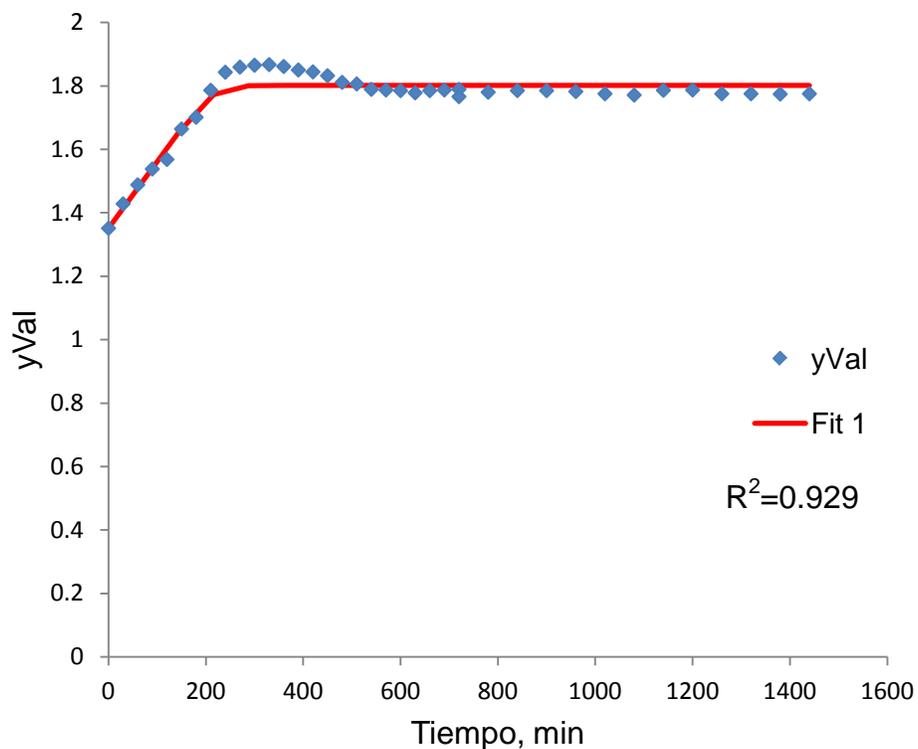
Cinéticas de crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* adiconado con Avicel® y mezcla de fosfooligosacáridos. Donde muestra la comparación con la ecuación de regresión no lineal calculada (Fit 1) y el real registrado (yVal) durante las 24 h de la cinética.

APÉNDICE 4



Cinéticas de crecimiento de *Bifidobacterium lactis* adiconado con Avicel® y mezcla de fosfooligosacáridos. Donde muestra la comparación con la ecuación de regresión no lineal calculada (Fit 1) y el real registrado (yVal) durante las 24 h de la cinética.

APÉNDICE 5



Cinéticas de crecimiento de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* adiconado con Avicel® y mezcla de fosfooligosacáridos. Donde muestra la comparación con la ecuación de regresión no lineal calculada (Fit 1) y el real registrado (yVal) durante las 24 h de la cinética.

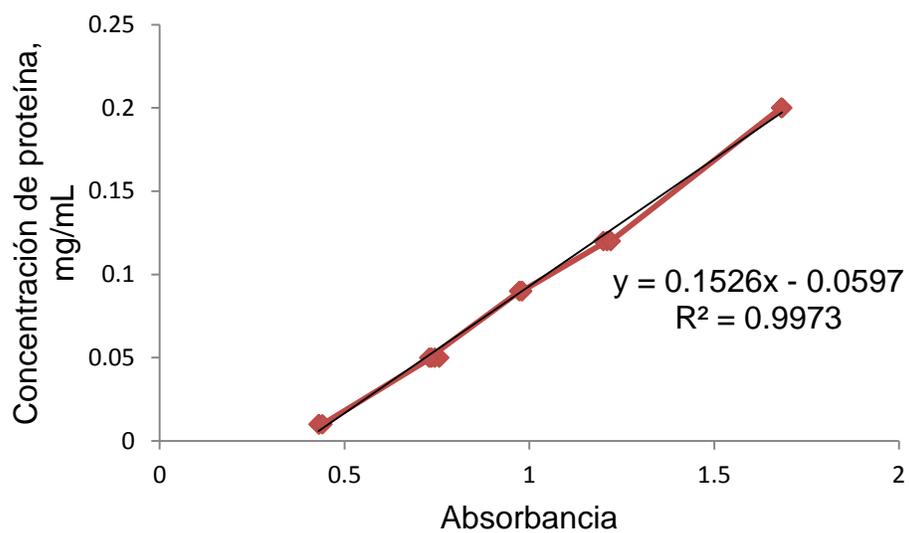
APÉNDICE 6

Prueba de ordenamiento de las bebidas fermentadas analizadas por el estadístico de prueba Chi cuadrada de Person.

Tratamientos	Ordenamiento			
	1°	2°	3°	4°
BCT1	12	22	22	24
ABC	11	22	26	20
ABT4	16	24	22	23
Control	42	13	11	14
p	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05

Los valores corresponden al número de panelistas que eligieron cada bebida según la posición dada.

APÉNDICE 7



Curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA).

APÉNDICE 8

Cromatograma característico para la determinación de la actividad ECA inhibitoria, de la muestra control (agua grado HPLC), en el análisis de los filtrados peptídicos de las bebidas lácteas fermentadas.



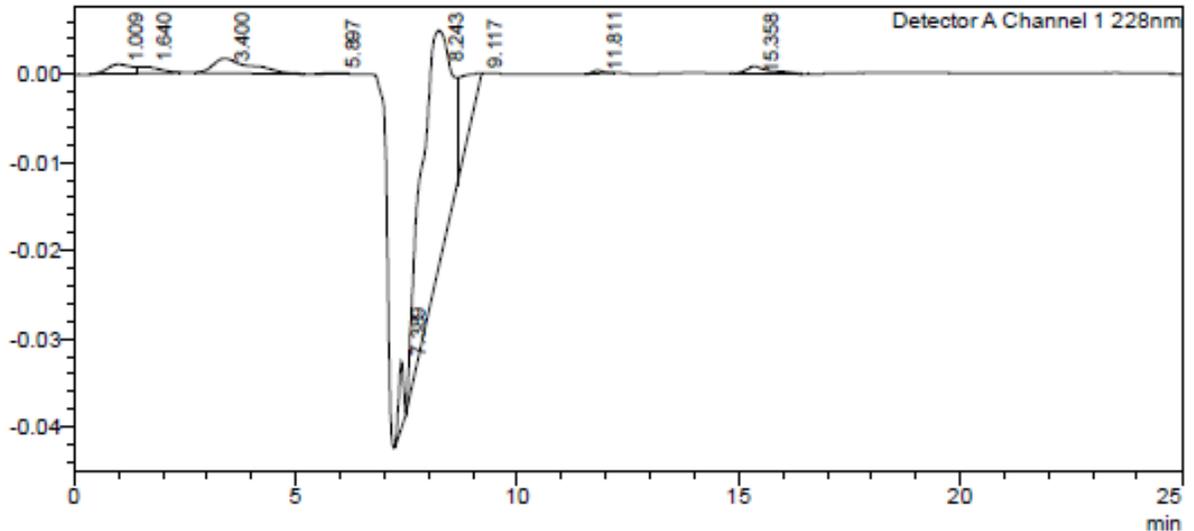
Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name	: blanco180414-1	Sample Type	: Unknown
Sample ID	: blanco180414-1	Acquired by	: System Administrator
Data Filename	: blanco180414-1.lcd	Processed by	: System Administrator
Method Filename	: %inhibicionECA.lcm		
Batch Filename	: ECA-1.lcb		
Vial #	: 1-1		
Injection Volume	: 50 uL		
Date Acquired	: 4/17/2014 9:34:28 PM		
Date Processed	: 4/17/2014 9:59:29 PM		

<Chromatogram>

AU



APÉNDICE 9

Cromatograma característico para la determinación de la actividad ECA inhibitoria de los filtrados péptidicos de las bebidas lácteas fermentadas. Donde se muestra el pico de la ECA al tiempo de retención de 9.841y el del ácido hipúrico al minuto 17. 271.



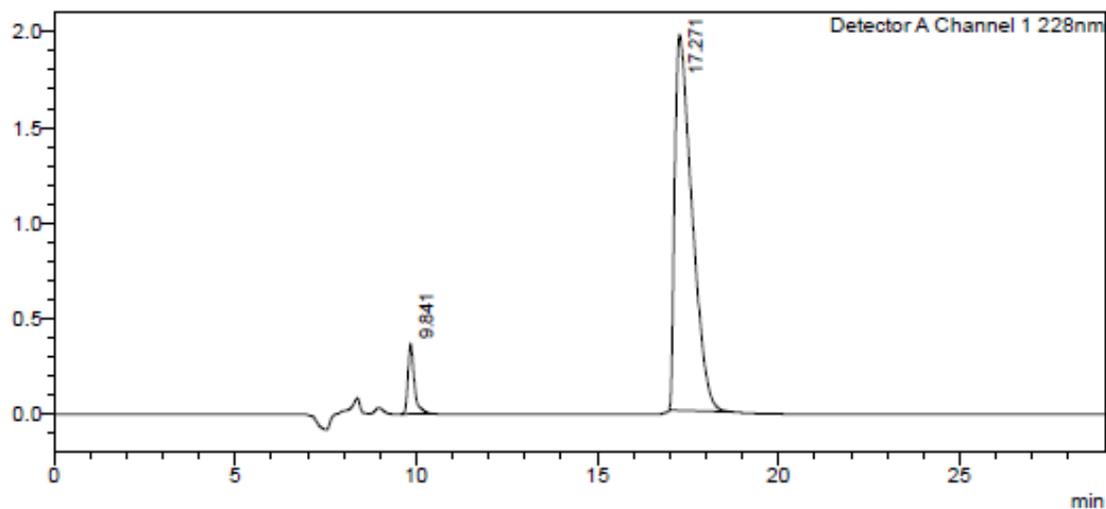
Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name	: C1L3S2	Sample Type	: Unknown
Sample ID	: 50mg	Acquired by	: System Administrator
Data Filename	: C4L3S4-1.lcd	Processed by	: System Administrator
Method Filename	: %inhibicionECA.lcm		
Batch Filename	: ac.hipurico.lcb		
Vial #	: 1-54		
Injection Volume	: 50 uL		
Date Acquired	: 11/30/2013 12:34:43 PM		
Date Processed	: 12/5/2013 2:03:10 PM		

<Chromatogram>

AU



APÉNDICE 10

Cromatograma característico de la muestra blanco en el análisis de los perfiles peptídicos totales y de aminoácidos aromáticos, de los filtrados de las bebidas lácteas fermentadas.



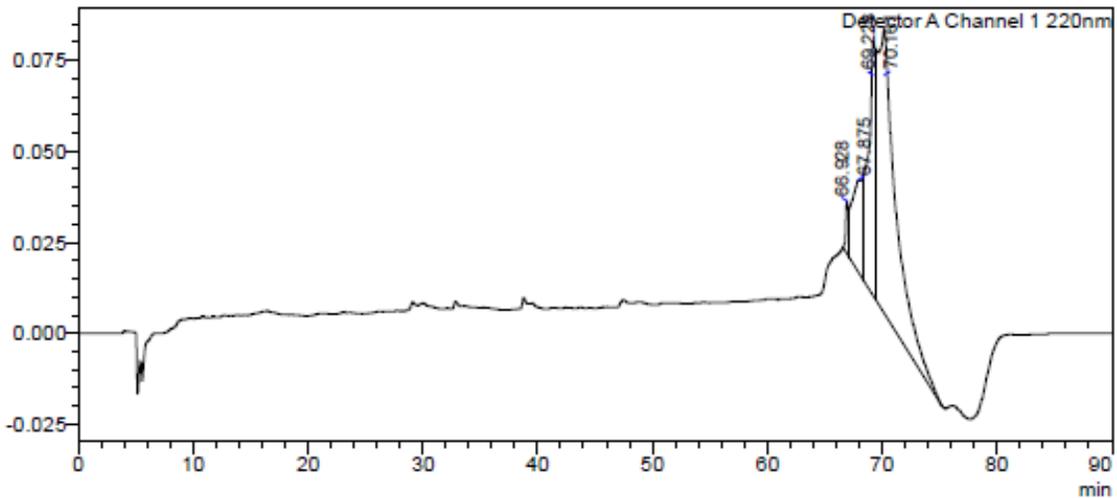
Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name	: BALNCOP4	Sample Type	: Unknown
Sample ID	: BALNCOP4	Acquired by	: System Administrator
Data Filename	: BALNCOP4.lcd	Processed by	: System Administrator
Method Filename	: biopeptidos.lcm		
Batch Filename	: perfilesbebidas.lcb		
Vial #	: 1-26		
Injection Volume	: 50 uL		
Date Acquired	: 12/21/2013 8:52:03 AM		
Date Processed	: 12/21/2013 10:22:04 AM		

<Chromatogram>

AU



APÉNDICE 11

Cromatograma característico generado en una de las muestras de los filtrados de las bebidas lácteas fermentadas, del perfil peptídico total (220 nm) y aminoácidos con anillos aromáticos (280 nm)

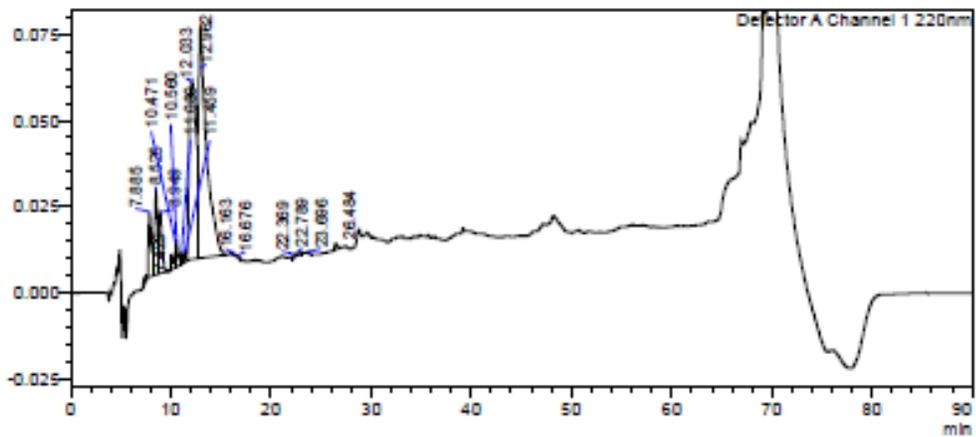
SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

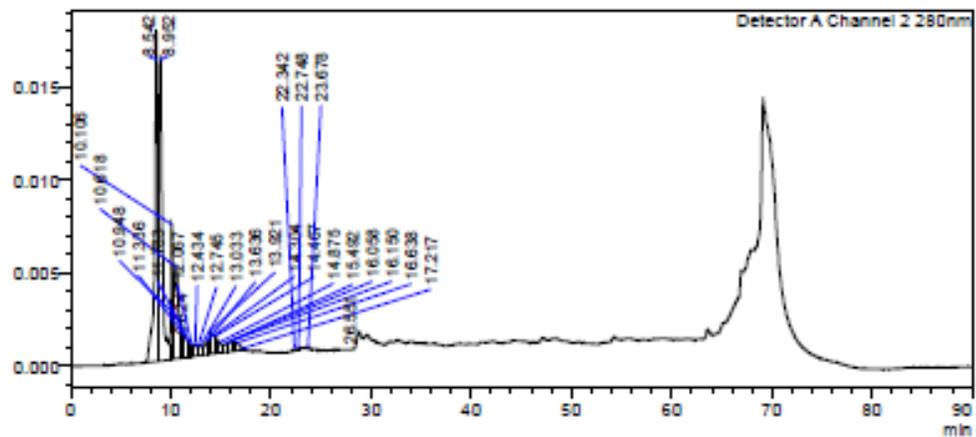
Sample Name	: perfilbebida30	Sample Type	: Unknown
Sample ID	: perfilbebida30	Acquired by	: System Administrator
Data Filename	: perfilbebida30.lcd	Processed by	: System Administrator
Method Filename	: blopeptidos.lcm		
Batch Filename	: perfilesbebidas.lcb		
Vial #	: 1-33		
Injection Volume	: 50 uL		
Date Acquired	: 12/21/2013 8:58:51 PM		
Date Processed	: 1/14/2014 10:51:17 AM		

<Chromatogram>

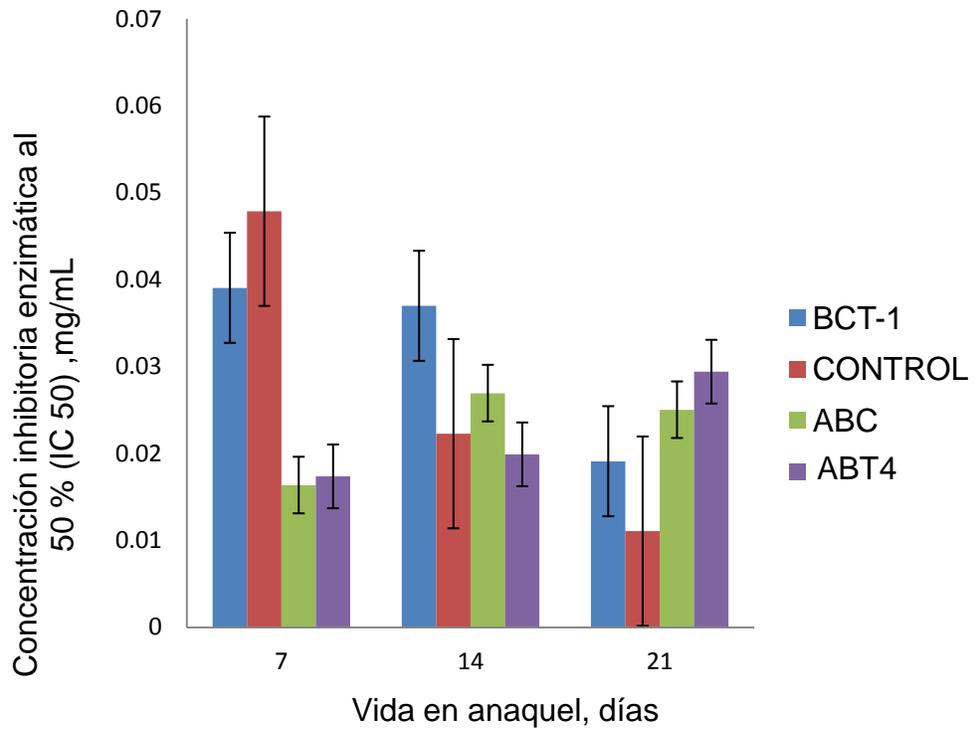
AU



AU



APÉNDICE 12



Concentración peptídica necesaria para inhibir el 50 % (IC_{50}) de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en las bebidas a base de suero fermentadas con probióticos. Donde control-sin probióticos, A-*Lactobacillus acidophilus*, B-*Bifidobacterium lactis*, C-*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, T-*Streptococcus thermophilus*. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$).