

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



**APLICACIÓN DE ULTRASONIDO DE ALTA INTENSIDAD EN LA FORMULACIÓN DE UNA
BEBIDA FUNCIONAL DE LACTOSUERO-AVENA**

POR:

M. C. ANA LUISA HERRERA PONCE

DISERTACIÓN PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR IN PHILOSOPHIA

ÁREA MAYOR: TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

AGOSTO DE 2020



Aplicación de ultrasonido de alta intensidad en la formulación de una bebida funcional de lactosuero. Disertación presentada por Ana Luisa Herrera Ponce como requisito parcial para obtener el grado de Doctor in Philosophia, ha sido aprobado y aceptada por:

Ph.D. Carlos Ortega Ochoa
Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología

D.Ph. Agustín Corral Luna
Secretario de Investigación y Posgrado

Ph.D Iván Adrián García Galicia
Coordinador Académico

Ph.D. Alma Delia Alarcón Rojo
Presidente

12 de Agosto de 2020

Fecha

Comité:

Ph.D. Iván Salmerón Ochoa

Dr. José Carlos Rodríguez

Figueroa

D.Ph. Joel Domínguez Viveros

Ph.D. Iván Adrián García Galicia

© Derechos Reservados

AUTOR. ANA LUISA

HERRERA PONCE

DIRECCIÓN: PERIFÉRICO

FRANCISCO R. ALMADA

KM. 1, CHIHUAHUA, CHIH.,

MÉXICO C.P. 31453

AGOSTO 2020

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecer a DIOS por darme fortaleza, paciencia, prudencia, sabiduría, entendimiento, perseverancia, inteligencia, amor, luz, en fin, las virtudes necesarias, cada vez que lo he necesitado. Por hacerse presente tan tangiblemente en este camino de investigación.

A mis papás que siempre han sido mi punto de partida y llegada, mi fortaleza, ejemplo a seguir y mi fuente de amor. A mis hermanos por cuidarme y apoyarme siempre. A David y David Jr. porque han soportado los sacrificios que conlleva esta formación, porque siempre me esperan y me reciben con amor. Por ser un instrumento de Dios en mi vida.

A mi directora de tesis la Dra. Alma Alarcón por saber cómo encaminarme y ser un gran ejemplo de que se puede ser excelente en el trabajo sin dejar a un lado la sencillez y el profesionalismo. Por su invaluable apoyo en la persistencia y conclusión de este proyecto.

Al Dr. José Carlos Rodríguez Figueroa y a mi Co-director el Dr. Iván Salmerón, porque me aceptaron y supieron impulsarme para iniciar este proyecto. A los demás miembros de mi comité porque siempre tuvieron la disposición de guiarme; Ph.D. Iván García Galicia y Ph.D. Joel Domínguez Viveros.

A las titulares de los laboratorios donde desarrollé la mayor parte de la investigación: Dra. América Chávez Martínez porque siempre fui bien recibida, me escuchó cada vez que fue necesario y brindó un agradable ambiente de trabajo. A la Dra. Virginia Nevárez Morillón porque desde maestría me recibió en el laboratorio, compartió material y más que nada conocimientos. A todos los investigadores que de alguna y valiosa forma colaboraron en este proyecto: Dr. Agustín Corral, Dr. Rogelio Sánchez, Dr. Eduardo Santellano, Dra. Mariana Huerta, Dr. Luis Carrillo y M.C. Juliana Juárez.

A todo el personal administrativo y académico de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua porque desde que inicié me hicieron sentir parte de la facultad; por las enseñanzas y el apoyo.

A todas las personas que a lo largo de estos años me impulsaron a continuar a pesar de las circunstancias en contra.

Finalmente, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a mi alma mater la Universidad Autónoma de Chihuahua que impulsan y apoyan creación de conocimiento a través de la investigación científica. Y así como el lema de la Universidad enuncia: “Luchar para lograr, lograr para dar”, deseo poder compartir el conocimiento que he adquirido.

DEDICATORIA

A Dios Padre Todopoderoso y a la Virgen María, mi fuente inagotable de amor.

CURRICULUM VITAE

La autora nació el 18 de abril de 1988 en la Ciudad de Chihuahua, Chihuahua, México.

2006-2010	Estudios de Licenciatura en Ingeniería Química en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua.
2011-2013	Estudios de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua.
2015 - 2020	Estudiante graduada del programa de Doctorado in Philosophia con área mayor en Tecnología de Productos de Origen Animal, de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

RESUMEN GENERAL

APLICACIÓN DE ULTRASONIDO DE ALTA INTENSIDAD EN LA FORMULACIÓN DE UNA BEBIDA FUNCIONAL DE LACTOSUERO-AVENA

POR:

M. C. Ana Luisa Herrera Ponce

Doctor in Philosophia en Producción Animal

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

En esta investigación se formularon bebidas de lactosuero-avena con la aplicación de ultrasonido. Se comprobó que la combinación de 35, 50 y 65% de lactosuero-avena y la aplicación de ultrasonido (40 kHz y 11W/cm²) durante 0, 3 o 10 min son adecuadas para elaborar bebidas probióticas con *L. casei*. Por presentar las mejores características, se eligió la combinación 50% lactosuero con 50% avena para las siguientes fases de la investigación. En lactosuero, la aplicación de ultrasonido de (40 kHz y 11 W/cm²) a 25 o 55 °C durante 23 min, generó mejor actividad antioxidante que cuando se aplicó durante 10 min o se pasteurizó. En bebidas de lactosuero-avena, la aplicación de ultrasonido (24 kHz) durante 15 min a 23 o 154 W no tuvo efecto sobre propiedades fisicoquímicas y antioxidantes. Pero la aplicación de estas condiciones de ultrasonido con la pasteurización a 65°C por 30 min, resultó producir mejor actividad antioxidante en las bebidas lactosuero-avena. La adición de 1.5% v/v de saborizante vainilla mejoró la aceptación sensorial. Finalmente se determinó la vida de anaquel y el efecto de la aplicación de ultrasonido (24 kHz y 23 W) por 3 o 15 min y la adición

de 1 o 2% v/v de inulina, en bebidas lactosuero-avena sobre el pH, acidez titulable, actividad antioxidante, actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina durante el almacenamiento a 4 °C. Se definió una vida de anaquel de 14 días a 4 °C. En general, la bebida con 1% de inulina y 15 min de ultrasonido presentó las mejores características funcionales y sensoriales.

GENERAL ABSTRACT

APPLICATION OF HIGH INTENSITY ULTRASONUND ON FUNCTIONAL BEVERAGE OF WHEY AND OAT

BY:

ANA LUISA HERRERA PONCE

In this research, whey-oat beverages were formulated with the application of ultrasound. The complementary combination of 35, 50 and 65% of whey-oat and the application of ultrasound (40 kHz and 11W/cm²) for 0, 3 or 10 min were found to be suitable for making probiotic beverages with *L. casei*. Overall, the 50% whey with 50% oat combination was chosen for the next phase of the research. In whey, the application of ultrasound (40 kHz and 11W/cm²) at 25 or 55 °C for 23 min, generated better antioxidant activity than when applied for 10 min or pasteurized. In whey-oat beverages, the application of ultrasound (24 kHz) for 15 min at 23 or 154 W had no effect on physicochemical and antioxidant properties. But the application of these ultrasound conditions with pasteurization at 65 °C for 30 min, turned out to produce better (P<0.05) antioxidant activity in the whey-oat beverages. The addition of 1.5% v/v of vanilla flavoring improved sensory acceptance. Finally, the shelf life and the effect of applying ultrasound (24 kHz) at 23 W for 3 or 15 min and the addition of 1 or 2% w/v of inulin were determined in whey-oat beverages on pH, titratable acidity, antioxidant activity, inhibitory activity of the angiotensin converting enzyme during storage at 4 °C. The shelf life of the beverage was 14 days at 4 °C. In general, the beverage with 1% w/v inulin and 15 min of ultrasound presented the best functional and sensory characteristics.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN GENERAL.....	vii
GENERAL ABSTRACT.....	ix
LISTA DE CUADROS.....	xiv
LISTA DE GRÁFICAS.....	xvi
LISTA DE FIGURAS DEL APÉNDICE.....	xvii
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Lactosuero.....	4
Avena.....	10
Ultrasonido.....	12
LITERATURA CITADA.....	15
ARTÍCULO PUBLICADO. EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS DERIVADOS DE LAS PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO EN LA SALUD: UNA REVISIÓN.....	23
RESUMEN.....	24
ABSTRACT.....	25
INTRODUCCIÓN.....	26
Sistema Cardiovascular.....	28
Sistema Endócrino.....	37
Sistema Inmunológico.....	38
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	53
LITERATURA CITADA.....	54
ESTUDIO 1. DESARROLLO DE UNA BEBIDA DE LACTOSUERO- AVENA PRE-TRATADA CON ULTRASONIDO Y SUPLEMENTADA CON <i>Lactobacillus casei</i>	61
RESUMEN.....	62
ABSTRACT.....	64
INTRODUCCIÓN.....	66
MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
Preparación del Probiótico.....	69
Formulación de las Bebidas de Lactosuero-Avena.....	70

Tratamiento Ultrasónico.....	72
Proceso de Fermentación.....	72
Actividad Antioxidante.....	75
Análisis Sensorial.....	75
Análisis Estadístico.....	76
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	78
Proceso de Fermentación.....	78
Actividad Antioxidante.....	84
Análisis Sensorial.....	88
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	99
LITERATURA CITADA.....	100
ESTUDIO 2. ULTRASONIDO DE ALTA INTENSIDAD VS. PASTEURIZACIÓN EN LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y FUNCIONALES DE LACTOSUERO Y DE BEBIDAS DE LACTOSUERO-AVENA.....	106
RESUMEN.....	107
ABSTRACT.....	109
INTRODUCCIÓN.....	111
MATERIALES Y MÉTODOS.....	113
Primera Etapa. Obtención y Análisis del Lactosuero.....	113
Obtención del lactosuero.....	113
Tratamientos.....	114
Análisis microbiológico.....	116
Actividad antioxidante.....	117
Segunda Etapa. Preparación y Evaluación de Bebidas de Lactosuero-Avena.....	118
Formulación	118
Análisis sensorial.....	120
Tratamientos.....	121
Aplicación de ultrasonido.....	121
Caracterización fisicoquímica.....	121
Análisis proximal.....	122
Actividad antioxidante.....	122
Análisis Estadístico.....	123

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	125
Primera Etapa. Evaluación del Lactosuero.....	125
Lactosuero.....	125
Análisis microbiológico.....	125
Actividad antioxidante.....	129
Segunda etapa. Evaluación de Bebidas de Lactosuero-Avena.	132
Análisis sensorial.....	132
Caracterización fisicoquímica	137
Análisis proximal.....	140
Actividad antioxidante.....	144
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	149
LITERATURA CITADA.....	150
ESTUDIO 3. INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE INULINA Y EL TIEMPO DE ULTRASONIDO EN PROPIEDADES FUNCIONALES DE UNA BEBIDA DE LACTOSUERO-AVENA DURANTE LA VIDA DE ANAQUEL.....	157
RESUMEN.....	158
ABSTRACT.....	160
INTRODUCCIÓN.....	162
MATERIALES Y MÉTODOS.....	165
Formulación de la Bebida de Lactosuero-Avena	165
Tratamientos.....	167
Aplicación de Ultrasonido.....	167
Análisis Sensorial.....	167
Prueba de aceptabilidad.....	168
Prueba de preferencia.....	168
Vida de Anaquel.....	169
Actividad Antioxidante.....	169
Actividad Inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina (AIECA).....	170
Análisis Estadístico.....	171
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	173
Características de la Avena y del Lactosuero	173

pH.....	173
Acidez titulable.....	175
Actividad antioxidante.....	176
Actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (AIECA).....	179
Vida de Anaquel de Bebidas Funcionales de Lactosuero-Avena	182
Actividad Antioxidante.....	188
Actividad Inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina (AIECA).....	192
Análisis Sensorial.....	198
Prueba de aceptabilidad.....	198
Prueba de preferencia.....	202
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	206
LITERATURA CITADA.....	207
APÉNDICE A.....	217
APÉNDICE B.....	220
APÉNDICE C.....	222

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición química del lactosuero bovino.....	8
2	Perfil proteico del lactosuero.....	27
3	PBDL evaluados <i>in vivo</i> con influencia en el sistema cardiovascular.....	31
4	PBDL evaluados <i>in vitro</i> con influencia en el sistema cardiovascular.....	32
5	PBDL evaluados <i>in vitro</i> con influencia en el sistema endócrino.....	39
6	PBDL evaluados <i>in vitro</i> con influencia en el sistema inmunológico.....	46
7	Composición y tratamiento de bebidas de lactosuero/avena para la formulación de bebidas probióticas.....	73
8	Efecto de la proporción lactosuero/avena y tiempo de ultrasonido sobre el pH, la población y el crecimiento de <i>L. casei</i> en bebidas probióticas (media \pm E. E.).....	79
9	Efecto de la proporción lactosuero/avena y tiempo de ultrasonido en la actividad antioxidante de bebidas probióticas (media \pm E. E.).....	85
10	Efecto de la proporción lactosuero/avena y tiempo de ultrasonido en la aceptación sensorial de bebidas probióticas (media \pm E.E.).....	89
11	Tratamientos empleados para determinar el efecto del ultrasonido y la pasteurización en la calidad microbiológica y actividad antioxidante de lactosuero bovino.....	115
12	Efecto del ultrasonido y la pasteurización en la calidad microbiológica de lactosuero bovino (media \pm E. E.).....	126
13	Efecto de la temperatura y tiempo de ultrasonido y la comparación con la pasteurización en la actividad antioxidante de lactosuero bovino (media \pm E. E.).....	130
14	Efecto de la adición de saborizante vainilla en la aceptación sensorial de una bebida funcional de lactosuero-avena (media \pm E.E.).....	133
15	Efecto del ultrasonido y la pasteurización en características fisicoquímicas de bebidas funcionales de lactosuero-avena (media \pm E.E.).....	138

16	Efecto del ultrasonido y la pasteurización en la composición proximal de bebidas funcionales de lactosuero-avena (media \pm E.E.).....	141
17	Efecto del ultrasonido y la pasteurización en la actividad antioxidante de bebidas funcionales de lactosuero-avena (media \pm E. E.).....	145
18	Caracterización fisicoquímica y funcional de los ingredientes mayoritarios de bebidas de lactosuero-avena durante el almacenamiento a 4 °C (media \pm E. E.).....	174
19	Efecto de la aplicación de ultrasonido y la adición de inulina en la acidez titulable y pH de bebidas funcionales de lactosuero-avena durante el almacenamiento a 4 °C (media \pm E. E.).....	185
20	Efecto de la aplicación de ultrasonido y la adición de inulina en la actividad antioxidante de bebidas funcionales de lactosuero-avena durante el almacenamiento a 4 °C (media \pm E. E.).....	190
21	Efecto del tiempo de ultrasonido y la adición de inulina en la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina de bebidas funcionales de lactosuero-avena durante el almacenamiento a 4 °C (media \pm E. E.).....	194
22	Efecto del tiempo de ultrasonido y la adición de inulina en la aceptación sensorial de bebidas funcionales de lactosuero-avena (media \pm E.E.).....	200
23	Efecto del tiempo de ultrasonido y la adición de inulina en la preferencia sensorial de bebidas funcionales de lactosuero-avena.....	204

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica		Página
1	Análisis de correspondencia de la aceptación sensorial realizada por 43 panelistas no entrenados y el tratamiento aplicado a bebidas probióticas de lactosuero/avena. Los tratamientos corresponden a % v/v lactosuero / % avena / min de ultrasonido (40 kHz, 11 W/cm ²).....	90
2	Análisis de correspondencia de la aceptación sensorial realizada por 43 panelistas no entrenados y la proporción lactosuero/avena en bebidas probióticas. Los tratamientos corresponden a 35/65 = 35 % v/v lactosuero con 65 % v/v avena; 50/50 = 50 % v/v lactosuero con 50 % v/v avena; 65/5 = 65 % v/v lactosuero con 35 % v/v avena.....	92
3	Análisis de correspondencia de la aceptación sensorial realizada por 43 panelistas no entrenados y la aplicación de diferente tiempo ultrasonido en bebidas probióticas de lactosuero/avena. El tiempo de ultrasonido (40 kHz, 11 W/cm ²) corresponde a SinUS = 0 min; MedioUS = 3 min; AltoUS = 10 min.....	93
4	Análisis de correspondencia de la aceptación sensorial realizada por 25 panelistas mujeres no entrenadas y el tratamiento aplicado en bebidas probióticas de lactosuero/avena. Los tratamientos corresponden a % v/v lactosuero / % avena / min de ultrasonido (40 kHz, 11 W/cm ²).....	95
5	Análisis de correspondencia de la aceptación del olor realizada por 59 panelistas y la cantidad de saborizante natural de vainilla (Vai) en bebidas funcionales de lactosuero-avena.....	135
6	Análisis de correspondencia de la aceptación sensorial realizada por 123 panelistas no entrenados y el porcentaje (p/v) de inulina y tiempo (min) de ultrasonido (24 kHz y 23 W) en bebidas funcionales de lactosuero-avena. LSA/1/3 = 1% inulina/3 min ultrasonido LSA/2/3 = 2% inulina/3 min ultrasonido; LSA/1/15 = 1% inulina y 15 min ultrasonido; LSA/2/15 = 2% inulina y 15 min ultrasonido.....	202
7	Análisis de correspondencia del ordenamiento de preferencia sensorial realizada por 123 panelistas no entrenados y el porcentaje (p/v) de inulina y tiempo (min) de ultrasonido (24 kHz y 23 W) en bebidas funcionales de lactosuero-avena. LSA/1/3 = 1% inulina/3 min ultrasonido LSA/2/3 = 2% inulina/3 min ultrasonido; LSA/1/15 = 1% inulina y 15 min ultrasonido; LSA/2/15 = 2% inulina y 15 min ultrasonido. Orden de preferencia. P5= Primer lugar; P4=Segundo lugar; P3=Tercer lugar; P2=Cuarto lugar; P1=Quinto lugar.	205

LISTA DE FIGURAS DEL APÉNDICE

Figura		Página
1	Formato para la primera sesión de la evaluación sensorial de aceptación general de bebidas probióticas de lactosuero/avena (Lawless y Heymann, 2010). 624=65% v/v lactosuero/35% avena/0 min ultrasonido; 391=50% v/v lactosuero/50% avena/10 min ultrasonido; 857=65% v/v lactosuero/35% avena/10 min ultrasonido; 549=35% v/v lactosuero/65% avena/3 min ultrasonido.	218
2	Formato para la segunda sesión de la evaluación sensorial de aceptación general de bebidas probióticas de lactosuero/avena (Lawless y Heymann, 2010). 487=65% v/v lactosuero/35% avena/3 min ultrasonido; 212=35% v/v lactosuero/65% avena/0 min ultrasonido; 954=35% v/v lactosuero/65% avena/10 min ultrasonido.....	219
3	Formato para la tercera sesión de la evaluación sensorial de aceptación general de bebidas probióticas de lactosuero/avena (Lawless y Heymann, 2010). 646=50% v/v lactosuero/50% avena/0 min ultrasonido; 429=50% v/v lactosuero/50% avena/3 min ultrasonido.....	220
4	Formato de la evaluación sensorial de aceptación de bebidas funcionales de lactosuero-avena (Lawless y Heymann, 2010). Porcentajes (v/v) de saborizante natural vainilla: 946 (361) = 1%; 283 (534) = 1.5%; 715 (829) = 2%....	221
5	Formato de la evaluación sensorial de aceptación de bebidas funcionales de lactosuero-avena con inulina y ultrasonido o pasteurización (Lawless y Heymann, 2010). Porcentaje (p/v) de inulina/tiempo (min) de ultrasonido: 519 (117, 379) = 1/3; 335 (287, 524) = 2/3; 662 (991, 705) = 1/15. Control 082 (139, 647) = pasteurización 65°C por 30 min sin inulina.....	223
6	Formato de la prueba de ordenamiento de preferencia sensorial con escala hedónica de cinco puntos para la evaluación de bebidas de lactosuero-avena con inulina y ultrasonido o pasteurización (Lawless y Heymann, 2010).....	226

INTRODUCCIÓN GENERAL

En los últimos años ha aumentado el reconocimiento del papel clave que posee la alimentación en la prevención y tratamiento de enfermedades (Granato *et al.*, 2020), aunado a un aumento en el nivel de educación, ingresos y conciencia sobre la salud. Esto ha generado que los consumidores elijan alimentos funcionales como alimentos más saludables (Kaur y Singh, 2017). Un alimento funcional es aquel que va más allá de los efectos de una nutrición adecuada, de manera que mejora el bienestar y/o la reducción del riesgo de padecer una enfermedad (Roberfroid, 2002). Dentro del mercado de alimentos funcionales, las bebidas funcionales son la categoría más desarrollada por la factibilidad para satisfacer las demandas del consumidor en cuanto al contenido nutricional, la presentación y la facilidad de distribución (Corbo *et al.*, 2014). En este sentido, se han formulado bebidas funcionales a base de lactosuero (Souza *et al.*, 2019). El lactosuero es el líquido color amarillo-verdoso que resulta de la separación de la leche cuajada por la precipitación de las caseínas durante la elaboración de queso (NOM-183-SCFI-2012). La generación de suero es alta, por cada kilogramo de queso se obtienen nueve kilogramos de suero (Prazeres *et al.*, 2012) y debido a la composición (Madureira *et al.*, 2007) posee un potencial contaminante con una demanda química de oxígeno (DQO) mayor de 60,000 ppm y bioquímica de oxígeno (DBO) superior a 30,000 (Smithers, 2008). Por consiguiente, la formulación de bebidas funcionales de lactosuero es una alternativa atractiva de uso. Además, se ha encontrado que los péptidos de las proteínas del lactosuero confieren beneficios a la salud, específicamente en el sistema cardiovascular, inmunológico, endócrino y digestivo (Adjonu *et al.*, 2013).

No obstante, el lactosuero posee un sabor poco aceptable (Bulatović *et al.*, 2012) y las características sensoriales deben mejorarse para incluirlo en formulaciones para consumo humano. Se ha observado que los consumidores le dan más importancia al sabor que a los beneficios a la salud (Verbeke, 2006). Este subproducto lácteo se ha mezclado con frutas (Souza *et al.*, 2019), hortalizas, cereales, saborizantes y estabilizantes (Baruzzi *et al.*, 2017). Entre los ingredientes con los que se ha combinado está la avena (Sharma *et al.*, 2017) que también posee beneficios a la salud como disminución del colesterol, control y prevención de diabetes y disminución en el riesgo de enfermedades del corazón, entre otros (Gokavi *et al.*, 2005). Este último es causado por un péptido bioactivo presente en la avena (Nakurte *et al.*, 2013; Lammi *et al.*, 2019). La generación de péptidos bioactivos se ha realizado a través de la adición de enzimas digestivas (Adjonu *et al.*, 2013), fermentación (Alvarado Carrasco y Guerra, 2010) y tecnologías emergentes como el ultrasonido (Uluko *et al.*, 2013). El tratamiento con ultrasonido confiere mejor calidad nutricional (Guimarães *et al.*, 2019) y sensorial que el proceso de pasteurización (Barukčić *et al.*, 2015; Mohammadi *et al.*, 2014). Se ha identificado que el ultrasonido fracciona las proteínas por la ruptura de las interacciones hidrofóbicas intermoleculares (Jambrak *et al.*, 2014) mediante el fenómeno de cavitación acústica que implica la formación, crecimiento y colapso de burbujas de aire en el medio, resultando cambios de presión y produciendo cambios físicos, químicos y mecánicos en sistemas líquidos (Chandrapala *et al.*, 2012). Las investigaciones sobre el desarrollo de alimentos funcionales tienen tendencia al alza, los estudios relativos a la comprobación de los beneficios a la salud con técnicas *in vitro* y/o estudios

clínicos no han ido a la par (Birch y Bonwick, 2019). Debido a todo lo antes mencionado, el objetivo general fue desarrollar una bebida funcional sensorialmente aceptable, de lactosuero-avena, utilizando ultrasonido de alta intensidad como tecnología asistente. Las principales características determinadas fueron la evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante y la actividad antihipertensiva, además de la evaluación sensorial.

REVISIÓN DE LITERATURA

Lactosuero

La elaboración de queso genera un subproducto denominado suero o lactosuero (Smithers, 2015) que es un líquido amarillo-verdoso (Carvalho *et al.*, 2013) y resulta de la separación de la leche cuajada por la precipitación de las caseínas durante la elaboración de queso (NOM-183-SCFI-2012). La leche está compuesta por dos grupos de proteínas: caseínas (80%) y proteínas séricas o del suero (20%) (Smithers, 2015); las caseínas se encuentran en la leche en forma de micelas y están formadas por fracciones proteicas (α S-1, α S-2, β y κ) y sales minerales (calcio y fósforo). La estabilidad de las caseínas se debe a que fijan agua, lo que resulta en la hidratación de la micela (siendo la κ -caseína que queda por la parte externa de la micela, responsable de la interacción con el agua) a través de interacciones tipo puente de hidrógeno; aunque también se ha reportado que es debido a la cantidad de cargas negativas que provoca que se repelan entre ellas (Dalglish y Corredig, 2012).

Para elaborar queso, la precipitación de las caseínas se realiza principalmente por acidificación o por hidrólisis enzimática. La más empleada es la hidrólisis enzimática, donde se adiciona renina (compuesta principalmente por quimosina) conocida también como “cuajo” que corta el enlace 105-106 (fenilalanina-metionina) de la κ -caseína liberando la fracción (106-169) denominada caseinopéptido o glicomacropéptido que se solubiliza en la fase acuosa (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011). Una vez que se ha hidrolizado la mayoría de la κ -caseína, aproximadamente del 60 al 90%, según el tipo de queso, se presenta la sinéresis del coágulo de leche por la eliminación del suero, dando

como resultado final suero y cuajada; a esta última posteriormente se le denominará queso (Dalglish y Corredig, 2012).

La cantidad de lactosuero generado dependerá de la cantidad de queso producido. El rendimiento en la elaboración de queso es del 10% al 40%, dependiendo del tipo de queso. Pero por lo general es del 10%, de tal forma que al procesar 10 litros de leche se obtiene 1 kg de queso y 9 kg de suero (Hadiyanto *et al.*, 2014). A nivel mundial, se estima que la producción de suero lácteo es de alrededor de 130 millones de toneladas por año (Wakai y Almenar, 2015) y se espera que tenga un crecimiento anual de más del 2% (OECD-FAO, 2015). De manera similar, en México la producción de queso ha mostrado una tendencia al alza en los últimos años. Además, a nivel mundial el queso es el tercer producto lácteo más producido, antecedido por la leche descremada y la leche evaporada-condensada (FAOSTAT, 2015).

De acuerdo con la FAO, la manufactura de queso representa uno de los principales productos agroindustriales (FAOSTAT, 2015). Sin embargo, este proceso industrial conlleva a la generación de desechos contaminantes. En primera instancia, la acción enzimática de la quimosina sobre la fracción κ -caseína de la leche produce la separación de las proteínas caseicas de las séricas, generando así lactosuero (un potencial contaminante). Esta etapa es la más común en la industria manufacturera de queso. Asimismo, existen industrias que transforman el lactosuero en quesos como el ricota, lo que permite retener proteína sérica y grasa. Sin embargo, este proceso genera el denominado “segundo suero” (otro potencial contaminante). Por otro lado, el agua que se

emplea en las labores de limpieza de las plantas productoras de queso, también constituye un desecho relevante (Carvalho *et al.*, 2013).

Inicialmente al lactosuero se le daba un uso medicinal ya que se usaba para atender problemas gastrointestinales o dermatológicos. Sin embargo, el aumento en la producción de queso lo ha convertido en un problema ambiental (Smithers, 2008) debido a la alta carga de materia orgánica, sólidos suspendidos, grasa, acidez y la concentración de sales minerales (Prazeres *et al.*, 2014), además, del gran volumen que se produce (Carvalho *et al.*, 2013).

La composición, principalmente por lactosa, genera altos niveles de demanda bioquímica de oxígeno (DBO, 27,000 - 60,000 mg/L) y demanda química de oxígeno (DQO, 50,000 – 120,000 mg/L) (Prazeres *et al.*, 2012; Mukhopadhyay y Guha, 2015). Es importante mencionar que de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-001-ECOL-1996) los límites máximos permisibles de las DBO son de 30 mg/L, por lo que en algunos países es ilegal descargar este subproducto al medio ambiente sin un tratamiento previo (Smithers, 2015).

Históricamente, los efluentes de lactosuero han sido manejados de diversas formas. Una de las prácticas más comunes consiste en la descarga directa al suelo o a los cuerpos de agua, tales como ríos y lagos, o bien, al alcantarillado municipal sin tratamiento previo. Se ha reportado que del lactosuero producido internacionalmente, el 50% no es tratado y es descartado como desecho a efluentes (Wakai y Almenar, 2015). El lactosuero también ha sido empleado en la alimentación de animales (Smithers, 2015). Por otro lado, la falta de acondicionamiento del lactosuero previo al arribo a las plantas tratadoras de agua, implica la posibilidad de que se presente el problema de eutrofización

(enriquecimiento de aguas con nutrientes, en este caso debido al nitrógeno y fósforo), lo que disminuye la eficiencia del proceso (Prazeres *et al.*, 2012).

La composición química del lactosuero varía en función de los componentes de la leche y del tipo de queso del que procede (PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012). De acuerdo con el proceso de precipitación de las caseínas durante el proceso de elaboración de queso, el lactosuero puede clasificarse en dulce y ácido (Carvalho *et al.*, 2013). El suero ácido resulta cuando el queso es elaborado con ácidos orgánicos, minerales o bacterias ácido lácticas y tiene un pH de 4.6. Por otra parte, el suero dulce se obtiene cuando las caseínas precipitan por la acción de enzimas de origen vegetal, animal o microbiano y tiene un pH de 5.6 (FAO, 2015).

En el Cuadro 1 se muestra la composición química de los dos tipos de lactosuero de leche bovina. El principal componente de ambos sueros es la lactosa, representando un 75% de los sólidos totales. La principal diferencia entre ambos sueros es que el denominado dulce posee mayor cantidad de lactosa y proteína. Mientras que el lactosuero ácido presenta mayor contenido de minerales (Panesar *et al.*, 2007). En cuanto a las proteínas que integran el lactosuero éstas corresponden a la fracción soluble en agua de la proteína de la leche (Jain *et al.*, 2013). Estas proteínas incluyen el glicomacropéptido que es la fracción (106-169) soluble de la k-caseína; y las proteínas séricas β -lactoglobulina (50%), α -lactoalbúmina (12%), inmunoglobulinas IgA, IgG e IgM (10%) y seroalbúmina (5%) (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011).

Cuadro 1. Composición química del lactosuero bovino

Componente	Tipo de lactosuero	
	Dulce	Ácido
Sólidos totales (g/L)	63.0 - 70.0	63.0 - 70.0
Proteína total (g/L)	6.0 - 10.0	6.0 - 8.0
Calcio (g/L)	0.4 - 0.6	1.2 - 1.6
Fosfatos (g/L)	1.0 - 3.0	2.0 - 4.5
Lactosa (g/L)	46.0 - 52.0	44.0 - 46.0
pH	> 5.6	4.5 - 5.1

(Panesar *et al.*, 2007; Smithers, 2015)

En menor proporción se encuentran lactoferrina, lactoperoxidasa, lisosima, relaxina, citoquinas, factores de crecimiento y aminoácidos libres (González Siso, 1996; Smithers, 2015).

En los últimos años, el lactosuero se ha procesado para producir concentrados de proteína (WPC, concentrado de proteína de suero, por sus siglas en inglés) y aislados (WPI, aislado de proteína de suero, por sus siglas en inglés) proteicos. Ambos son en algunos casos, usados para conferir o mejorar propiedades funcionales tales como viscosidad, espumado, solubilidad, así como propiedades nutricionales de productos alimenticios (Smithers, 2015). Pero recientemente, el lactosuero se ha utilizado como medio de cultivo para la producción de combustibles (Hadiyanto *et al.*, 2014; Moreno *et al.*, 2015; Rajoria *et al.*, 2015; Saxena *et al.*, 2015), ácido láctico (Álvarez *et al.*, 2010; Koutinas *et al.*, 2014), probióticos (García *et al.*, 2020), bacteriocinas (Kumari Garsa *et al.*, 2014) y en la formulación de bebidas (Schoina *et al.*, 2020). En estudios *in vivo* han reportado que tanto las proteínas del lactosuero, como los péptidos derivados, tienen beneficios a la salud (Hernández-Ledesma *et al.*, 2014; Bhat *et al.*, 2015; Brandelli *et al.*, 2015).

Las bebidas de lactosuero tienen un alto potencial en el mercado por el valor nutricional debido a la composición de aminoácidos esenciales y proteínas, también se usa para bebidas refrescantes por el contenido de minerales como calcio y fosfatos (Gad *et al.* 2013); y por el bajo costo que posee por ser un subproducto de desecho (Khaire y Gogate, 2018). No obstante, por su naturaleza, el lactosuero tiene un sabor salado y para mejorar el sabor, se pueden retirar las sales. Sin embargo, esto podría tener implicaciones negativas en las

propiedades funcionales (Bobková *et al.*, 2016). En base a lo anterior, la investigación orientada al desarrollo de bebidas funcionales de lactosuero está proponiendo combinarlo con ingredientes como frutas, hortalizas y/o cereales, además de saborizantes y estabilizantes para la conseguir la aceptación sensorial por parte de los consumidores (Albano y Nicoletti, 2017).

Avena

La avena es una planta herbácea anual de la familia de las gramíneas (SIAP, 2015). A nivel mundial, la mayor parte de la cosecha se emplea en alimento para ganado por la dificultad que representa descascarillar el grano (Fuller, 2004; SIAP, 2015). El grano de avena tiene una estructura parecida al trigo y está compuesto por pericarpio (25% del peso del grano), cubiertas de la semilla (salvado), capa hialina, germen y endospermo (63% del peso grano) (Hoseney, 1991). El segundo mayor componente de la avena, antecedido por el almidón, es la fibra (32% de su peso) de la cual un 55% es fibra soluble y un 45% es fibra insoluble en agua (Muñoz *et al.*, 2011). La fibra soluble está integrada por mucílago, pectina, hemicelulosa, arabinosilanos y β -glucanos.

La avena es una de las principales fuentes de β -glucano; en 1977 la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por las siglas en inglés), estableció que los alimentos que contengan 0.75 g de este componente son considerados funcionales (Verschuren, 2002). Entre los beneficios del β -glucano para la salud del humano se encuentran la disminución del colesterol sérico y la del índice glucémico postprandial (Arendt y Zannini, 2013). Además, entre las principales funciones de la fibra soluble de la avena se encuentran que favorece el crecimiento de bacterias probióticas, incrementa la

viscosidad del bolo alimenticio, permite un vaciado gástrico más lento y mejor absorción de nutrientes (Hughes et al, 2008). Además, contribuye a disminuir el colesterol uniéndose a los ácidos biliares producidos en el hígado y acelerando su excreción del cuerpo. La avena también contribuye a controlar la diabetes disminuyendo la absorción del azúcar proveniente del intestino en la sangre, a aumentar la sensibilidad de las células a la insulina, transportar azúcar a la sangre y disminuir el riesgo de padecer enfermedades del corazón (Gokavi et al., 2005). Esto último, debido a un efecto antioxidante del ácido ferúlico mediante la captación de radicales libres (Alrahmany et al., 2013) y a un péptido denominado lunasina (Nakurte et al., 2013). Asimismo, la avena tiene actividad antimicrobiana, inhibiendo el crecimiento de *E. coli* (Alrahmany et al., 2013) y actividad antihipertensiva mediante la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (IC₅₀ de 30 a 50 µM/mL) por la acción péptidos provenientes de las proteínas globulinas y prolaminas (Cheung et al., 2009).

Diversos autores han formulado bebidas a base de avena. Salmerón et al. (2014) emplearon avena malteada para formular una bebida probiótica de avena, probaron que es un sustrato idóneo para estas bacterias y el desarrollo de compuestos como acetaldehído y diacetilo, responsables del sabor en yogurt. Sin embargo, estos autores recomiendan realizar un análisis sensorial que pueda avalar el desarrollo completo de esta bebida. De igual manera, Lee et al. (2016) trabajaron con la detección de compuestos volátiles a partir de la fermentación de avena y reportaron el perfil de éstos a lo largo de la fermentación con el fin de determinar el tiempo de fermentación en base a los compuestos desarrollados, que impactan en la calidad sensorial del producto. Por su parte, Saha et al. (2017)

observaron que la fermentación de avena para la formulación de una bebida, confirió mejor aceptación sensorial en comparación con el control (sin fermentación). También se han formulado bebidas de avena con otros ingredientes como plátano (Goncerzewicz *et al.*, 2016), durazno e inulina (Güler-Akin *et al.*, 2016), concentrado de proteína de suero (Sharma *et al.*, 2017), entre otros.

Por otra parte, se ha reportado que el consumo de una bebida con proteína de lactosuero y β -glucano de avena reduce la glucosa a corto plazo, aunque no afecta la respuesta glucémica general (Amiruddin *et al.*, 2020).

Ultrasonido

El ultrasonido es la energía generada mediante vibración por ondas acústicas con una frecuencia de 20 kHz o más, encima del espectro audible del humano (Arvanitoyannis *et al.*, 2015). Dicha energía se propaga de forma oscilante a través de una serie de compresiones y rarefacciones de las moléculas del medio por donde se propaga (Pardo Rueda, 2012). Se divide en dos categorías: de baja intensidad y de alta intensidad. El primero, llamado también de diagnóstico o de baja potencia, maneja frecuencias altas de 100 kHz a 1 MHz (Pardo Rueda, 2012) y potencias menores a 5 W (Mittelstein *et al.*, 2020). Mientras que el de alta intensidad o de alta potencia, usa frecuencias de 20 a 500 kHz y potencias mayores a 1 W (Awad *et al.*, 2012). El fundamento del ultrasonido de alta intensidad se basa en el fenómeno de cavitación causado por la alta potencia y baja frecuencia, que ocasionan que el ciclo de rarefacción exceda las fuerzas de atracción de las moléculas del líquido o medio de propagación, separándolas lo suficiente para crear cavidades o burbujas de vacío. Estas

burbujas van creciendo a medida que pasa el tiempo y durante la fase de expansión, algunas partículas de vapor del medio entran en las burbujas, pero no todas estas partículas salen durante la etapa de compresión; lo cual ocasiona un aumento en el tamaño de la burbuja. Las burbujas crecen en un periodo de varios ciclos de compresiones y rarefacciones hasta alcanzar un tamaño máximo relacionado con la frecuencia aplicada (Mason *et al.*, 2003). Posteriormente, en el siguiente ciclo de compresión las burbujas de cavitación colapsan, a este fenómeno se le denomina implosión. Durante la implosión se generan temperaturas de 5000 °C y presiones de 2000 atm o miles de bares aproximadamente, además causa cambios en las moléculas cercanas al punto de colapso (Ashokkumar *et al.*, 2009).

En la industria alimentaria, el ultrasonido de baja intensidad se ha usado principalmente para el control y aseguramiento de calidad en productos como frutas, hortalizas, aceites, cereales, lácteos y derivados. El desarrollo de la aplicación de ultrasonido se basa en minimizar el procesamiento, maximizar la calidad y asegurar la calidad e inocuidad (Awad *et al.*, 2012). Por otro lado, el ultrasonido de alta intensidad y baja frecuencia (20 a 50 kHz) se ha aplicado en procesos como extracción de compuestos (Chemat *et al.*, 2017), homogeneización, solubilización, hidrólisis, etc. (Awad *et al.*, 2012; Corbo *et al.*, 2014). Mientras que en lácteos se ha usado para inactivar enzimas y bacterias (Villamiel y de Jong, 2000). Además, para homogenizar, debido a que el ultrasonido reduce el tamaño de las micelas y el volumen hidrodinámico de las proteínas, por las altas fuerzas de corte ocasionadas por la cavitación (O'Sullivan *et al.*, 2014). El ultrasonido, a frecuencias mayores de 2 MHz, se ha usado para

medir los cambios en la composición químicas durante procesos de fermentación (Ojha *et al.*, 2017) y para mejorar procesos de hidrólisis (Uluko *et al.*, 2015). Adicionalmente propicia la transferencia de masa y la permeabilidad celular; y por consiguiente eficiente el proceso y las tasas de producción durante la fermentación (Ojha *et al.*, 2017). El ultrasonido también se ha usado para el mejoramiento de propiedades reológicas de espumas de proteínas (Tan *et al.*, 2015), emulsificación (Chandrapala *et al.*, 2012) y calidad de alimentos (Peña-González *et al.*, 2017). En los procesos de fermentación del yogurt, el ultrasonido aumenta la capacidad de retención de agua, aumenta la viscosidad, disminuye la sinéresis, reduce el tiempo de fermentación, aumenta la viabilidad de microorganismos de interés y acelera la hidrólisis de lactosa. La mejora de las propiedades estructurales se puede atribuir a que el ultrasonido modifica la capacidad de interacción entre los glóbulos de grasa; y entre éstos con las micelas de caseína. Se ha demostrado que la cavitación provocada por el ultrasonido inactiva microorganismos, aunado a que consume menos tiempo y energía durante el proceso y los alimentos sonicados presentan menores variaciones nutricionales (Mohammadi *et al.*, 2014). Finalmente, la aplicación del ultrasonido en la industria alimenticia representa un alternativa eficiente y confiable para mejorar la calidad de los alimentos además de tener el potencial de desarrollar productos con funcionalidades únicas (Soria y Villamiel, 2010).

LITERATURA CITADA

- Adjonu, R., G. Doran, P. Torley y S. Aggboola. 2013. Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. *Food Chem.* 136: 1435-1443.
- Albano, K. M. y V. R. Nicoletti. 2017. Ultrasound impact on whey protein concentrate-pectin complexes and in the o/w emulsions with low oil soybean content stabilization. *Ultrason. Sonochem.* 41: 562-571.
- Alrahmany, R., T. J. Avis y A. Tsopmo. 2013. Treatment of oat bran with carbohydrases increases soluble phenolic acid content influences antioxidant and antimicrobial activities. *Food Res. Int.* 52: 568-574.
- Alvarado Carrasco, C. y M. Guerra. 2010. Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *An. Venez. Nutr.* 23: 45-50.
- Álvarez, M. M., E.J. Aguirre-Ezkauriatza, A. Ramírez-Medrano y Á. Rodríguez Sánchez. 2010. Kinetic analysis and mathematical modeling of growth and lactic acid production of *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* in milk whey. *J. Dairy Sci.* 93: 5552-5560.
- Amiruddin, N. E. N., M. N. Zahary, R. Bhaskar y A. M. Mhd Jalil. 2020. Glycaemic index, palatability and acceptability of energy beverages prepared with β -glucan and whey protein. *Food Res.* 4: 421-430.
- Arendt, E. y E. Zannini. 2013. Oats. En *Cereal grains for the food and beverage industries*. Arendt, E. y E. Zannini eds. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Cambridge, Reino Unido.
- Arvanitoyannis, I. S., K. V. Kotsanopoulos y A. G. Savva. 2015. Use of ultrasounds in the food industry—Methods and effects on quality, safety, and organoleptic characteristics of foods: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57: 109–128.
- Ashokkumar, M., J. Lee, B. Zisu, R. Bhaskarcharya, M. Palmer y S. Kentish. 2009. Hot topic: Sonication increases the heat stability of whey proteins. *J. Dairy Sci.* 92: 5353–5356.
- Awad, T. S., H. A. Moharram, O. E. Shaltout, D. Asker y M. M. Youssef. 2012. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Res Int.* 48: 410-427.
- Barukčić, I., K. L. Jakopović, z. Herceg, S. Karlović y R. Božanić. 2015. Influence of high intensity ultrasound on microbial reduction, physico-chemical

- characteristics and fermentation of sweet whey. *Innov Food Sci Emerg.* 27: 94-101.
- Baruzzi, F., S. de Candia, L. Quintieri, L. Caputo y F. De Leo. 2017. Development of a synbiotic beverage enriched with *Bifidobacteria* strains and fortified with whey proteins. *Front. Microbiol.* 8: 640.
- Bhat, Z. F., S. Kumar y H. F. Bhat. 2015. Bioactive peptides of animal origin: a review. *J. Food Sci. Technol.* 52: 5377-5392.
- Birch, C. S. y G. A. Bonwick. 2019. Ensuring the future of functional foods. *Int. J. Food Sci. Tech.* 54: 1467-1485.
- Bobková, A., M. Fikselová, T. Tóth y M. Bobko. 2016. Flavored whey beverages: preparation and evaluation of selected parameters. *Scientific Papers Animal Science Biotech.* 2: 195-199.
- Brandelli, A., D. Joner Daroit y A. P. Folmer Correa. 2015. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Res. Int.* 73: 149-161.
- Bulatović, M. L., M. B. Rakin, L. V. Mojović, S. B. Nikolić, M. S. Vukašinović Sekulić y A. P. Đukić Vuković. 2012. Selection of *Lactobacillus* strains for functional whey-based beverage production. *J. Food Eng.* 2: 705-711.
- Carvalho, F., A. R. Prazeres, y J. Rivas. 2013. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Sci. Total Environ.* 445: 385-396.
- Chandrapala, J., C. Oliver, S. Kentish y M. Ashokkumar. 2012. Ultrasonics in food processing. *Ultrason. Sonochem.* 19: 975-983.
- Chemat, F., N. Rombaut, A. G. Sicaire, A. Meullemiestre, A. S. Fabiano-Tixier y M. Abert-Vian. 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* 34: 540-560.
- Cheung, I. W. Y., S. Nakayama, M. N. K. Hsu, A. G. P. Samaranyaka y E. C. Y. Li-Chan. 2009. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates from oat (*Avena sativa*) proteins by *in silico* and *in vitro* analyses. *J. Agric. Food Chem.* 57: 9234–9242.
- Corbo, M. R., A. Bevilacqua, L. Petruzzi, F. P. Casanova y M. Sinigaglia. 2014. Functional beverages: The emerging side of functional foods. commercial trends, research, and health implications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13: 1192-1206.

- Dalgleish, D. G. y M. Corredig. 2012. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annu. Rev. Food. Sci. Technol.* 3: 449-467.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2015. Leche y productos lácteos: tipos y características. En: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/leche-y-productos-lacteos/tipos-y-caracteristicas/es/#.VPXtMvmUfZ0>. Consultado el 3 de febrero de 2015.
- FAOSTAT, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. División de Estadística. 2015. Producción/Ganadería procesada. En: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QP/S>. Consultado el 3 de marzo de 2015.
- Fuller, M. 2004. The encyclopedia of farm animal nutrition. 1a ed. Cabi Publishing, E. U. A.
- Gad, A. S., W. H. Emam, G. F. Mohamed y A. F. Sayd. 2013. utilization whey in production of functional healthy beverage "whey-mango beverages". *Am. J. Food Technol.* 83: 133-148.
- García, G., M. E. Agosto, L. Cavaglieri y C. Dogi. 2020. Effect of fermented whey with a probiotic bacterium on gut immune system. *J. Dairy Res.* 87: 134-137.
- Gokavi, S., L. Zhang, M. Huang, X. Zhao y M. Guo. 2005. Oat-based symbiotic beverage fermented by *L. plantarum*, *L. paracasei* ssp. *casei*, and *L. acidophilus*. *J Food Sci.* 70: 216-223.
- Goncerzewicz, A., Misisewicz, A., L. Owczarek, U. Jasinska y S. Skapska. 2016. The effect of a newly developed oat-banana fermented beverage with a beta-glucan additive on *ldhL* gene expression in *Streptococcus thermophilus* TKM3 KKP 2030p. *Curr. Microbiol.* 73: 773–780.
- González Siso, M.I. 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: review. *Bioresour. Technol.* 57: 1-11.
- Granato, D., F. J. Barba, D. B. Kovačević., J. M. Lorenzo, A. G. Cruz y P. Putnik. 2020. Functional Foods: Product development, technological trends, efficacy testing and safety. *Annu. Rev. Food Sci. T.* 11: 3.1–3.26.
- Guimarães, J. T. E. K. Silva, C. s. Ranadheera, J. Morales, R. S. L. Raices, M. C. Silva, M. S. Ferreira, M. Q. Freitas, M. A. A. Meireles y A. G. Cruz. 2019. Effect of high-intensity ultrasound on the nutritional profile and volatile compounds of a prebiotic soursop whey beverage. *Ultrason. Sonochem.* 55: 157-164.

- Güler-Akın, M. B., I. Ferliarslan y M. S. Akin. 2016. Apricot probiotic beverage yoghurt supplied with inulin and oat fiber. *Adv. Microbiol.* 6: 999-1009.
- Hadiyanto, D. Ariyanti, A. P. Aini y D. S. Pinundi. 2014. Optimization of ethanol production from whey through fed-batch fermentation using *Kluyveromyces marxianus*. *Energy Procedia.* 47: 108–112.
- Hernández-Ledesma, B., M. Ramos y J. A. Gómez-Ruiz. 2011. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Rumin. Res.* 101: 196-204.
- Hernández-Ledesma, B., M. J. García- Nebot, S. Fernández-Tomé, L. Amigo, e I. Recio. 2014. Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. *Int. Dairy J.* 38: 82-100.
- Hoseney, R. C. 1991. *Principios de ciencia y tecnología de los cereales.* 1a ed. Editorial Acribia S.A. España.
- Hughes, S. A., P. R. Shewry, G. R. Gibson, B. V. McCleary y R. A. Rastall. 2008. *In vitro* fermentation of oat and barley derived beta-glucans by human faecal microbiota. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 64: 482-493.
- Jain, S., R. Gupta y S. Jain. 2013. Development of low cost nutritional beverage from whey. *IOSR-JESTFT.* 5:73-88.
- Jambrak, A. R., T. M. Mason, V. Lelas, L. Paniwnyk y Z. Herceg. 2014. Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. *J. Food Eng.* 121: 15-23.
- Kaur, N. y D. P. Singh. 2017. Deciphering the consumer behavior facets of functional foods: A literature review. *Appetite.* 112: 167-187.
- Khaire, R. A. y P. R. Gogate. 2018. Intensified recovery of lactose from whey using thermal, ultrasonic and thermosonication pretreatments. *J. Food Eng.* 237: 240-248.
- Koutinas, M., M. Menelaou y E. N. Nicolaou. 2014. Development of a hybrid fermentation–enzymatic bioprocess for the production of ethyl lactate from dairy waste. *Bioresour. Technol.* 165: 343-349.
- Kumari Garsa, A., R. Kumariya, A. Kumar, P. Lather y S. Kapila. 2014. Industrial cheese whey utilization for enhanced production of purified pediocin PA-1. *LWT - Food Sci. Technol.* 59: 656-665.
- Lammi, C., G. Aiello, G. Boschini y A. Arnoldi. 2019. Multifunctional peptides for the prevention of cardiovascular disease: A new concept in the area of bioactive food-derived peptides. *J. Funct. Foods.* 55: 135-145.

- Lee, S. M., J. Oh, B. Hurh, G. Jeong, Y. Shin e Y. Kim. 2016. Volatile compounds produced by *Lactobacillus paracasei* during oat fermentation. J. Food Sci. 81: C2915-C2922.
- Madureira, A. R., C. I. Pereira, A. M. P. Gomes, M. E. Pintado y F. X. Malcata. 2007. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. Food. Res. Int. 40: 1197-1211.
- Mason, T. J., L. Paniwnyk y F. Chemat. 2003. Ultrasound as a preservation technology. En: Food Preservation Techniques. P. Zeuthen y L. Bøgh-Sørensen, eds. Woodhead Publishers, Cambridge Inglaterra.
- Mittelstein, D. R., J. Ye, E. F. Schibber, A. Roychoudhury, L. Troyas Martinez, H. Fekrazad, M. Ortiz, P.P. Lee, M. G. Shapiro y M. Gharib. 2020. Selective ablation of cancer cells with low intensity pulsed ultrasound. Appl. Phys. Lett.116: 013701- 013701-5.
- Mohammadi, V., M. Ghasemi-Varnamkhasti, R. Ebrahimi y M. Abbasvali. 2014. Ultrasonic techniques for the milk production industry. Measurement. 58: 93-102.
- Moreno, R., A. Escapa, J. Cara, B. Carracedo y X. Gómez. 2015. A two-stage process for hydrogen production from cheese whey: Integration of dark fermentation and biocatalyzed electrolysis. Int. J. Hydrogen Energ. 40: 168-175.
- Mukhopadhyay, R. y A. K. Guha. 2015. A comprehensive analysis of the nutritional quality of edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* grown in deproteinized whey medium. LWT - Food Sci. Technol. 61: 339-345.
- Muñoz, A., M. Gastl, M. Zarnkow y T. Becker. 2011. Optimization of the malting process of oat (*Avena sativa* L.) as a raw material for fermented beverages. Span. J. Agric. Res. 9: 510-523.
- Nakurte, I., I. Kirhnere, J. Namniece, K. Saleniece, L. Krigere, P. Mekss, Z. Vicupe, M. Bleidere, L. Legzdina y R. Muceniece. 2013. Detection of the lunasin peptide in oats (*Avena sativa* L). J. Cereal Sci. 57: 319-324.
- NOM-001-ECOL-1996. NORMA Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Disponible en: <http://www.economia-noms.gob.mx/normas/noms/1997/001-ecol.pdf>. Consultada el 19 de febrero de 2015.
- NOM-183-SCFI-2012. Producto lácteo y producto lácteo combinado- Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Disponible en:

http://www.dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5254843.
Consultada el 19 de febrero de 2015.

- OECD-FAO. 2015. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) y la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) de las Naciones Unidas. 2015. Agricultural outlook 2014-2023- Dairy. En: <http://www.agri-outlook.org/dairy.html>. Consultado el 20 de marzo de 2015.
- Ojha, K. S., T. J. Mason, C. P. O'Donnell, J. P. Kerry y B. K. Tiwari. 2017. Ultrasound technology for food fermentation applications. *Ultrason. Sonochem.* 34: 410-417.
- O'Sullivan, J., M. Arellano, R. Pichot e I. Norton. 2014. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of dairy proteins. *Food Hydrocoll.* 42: 386-396.
- Panesar, P. S., J. F. Kennedy, D. N. Gandhi y K. Bunko. 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chem.* 105: 1-14.
- Pardo Rueda, A. J. 2012. Cuantificación y caracterización de azúcares provenientes de *Dasyliirion leiophyllum* empleando diversas tecnologías de extracción. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih. México.
- Peña-González, E., A. D. Alarcón-Rojo, A. Rentería, I. García, E. Santellano, A. Quintero y L. Luna. 2017. Quality and sensory profile of ultrasound-treated beef. *Ital. J. Food Sci.* 29: 463-475.
- Prazeres, A. R., F. Carvalho y J. Rivas. 2012. Cheese whey management: A review. *J. Environ. Manage.* 110: 48-68.
- Prazeres, A. R., F. Carvalho, J. Rivas, M. Patanita y J. Dores. 2014. Reuse of pretreated cheese whey wastewater for industrial tomato production (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Agric. Water Manag.* 140: 87-95.
- PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012. Sistema producto leche - alimentos - lácteos - suero de leche (liquido o en polvo) - especificaciones y métodos de prueba. Disponible en: <http://www.canilec.org.mx/Circulares%202012/93del12/PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2011%20220312.pdf>. Consultada el 1 de abril de 2015.
- Rajoria, A., A. K. Chauhan y J. Kumar. 2013. Studies on formulation of whey protein enriched concentrated tomato juice beverage. *J. Food Sci. Technol.* 52: 885-893.

- Roberfroid, M. 2002. Functional food concept and its application to prebiotics. *Digest Liver Dis.* 34: S105-S110.
- Saha, P., P. R. Ray, P. K. Ghatak, S. K. Bag y T. Hazra. Physico-chemical quality and storage stability of fermented Chhana whey beverages. *Indian J. Dairy Sci.* 70: 398-403.
- Salmerón, I., K. Thomas y S. S, Panidella. 2014. Effect of substrate composition and inoculum on the fermentation kinetics and flavour compound profiles of potentially non-dairy probiotic formulations. *LWT - Food Sci. Technol.* 55: 240-247.
- Saxena, D., S. K. Chakraborty, L. Sabikhi y D. Singh. 2015. Process optimization for a nutritious low-calorie high-fiber whey-based ready-to-serve watermelon beverage. *J. Food Sci. Technol.* 52: 960-967.
- Schoina, V., A. Terpou, A. Papadaki, L. Bosnea, N. Kopsahelis y M. Kanellaki. 2020. Enhanced aromatic profile and functionality of cheese whey beverages by incorporation of probiotic cells immobilized on *Pistacia terebinthus* resin. *Foods.* 9: 1-16.
- Sharma, P., N. Trivedi e Y. Gat. 2017. Development of functional fermented whey–oat-based product using probiotic bacteria. *3 Biotech.* 7: 272.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2015. Cierre de la producción anual agrícola por estado. Avena Forrajera 2013. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351. Consultado el 19 de febrero de 2015.
- Smithers, G. W. 2008. Whey and whey proteins—from ‘gutter-to-gold’. *Int. Dairy J.* 18: 695-704.
- Smithers, G. W. 2015. Whey-ing up the options – Yesterday, today and tomorrow. *Int. Dairy J.* 48: 2-14.
- Soria, A. C. y M. Villamiel. 2010. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends Food Sci Technol.* 21: 323-331.
- Souza, F. P., C. F. Balthazar, J. T. Guimarães, T. C. Pimentel, E. A. Esmerino, M. Q. Freitas, R. S. L. Raices, M. C. Silva y A. G. Cruz. 2019. The addition of xyloligosaccharide in strawberry-flavored whey beverage. *LWT-Food Sci. Technol.* 109: 118-122.
- Tan, M. C., N. L. Chin, Y. A. Yusof, F. S. Taip y J. Abdullah. 2015. Characterization of improved foam aeration and rheological properties of ultrasonically treated whey protein suspension. *Int. Dairy J.* 43: 7-14.

- Uluko, H., H. Li, W. Cui, S. Zhang, L. Liu, J. Chen, Y. Sun, Y. Su y J. Lv. 2013. Response surface optimization of angiotensin converting enzyme inhibition of milk protein concentrate hydrolysates *in vitro* after ultrasound pretreatment. *Innov. Food Sci. Emerg.* 20: 133-139.
- Uluko, H., S. Zhang, L. Liu. M. Tsakama, J. Lu y J. Lu. 2015. Effects of thermal, microwave, and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates. *J. Funct. Foods.* 18: 1138-1146.
- Verbeke, W. 2006. Functional foods: Consumer willingness to compromise on taste for health?. *Food Qual. Prefer.* 17: 126-131.
- Verschuren, P. M. 2002. Functional foods: scientific and global perspectives. *Br. J. Nutr.* 88: 125-130.
- Villamiel, M y- P. de Jong. 2000. Influence of High-Intensity Ultrasound and Heat Treatment in Continuous Flow on Fat, Proteins, and Native Enzymes of Milk. *J. Agric Food Chem.* 48: 472-478.
- Wakai, M. y E. Almenar. 2015. Effect of the presence of montmorillonite on the solubility of whey protein isolate films in food model systems with different compositions and pH. *Food Hydrocoll.* 43: 612-621.

EFFECTOS FISIOLÓGICOS DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS DERIVADOS DE LAS PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO EN LA SALUD: UNA REVISIÓN

Por:

Herrera-Ponce A.L.¹, Alarcón-Rojo A.D.¹, Salmerón I.², Rodríguez-Figueroa J.C.³

¹ Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua.

² Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua.

³ Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Sonora.

Revista Chilena de Nutrición. 2019. 46:205-214.
<http://dx.doi.org/10.4067/s0717-75182019000200205>.

RESUMEN

EFFECTOS FISIOLÓGICOS DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS DERIVADOS DE LAS PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO EN LA SALUD: UNA REVISIÓN

POR:

M. C. ANA LUISA HERRERA PONCE

Doctorado in Philosophia en Producción Animal

Universidad Autónoma de Chihuahua

Facultad de Zootecnia y Ecología

Secretaría de Investigación y Posgrado

Presidente: Ph. D. Alma Delia Alarcón Rojo

El lactosuero es un subproducto derivado de la elaboración de queso. La calidad de la composición química de las proteínas del lactosuero las convierte en un sustrato ideal para la generación de péptidos con actividad biológica. La presente revisión tiene por objetivo analizar y discutir los efectos fisiológicos de los péptidos bioactivos derivados de las proteínas del lactosuero (PBDL) en la salud. Asimismo, este trabajo muestra detalladamente las estructuras químicas de las secuencias de los PBDL capaces de ejercer efectos favorables *in vitro* e *in vivo* e influir positivamente en los sistemas cardiovascular, endócrino e inmunológico. Sin embargo, las metodologías para generar PBDL de manera controlada, la dosificación y las concentraciones óptimas han sido poco exploradas. Por lo que es importante llevar a cabo investigación de frontera que permita avanzar el umbral del conocimiento vislumbrando la posibilidad de utilizar los PBDL como coadyuvantes en la prevención y tratamiento de enfermedades.

ABSTRACT

PHYSIOLOGICAL HEALTH EFFECTS OF WHEY PROTEIN-DERIVED

BIOACTIVE PEPTIDES:

A REVIEW

BY:

ANA LUISA HERRERA PONCE

Whey is a by-product of cheese production. The relevant chemical composition of whey proteins makes them an ideal substrate to release peptides with biological activity. The objective of this manuscript was to analyze and discuss the effects of whey-derived proteins bioactive peptides in health. Moreover, this review shows in detail sequences able to benefit human systems. Several *in vitro* and *in vivo* studies showed the capacity of these bioactive peptides to positively influence cardiovascular, endocrine and immune systems. However, the methodologies to obtain them in a controlled way, as well as dose and optimum concentrations have been scarcely explored. Therefore, it is necessary to conduct new research to improve knowledge that focuses on the possibility of using whey-derived bioactive peptides in the prevention and treatment of diseases.

INTRODUCCIÓN

El lactosuero es un subproducto generado durante la elaboración de queso. Este contiene los componentes químicos hidrofílicos de la leche (Smithers, 2015). En general, 1 kg de queso se produce a partir de 10 litros de leche, lo que genera 9 litros de lactosuero. Por otro lado, el consumo de queso va en aumento, por lo que se estima un incremento de 130 millones de toneladas de lactosuero por año (Prazeres *et al.*, 2012; OECD, 2013). El lactosuero se caracteriza por la calidad de los componentes químicos que lo conforman. Este subproducto está constituido por agua (93%, v/v), lactosa (4.5–5%, p/v), proteína (0.6-0.8%, p/v), lípidos (0.4-0.5%, p/v) y minerales (8–10% extracto seco) (Jeličić *et al.*, 2008), tales como calcio, magnesio, sodio, potasio, fosfato, citrato y cloruro (Nishanthi *et al.*, 2017).

Las proteínas del lactosuero juegan un papel importante en la nutrición, funcionalidad y actividad biológica (Smithers, 2015; Nishanthi *et al.*, 2017). El perfil proteico se muestra en el Cuadro 2. Estudios previos han reportado que las proteínas séricas presentan el mayor valor biológico (Wijayanti *et al.*, 2014). Estas poseen péptidos encriptados que podrían ser liberados a través de procesos fermentativos (Alvarado Carrasco y Guerra, 2010) o utilizando enzimas propias de la digestión natural o comerciales (Wijayanti *et al.*, 2014). La especificidad de la relación enzimas-proteínas del lactosuero condiciona factores tales como composición, hidrofobicidad del C-terminal, masa molecular y orden de los aminoácidos en las secuencias peptídicas (Théolier *et al.*, 2013), lo que impacta en la actividad biológica (Esmaeilpour *et al.*, 2017).

Cuadro 2. Perfil proteico del lactosuero

Proteína	Concentración (mg/L)	Peso molecular (kDa)	Cantidad de aminoácidos ²
β-lactoglobulina	1300 ¹	18,277 ³	162
α-lactoalbúmina	1200 ³	14,175 ¹	123
Seroalbúmina	400 ¹	66,267 ¹	582
Inmunoglobulinas	300-600 ¹	25,000- 50,000 ²	N. R.
Lactoferrina	50-70 ¹	80,000 ²	700
Lactoperoxidasa	8-20 ¹	70,000 ²	612
Glicomacropéptido	1200 ³	6700 ²	64
Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF I)	<0.001 ¹	N. R.	N. R.
Factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF II)	<0.001 ¹	N. R.	N. R.
Factor de crecimiento transformante beta (TGF-β)	<0.01 ¹	N. R.	N. R.
Betacelulina	<0.002 ¹	N. R.	N. R.

N. R.= No reportado. (1=Smithers, 2008, 2=Eigel *et al.*, 1984, 3=Brew *et al.*, 1970)

La interacción de estos factores puede generar péptidos inmunomoduladores, antihipertensivos, hipolipidémicos, antimicrobianos, antidiabéticos, anticarcinogénicos y antioxidantes, entre otros (Adjonu *et al.*, 2013; Brandelli *et al.*, 2015) capaces de beneficiar la funcionalidad de los sistemas cardiovascular, endócrino e inmunológico (Adjonu *et al.*, 2013). El presente trabajo tiene por objetivo analizar y discutir los efectos fisiológicos de los péptidos bioactivos derivados de las proteínas del lactosuero en la salud, así como explorar las características de las estructuras químicas de las secuencias peptídicas asociadas a las actividades biológicas. Las bases de datos de Elsevier, Springer, Wiley, Pubmed-NCBI, Scielo y Nature fueron consultadas para la elaboración de esta revisión. Los términos de búsqueda incluyeron: “whey peptides, angiotensin I-converting enzyme, antioxidant peptides, bioactive peptides sequences, cheese whey, antihypertensive activity, dipeptidyl peptidase-IV inhibitor, type 2 diabetes, immune function y whey protein hydrolysate”. Se seleccionaron los artículos publicados en inglés y español durante los años 1997 y 2018.

Sistema Cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel mundial (World Health Organization, 2017). Un tercio de la población mundial padece hipertensión arterial (Onuh *et al.*, 2015). En la actualidad, para controlar esta enfermedad se prescriben fármacos tales como captopril, enalapril, lisinopril y alacepril. Sin embargo, se ha demostrado que la medicación a largo plazo puede tener efectos secundarios adversos (Adjonu *et al.*, 2013). Por lo que es importante explorar alternativas innovadoras que permitan mitigar este

padecimiento (Daliri *et al.*, 2017). En los últimos años se ha estudiado el efecto de los péptidos en la salud. Los péptidos bioactivos derivados de las proteínas del lactosuero (PBDL) han demostrado influir positivamente sobre el sistema cardiovascular (Ibrahim *et al.*, 2017). Estos han mostrado actividades hipocolesterolémica, antitrombótica, antioxidante y antihipertensiva (Contreras *et al.*, 2011), por lo que su empleo podría coadyuvar en la prevención y el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Además, se ha reportado que los péptidos bioactivos de origen natural tienen alta afinidad por tejidos celulares por lo que son lentamente eliminados, lo que les confiere mayor efecto antihipertensivo que las sustancias sintéticas (Koyama *et al.*, 2014). Uno de los principales mecanismos que regulan la presión arterial es el sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. En donde la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) hidroliza la angiotensina I en angiotensina II, la cual es un potente vasoconstrictor que incrementa la presión arterial (Moslehisad *et al.*, 2013). En consecuencia, esta reacción produce la inactivación de la bradiquinina, que es un péptido vasodilatador (Brandelli *et al.*, 2015). Estudios previos han reportado la capacidad de los PBDL para inhibir competitivamente la actividad de la ECA, impidiendo así la liberación de angiotensina II y con ello vasodilatar el sistema (Jamdar *et al.*, 2010). Cabe señalar que estos péptidos también pueden disminuir la alta presión arterial a través de otros mecanismos tales como la inhibición de la enzima convertidora de la endotelina, regulación inducida por efecto opioide, inhibición de la renina, inmunomodulación y antioxidación (Nongonierma *et al.*, 2015). La efectividad antihipertensiva de las secuencias de los PBDL está asociada a las características estructurales. En general, estos se constituyen por

2-20 aminoácidos (Brandelli *et al.*, 2015), peso molecular (PM) menor a 3 kDa (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2012) e incluyen residuos hidrofóbicos y con carga positiva en el C-terminal (O'Loughlin *et al.*, 2014). El efecto *in vivo* e *in vitro* de estas secuencias sobre el sistema cardiovascular se muestra en los Cuadros 3 y 4. Estas muestran el origen de la fracción proteica del lactosuero, la enzima hidrolítica, así como la secuencia peptídica liberada asociada al mecanismo de acción y a la magnitud en la que ejerce la bioactividad. Hasta el momento, las secuencias peptídicas constituidas principalmente por aminoácidos hidrofóbicos IPA e YGLF han generado la máxima reducción de la presión arterial sistólica, 31 (Abubakar *et al.*, 1998) y 23 (Nurminen *et al.*, 2000) mm Hg, respectivamente. Cabe señalar que ambas secuencias se derivaron de la fracción α -lactoalbúmina. Por otro lado, se demostró que la presión arterial sistólica y diastólica no fue diferente significativamente entre los animales que ingirieron fracciones proteicas de leche fermentada con *L. lactis* NRRL B-5057 y captopril durante 2 semanas (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2012).

Asimismo, estudios *in vitro* demostraron que el péptido GYGGVSLPEW proveniente de la fracción α -lactoalbúmina, presentó alta capacidad ($IC_{50}=2 \mu M$) para inhibir la actividad de la ECA (Didelot *et al.*, 2006). Sin embargo, es necesario llevar a cabo ensayos *in vivo* que permitan establecer la magnitud de su potencial antihipertensivo. Otra de las actividades biológicas que impactan positivamente al sistema cardiovascular es la hipocolesterolemica. La suplementación con proteína de lactosuero hidrolizada aumentó el colesterol de alta densidad en un modelo murino (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2013).

Cuadro 3. PBDL evaluados *in vivo* con influencia en el sistema cardiovascular

Proteína	Enzima	Fragmento Peptídico	Secuencia de aminoácidos	Masa (Da)	IC ₅₀ (μM)	Disminución de presión (mm Hg)		Referencia
						PS	PD	
β-lactoglobulina bovina	Termolisina	103-105	LLF	392	79.8	20.0	N. R.	Hernández-Ledesma <i>et al.</i> , 2007
	Proteínasa K	78-80	IPA	300	N. R.	31	N. R.	Abubakar <i>et al.</i> , 2008
α-lactoalbúmina bovina	Pepsina y tripsina	50-53	YGLF	N. R.	126.0	23.0	17.0	Nurminen <i>et al.</i> , 2000; Sipola <i>et al.</i> , 2002
								Bacterias
Lactosuero	ácido lácticas y flavorzima	N. R.	YPYY	N. R.	90.9	15.9	15.6	Tsai <i>et al.</i> , 2008

PBDL = Péptidos bioactivos derivados de las proteínas del lactosuero

PS = Presión arterial sistólica

PD = Presión arterial diastólica

N. R. = No reportado

IC₅₀ = Concentración peptídica necesaria para inhibir la actividad de la enzima convertidora de la angiotensina un 50%

Cuadro 4. PBDL evaluados *in vitro* con influencia en el sistema cardiovascular

Proteína	Enzima	Fragmento peptídico	Secuencia de aminoácidos	Masa (Da)	Fundamento	IC ₅₀ (μM)	Referencia
β-lactoglobulina bovina	Tripsina	142-148	ALPMHIR	837		42.6	54
		11-14	DIQK	502	IECA	580	55
β-lactoglobulina bovina	Pepsina y Corolasa PP®	40-42	RVY	436		205.6	
		76-80	TKIPA	528		141	
		77-80	KIPA	427		141	
		78-83	IPAVFK	674		1029	
		96-100	DTDYK	640		946	
		122-124	LVR	386		14	
		146-148	HIR	424		42.6	

Proteína	Enzima	Fragmento peptídico	Secuencia de aminoácidos	Masa (Da)	Fundamento	IC ₅₀ (μM)	Referencia
β-lactoglobulina bovina	Proteasas (<i>Lactobacillus</i> <i>helveticus</i> LB10)	148-153	RLSFNP	N. R.	IECA	177.4	56
		15-20	VAGTWY	700	IECA	1682.0	46
β-lactoglobulina bovina	Tripsina	139-141	ALK	331		>1000	
		9-14	GLDIQK	673		580.0	
		125-135	TPEVDDEALEK	1240		>1000	
		78-83	IPAVFK	674		144.8	
		10-19	LDIQKVAGTW	N. R.	IECA	21.0	57
β-lactoglobulina bovina	Termoasa, Accelerzyme® CPG, Peptidasa R y ProteAX	12-19	IQKVAGTW	N. R.		51	
		95-99	LDTDY	N. R.		121	
		140-147	LKALPMH	N. R.		11	
		149-155	LSFNPTQ	N. R.		106	
	Corolasa PP®	24-26	MAA	292.	IECA	515.5	58

Proteína	Enzima	Fragmento peptídico	Secuencia de aminoácidos	Masa (Da)	Fundamento	IC ₅₀ (μ M)	Referencia
β - lactoglobulina bovina		15-18	VAGT	347		610	
β - lactoglobulina caprina	Termolisina	46-53	LKPTPEGN	854	IECA	>2700	59
		122-125	LVRT	488		2470	
		103-105	LLF	392		79.8	
		58-31	LQKW	573		34.7	
β - lactoglobulina caprina	Pepsina	113-122	PEQSLACQCL	N. R.	IECA	4.45	15
β - lactoglobulina ovina	Tripsina	1-8	IIVTQTMK	933	IECA	70.8	60
		71-77	IIAEKTk	803		67.6	
		84-91	IDALNENK	916		71.2	
		92-100	VLVLDTDYK	1064		56.4	

Proteína	Enzima	Fragmento peptídico	Secuencia de aminoácidos	Masa (Da)	Fundamento	IC ₅₀ (μM)	Referencia
		(61-69)S-	WENGECAEK (S-S)	2618		56.5	
		S(149-162)	LAFNPTQLNGECHV				
		(61-70)S-	WENGECAEKK (S-S)	2748		56.5	
		S(149-162)	LAFNPTQLNGECHV				
		21-40	SLAMAASDISLLDAQSAPLR	2030		50.7	
		41-60	VYVEELKPTPEGNLEILLQK	2311		50.7	
		102-124	YLLFCMENSAEPEQSLACQCLVR	2648		43.6	
		71-75	IIAEK ¹	574		67.6	
	Termoasa	17-26	GYGGVSLPEW		IECA	2	57
α-lactoalbúmina bovina	PC10F, Peptidasa R, ProteAX y	104-110	WLAHKAL			29	

Proteína	Enzima	Fragmento peptídico	Secuencia de aminoácidos	Masa (Da)	Fundamento	IC ₅₀ (µM)	Referencia
	Accelerzyma®						
	CGP						
	Proteasas	104-108	WLAHK	N. R.		N. R.	61
α-	(<i>Candida</i>	17-26	GYGGVSLPEW	N. R.		2.0	
lactoalbúmina	<i>parapsilosis</i> y						
caprina	<i>Lactobacillus</i>						
	<i>paracasei</i>)						
Lactoferrina	Pepsina y	130-135	GILRPY	717.4	IECE	52.0	62
bovina	tripsina	186-192	REPYFGY	930.4		40.0	

PBDL = Péptidos bioactivos derivados de las proteínas del lactosuero. N. R. = No reportado

IC₅₀ = Concentración peptídica necesaria para inhibir la actividad de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) un 50%

¹Posee la capacidad de supresión de la absorción de colesterol

IECA= Inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina

IECE Inhibición de la enzima convertidora de endotelina

De igual forma, los péptidos HIRL (f146-149) o β -lactotensina e IIAEK (f71-75) o lactostatina, ambos derivados de la β -lactoglobulina, disminuyeron los niveles de colesterol sérico y aumentaron la cantidad de colesterol de alta densidad en ratas (Nagaoka *et al.*, 2001). También se ha reportado que este último péptido induce la transcripción de la enzima colesterol 7- α -hidroxilasa (CYP7A1), lo que genera un efecto hipocolesterolémico por la estimulación de la secreción de ácido biliar (Morikawa *et al.*, 2007).

Sistema Endócrino

La diabetes tipo 2 es una enfermedad constituida por un desorden crónico metabólico. Esta se caracteriza por la resistencia y la disminución de los niveles de insulina (Brandelli *et al.*, 2015), la cual es la más prevalente y está considerada como un problema de salud pública a nivel mundial. En el año 2000 se estimó que había 171 millones de diabéticos en el mundo. Sin embargo, esta cifra podría alcanzar los 366 millones para el año 2030 (Wild *et al.*, 2004). En los últimos años se ha encontrado que la ingesta de proteínas de lactosuero ejerce un efecto fisiológico benéfico en el control del metabolismo de la glucosa (Tulipano *et al.*, 2012). Estudios han reportado propiedades insulino-trópicas y reductoras de glucosa, de las proteínas del lactosuero en sujetos sanos y con diabetes tipo 2 (Jakubowicz y Froy, 2013). Las proteínas del lactosuero al parecer actúan vía aminoácidos y PBDL una vez liberados tras la digestión gastrointestinal. Estos últimos estimulan la liberación de diversas hormonas gastrointestinales tales como colecistoquinina, péptido YY, péptidos inhibidores de las incretinas gástricas y el péptido similar al glucagón tipo 1, lo que potencializa la secreción de insulina a partir de las células β (Jakubowicz *et al.*, 2013). Otra importante

estrategia terapéutica en el tratamiento de la diabetes tipo 2 es la inhibición de la dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV). Investigaciones previas han demostrado que estos péptidos bioactivos podrían ser utilizados por presentar capacidad inhibitoria endógena de la actividad de la enzima DPP-IV en el tracto gastrointestinal, previniendo la degradación de las incretinas insulino-trópicas GLP-1 y GIP (Jakubowicz *et al.*, 2013; Lacroix y Li-Chan, 2014). Diversas investigaciones *in vitro* e *in vivo* han demostrado la capacidad de los péptidos bioactivos derivados de las proteínas del lactosuero para reducir los niveles de glucosa. Hasta el momento no se conoce con exactitud el mecanismo de acción que se ejerce sobre la actividad enzimática de la DPP-IV. Sin embargo, las características estructurales juegan un papel clave en la inhibición de esta enzima (Brandelli *et al.*, 2015). Estos péptidos bioactivos presentan un PM < 2 kDa (Jakubowicz *et al.*, 2013), poseen grupos hidrofóbicos e incluyen prolina, alanina, leucina y valina en la segunda posición del grupo amino terminal (Lacroix y Li-Chan, 2014). Los PBDL que inhiben la actividad de la DPP-IV se muestran en el Cuadro 5. La máxima capacidad inhibitoria reportada es de 86% y 73%, la cual está asociada a las secuencias NLEILR (Song *et al.*, 2017) y LKPTPEGDL (Lacroix y Li-Chan, 2014), respectivamente. Ambas secuencias peptídicas fueron producto de la hidrólisis de la fracción β -lactoglobulina con papaína y pepsina, respectivamente.

Sistema Inmunológico

Los PBDL han demostrado efectos inmunomoduladores tanto a nivel de la respuesta inmune adaptativa como innata (Badr *et al.*, 2012).

Cuadro 5. PBDL evaluados *in vitro* con influencia en el sistema endócrino

Proteína	Enzima	Fragmento peptídico	Secuencia de aminoácidos	Masa (Da)	Inhibición (%)	IC ₅₀ (μM)	Referencia
β-lactoglobulina bovina	Tripsina	78-82	IPAVF	540.0	50	44.7	Silveira <i>et al.</i> , 2013
		125-135	TPEVDDEALEK	1240.0	50	319.5	
		78-83	IPAVFK	670.0	50	143	
		92-100	VLVLDTDYK	1060.0	50	424.4	
		78-86	IPAVFKIDA	973.2	38	191	Lacroix <i>et al.</i> , 2014
		46-57	LKPTPEGDLEIL	1324.5	67	57	
		46-54	LKPTPEGDL	969.1	73	45	
β-lactoglobulina bovina	Pepsina	1-9	LIVTQTMKG	990.2	10	N. R.	
		1-11	LIVTQTMKGLD	1218.5	9	N. R.	Daliri <i>et al.</i> , 2017
		1-13	LIVTQTMKGLDIQ	1459.8	8	N. R.	Lacroix <i>et al.</i> , 2014
		2-11	IVTQTMKGLD	1105.3	22	N. R.	
		2-13	IVTQTMKGLDIQ	1346.6	20	N. R.	

Proteína	Enzima	Fragmento peptídico	Secuencia de aminoácidos	Masa (Da)	Inhibición (%)	IC ₅₀ (μM)	Referencia
β-lactoglobulina bovina	Tripsina	41-53	ELKPTPEGD	985.1	3	N. R.	
		123-130	VRTPEVDD	930.0	20	N. R.	
		71-75	IIAEK	573.7	50	>1000	Power <i>et al.</i> ,
		9-14	GLDIQK	672.7	50	>1000	2014
		125-135	TPEVDDEALEK	1240.0	50	578.7	
		142-148	ALPMHIR	836.5	50	>1000	
		78-83	IPAVFK	670.0	50	149.1	
		139-141	ALK	331.4	50	>1000	
β-lactoglobulina bovina	Papaína	71-77	NLEILR	870.0	86.34	N. R.	Song <i>et al.</i> ,
		143-155	TQMVDEEIMEKFR	1,655.9	69.87	N. R.	2017
β-lactoglobulina bovina	Termoasa Peptidasa, ProteAX y Accelerzima®	46-55	LKPTPEGDLE	N. R.	N. R.	42	Lacroix <i>et</i>
		46-57	LKPTPEGDLEIL	N. R.	N. R.	57	<i>al.</i> , 2016
	CGP	94-99	VLDTDY	N. R.	N. R.	471	

Proteína	Enzima	Fragmento peptídico	Secuencia de aminoácidos	Masa (Da)	Inhibición (%)	IC ₅₀ (μM)	Referencia
		140-147	LKALPMH	N. R.	N. R.	193	
		104-117	WLAHKALCSEKLDQ	1642.0	44	141	Lacroix <i>et al.</i> , 2014
		105-115	LAHKALCSEKL	1212.5	41	165	
		105-117	LAHKALCSEKLDQ	1455.7	22	N. R.	
		104-117	AHKALCSEKLDQ	1342.5	9	N. R.	
		106-117	KALCSEKLDQ	1134.3	14	N. R.	
		107-117	ALCSEKLDQ	1006.1	9	N. R.	
		110-117	LCSEKLDQ	935.1	46	186	
		4-9	TKCEVF	725.9	23	N. R.	
		4-11	TKCEVFRE	1011.2	41	166	
		10-18	RELKDLKGY	1121.3	2	N. R.	
		10-19	RELKDLKGYG	1178.4	3	N. R.	
		10-20	RELKDLKGYGG	1235.4	9	N. R.	
α-lactoalbúmina bovina	Pepsina						

Proteína	Enzima	Fragmento peptídico	Secuencia de aminoácidos	Masa (Da)	Inhibición (%)	IC ₅₀ (μM)	Referencia
		10-23	RELKDLKGYGGVSL	1534.8	11	N. R.	
		N. R.	TFHTSGYDTQA	1227.3	6	N. R.	
		40-49	AIVQNNDSTE	1090.1	5	N. R.	
		41-49	IVQNNDSTE	1019.0	13	N. R.	
		41-50	IVQNNDSTEY	1182.2	23	N. R.	
		95-103	ILDKVGINY	1034.2	34	263	
		41-53	IVQNNDSTEYGLF	1499.6	37	337	
		10-22	RELKDLKGYGGVS	1421.6	7	N. R.	
α-lactoalbúmina bovina	Termoasa PC10F, Peptidasa R, ProteAX y Accelerzima® CGP	12-25	LKGYGGVSLPE	N. R.	N. R.	486	Lacroix <i>et al.</i> , 2016

Algunos ejemplos incluyen activación y proliferación de linfocitos, regulación de citoquinas, incremento de la síntesis de anticuerpos, aumento de la habilidad fagocítica de los macrófagos y estimulación de la generación de inmunoglobulinas (Badr *et al.*, 2017; Chalamaiah *et al.*, 2018). El mecanismo de acción aún no ha sido dilucidado del todo, sin embargo, se ha reportado que estos efectos podrían establecerse a nivel molecular a través de enlaces químicos entre los péptidos y los receptores de la superficie de las células del sistema inmunológico (Maestri *et al.*, 2016). La capacidad inmunomoduladora de los PBDL está en función de la estructura química. Aminoácidos, secuencia, longitud, carga, hidrofobicidad y estructura molecular del péptido definen esta capacidad. En general, los péptidos inmunomoduladores presentan 2-10 aminoácidos y naturaleza hidrofóbica (Chalamaiah *et al.*, 2018). Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la efectividad de los PBDL en el sistema inmunológico. Por ejemplo, Tang *et al.* (2009) incrementaron los niveles de IgA, IgG e IgM en cerdos tras la suplementación de la dieta con lactoferricina y lactoferrampina mejorando así la función inmune e intestinal (Tang *et al.*, 2009).

Además, la lactoferricina ha mostrado capacidad para bloquear la actividad de la interleucina-6 (IL-6), citoquina relacionada con los procesos inflamatorios de la artritis reumatoide (Barros de Oliveira *et al.*, 2011). Saint-Sauveur *et al.* (2009) reportaron el aumento de la cantidad de IgA en ratones que fueron alimentados por 7 días con fracciones peptídicas del lactosuero induciendo la producción de interleucina-2 (IL-2) e interferón gama (IFN γ) que generan la activación de monocitos y neutrófilos (Saint-Sauveur *et al.*, 2009). Se ha reportado que los PBDL mejoran la proliferación de linfocitos (Alvarado

Carrasco y Guerra, 2010), inhiben la liberación de la citoquina pro-inflamatoria IL-8 (Piccolomini *et al.*, 2012) y la cantidad de especies reactivas de oxígeno en ratones (Badr *et al.*, 2017). Es importante señalar que los péptidos DIQKVAGTWYSLAMAASDIS (f11-30) y AMAASDISLLDAQSAPL (f23-39) indujeron la proliferación de células T (Gouw *et al.*, 2018). Adicionalmente, la capacidad antioxidante de los PBDL ha demostrado influir positivamente en la función inmunológica (Tarango-Hernández *et al.*, 2015). Estudios *in vivo* han demostrado que la administración de hidrolizados del lactosuero aumentó los niveles de la enzima superóxido dismutasa (SOD), que inhibe radicales libres y aniones superóxidos (Peng *et al.*, 2014). La principal relevancia de estos péptidos reside en la capacidad para reducir el estrés oxidativo, lo cual está relacionado con el envejecimiento y daño celular (Mann *et al.*, 2014). Existen diferentes mecanismos mediante los cuales se ejerce la capacidad antioxidante. Estos incluyen quelación de iones metálicos pro-oxidantes (Peng *et al.*, 2010), captación de radicales libres, inhibición de la peroxidación de lípidos, inactivación de especies reactivas de oxígeno, así como la combinación de éstas (Mann *et al.*, 2014). Los péptidos con gran capacidad antioxidante se han caracterizado por presentar una masa molecular menor a 3 kDa (Rocha *et al.*, 2017), por lo que el tamaño y la composición de los aminoácidos que conforman las secuencias peptídicas juegan un papel importante (Abadía-García *et al.*, 2017; Daliri *et al.*, 2018). En este sentido, aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina, triptófano e histidina actúan como queladores de iones metálicos; lisina dona átomos de hidrógeno y cisteína secuestra radicales libres (Ashok y Aparna, 2017). Las secuencias peptídicas derivadas de las fracciones proteicas del lactosuero con

mayor efecto en el sistema inmunológico se muestran en el Cuadro 6. Estas presentan un IC_{50} (concentración peptídica necesaria para inhibir la actividad oxidante en un 50%) $< 1 \mu M$, provienen de la β -lactoglobulina, han sido liberadas por las enzimas corolasa PP (Hernández-Ledesma *et al.*, 2005) y tripsina (Power *et al.*, 2014) y están conformadas principalmente por aminoácidos hidrofóbicos, i.e. GLDIQK e IPAVFK. Los PBDL también influyen en el sistema inmunológico mediante la actividad antimicrobiana (Sah *et al.*, 2016). En general, estos péptidos tienen una masa molecular < 10 kDa, punto isoelectrico mayor de 10 y están compuestos por aminoácidos básicos, alifáticos y polares (Smithers, 2015; Esmailpour *et al.*, 2017). El mecanismo de acción de los péptidos con actividad antimicrobiana está basado en interacciones electrostáticas. La carga positiva de estos péptidos reacciona con la carga negativa de la membrana celular. Esto bloquea los sitios específicos en la interacción con calcio y magnesio, responsables de la integridad de la membrana, y forma poros que causan la pérdida de metabolitos y aumenta la permeabilidad a moléculas tóxicas con la consecuente muerte celular (Sah *et al.*, 2016). Los hidrolizados de lactoferricina con pepsina han mostrado ejercer actividades biológicas. Las actividades antimicrobianas, antifúngica y una débil actividad antiviral representan las más importantes. Estas propiedades se deben a que forman estructuras anfipáticas (Smithers, 2008).

Cuadro 6. PBDL evaluados *in vitro* con influencia en el sistema inmunológico

Proteína	Enzima	Fracción peptídica	Secuencia de aminoácidos	Masa (Da)	Fundamento	IC ₅₀ (μM) o cepa evaluada	Referencia
β-lactoglobulina bovina	Corolasa PP®	19-29	WYSLAMAASDI	1225.4	Antioxidante	2.62 ¹	Hernández-Ledesma <i>et al.</i> , 2005
		145-149	MHIRL	667.3		0.31 ¹	
		42-46	YVEEL ²	650.3		0.80 ¹	
		58-61	LQKW	573.3	Antioxidante	N. R.	Contreras <i>et al.</i> , 2011;
β-lactoglobulina bovina	Termolisina						Pandey <i>et al.</i> , 2018
		95-101	LDTDYKK	881.3		N. R.	
		151-155	FNPTQ	605.2		N. R.	
β-lactoglobulina bovina	Alcalasa	19-22	WYSL	567.2	Antioxidante	84.78	Zhang <i>et al.</i> , 2013

Proteína	Enzima	Fracción peptídica	Secuencia de aminoácidos	Masa (Da)	Fundamento	IC ₅₀ (μM) o cepa evaluada	Referencia
		N. R.	AHLW	525.3		74.02	
		N. R.	GTSV	362.2		31.53	
		81-82	VF	265.1		19.68	
		20-22	YSL	381.2		48.15	
		N. R.	LAHL	452.4		63.01	
		104-105	LF	278.2		19.85	
β-lactoglobulina bovina	Flavorzima	92-100	VLVLDTDYK	1065.7	Antioxidante	N. R.	Mann <i>et al.</i> , 2014
		84-91	IDALNEK	915.3		N. R.	
β-lactoglobulina bovina	Alcalasa	146-150	HIRLS	624.4	Antioxidante	N. R.	Mann <i>et al.</i> , 2014
		75-82	KTKIPAVF	903.0		N. R.	
		24-32	MAASDISLL	935.5		N. R.	
β-lactoglobulina bovina	Corolasa	43-49	VEELKPT	815.2	Antioxidante	N. R.	Mann <i>et al.</i> , 2014
		43-51	VEELKPTPE	1040.6		N. R.	

Proteína	Enzima	Fracción peptídica	Secuencia de aminoácidos	Masa (Da)	Fundamento	IC ₅₀ (μM) o cepa evaluada	Referencia
		15-20	VAGTWY	700.0	Antioxidante	5.63 ¹	Power <i>et al.</i> , 2014
β-lactoglobulina bovina	Tripsina	139-141	ALK	331.4		0.01 ¹	
		71-75	IIAEK	573.7		0.02 ¹	
		9-14	GLDIQK	672.7		0.02 ¹	
		125-135	TPEVDDEALEK	1240.0		0.004 ¹	
		142-148	ALPMHIR	836.5		0.04 ¹	
		78-83	IPAVFK	673.7		0.002 ¹	
β-lactoglobulina ovina	Proteasa de <i>Bacillus</i> sp. P7	142-149	LAFNPTQLEGQCHV	N. R.	Antioxidante	74.4	Corrêa <i>et al.</i> , 2014
α- lactoalbúmina bovina	Flavorzima	99-108	VGINYWLAHK	1200.7	Antioxidante	N. R.	Mann <i>et al.</i> , 2014

Proteína	Enzima	Fracción peptídica	Secuencia de aminoácidos	Masa (Da)	Fundamento	IC ₅₀ (μM) o cepa evaluada	Referencia
		15-20	VAGTWY	700.0	Antimicrobiano	Bacterias G +	Pellegrini <i>et al.</i> , 2001
β-lactoglobulina bovina	Tripsina	25-40	AASDISLLDAQSAPLR	1630.0			
		78-83	IPAVFK	670.0			
		92-100	VLVLDTDYK	1060			
β-lactoglobulina bovina	Tripsina y quimotripsina	36-42	SAPLRVY	804.5	Antimicrobiano	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	Demers- Mathieu <i>et al.</i> , 2013
		14-18	KVAGT	475.3	Antimicrobiano	Bacterias G+	Théolier <i>et al.</i> , 2013
β-lactoglobulina bovina	Pepsina	147-149	IRL	401.3			
		123-125	VRT	375.3			
		143-146	LMPH	497.2			

Proteína	Enzima	Fracción peptídica	Secuencia de aminoácidos	Masa (Da)	Fundamento	IC ₅₀ (μM) o cepa evaluada	Referencia
β-lactoglobulina caprina	Proteasas digestivas humanas	134-136	EKF	423.2			
		50-54	PEGDL	530.3		Bacterias G-	
		1-8	IIVTQTMK	932.6	Antimicrobiano	<i>E.coli</i>	Pellegrini <i>et al.</i> , 1999
		9-18	GLDIQKVAGT	N. R.			
		21-32	SLAMAASDISLL	N. R.			
		33-39	DAQSAPL	N. R.			
		43-55	VEELKPTPEGDLE	N. R.			
		71-82	IIAEKTIPAVF	N. R.			
		92-100	VLVLDTDYK	1064.0			
α-lactoalbúmina bovina	Tripsina	125-134	TPEVDDEALE	N. R.			
		139-147	ALKALPMHI	N. R.			
		1-5	EQLTK	620.0	Antimicrobiano	Bacterias G+ y G-	Pellegrini <i>et al.</i> , 1999

Proteína	Enzima	Fracción peptídica	Secuencia de aminoácidos	Masa (Da)	Fundamento	IC ₅₀ (μM) o cepa evaluada	Referencia
		(17-31)S- S(109-114)	GYGGVSLPEWVCTTF ALCSEK	2250.0			
	Quimotripsina	(61-68)S- S(75-80)	CKDDQNPDISCDKF	1650.0	Antimicrobiano	Bacterias G+ y G-	Pellegrini <i>et al.</i> , 1999
α- lactoalbúmina bovina	Pepsina	117-121	KVGIN	530.3	Antimicrobiano	<i>L. ivanovii</i>	Théolier <i>et al.</i> , 2013
		106-124	N. R.	N. R.	Antimicrobiano	<i>E.coli</i> y <i>B. cereus</i>	Almaas <i>et al.</i> , 2011
Glicomacropéptido caprino	Proteasas digestivas humanas	109-121 126-133 130-139	N. R. N. R. N. R.	N. R. N. R. N. R.			

Proteína	Enzima	Fracción peptídica	Secuencia de aminoácidos	Masa (Da)	Fundamento	IC ₅₀ (μM) o cepa evaluada	Referencia
		141-153	N. R.	N. R.			

PBDL = Péptidos bioactivos derivados de las proteínas del lactosuero

μM equivalentes Trolox /mg de péptido

²También presenta actividad osteoblástica

N. R. = No reportado

IC₅₀= Concentración peptídica necesaria para inhibir la actividad oxidante un 50%

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los PBDL presentan relevantes efectos fisiológicos benéficos en la salud favoreciendo la función de los sistemas cardiovascular, endócrino e inmunológico. Las estructuras químicas de las secuencias peptídicas representan un punto clave en la ejecución de la bioactividad. Estas últimas están íntimamente relacionadas con la fracción proteica del lactosuero y la especificidad enzimática. Hoy en día los avances tecnológicos han permitido generar e identificar una amplia gama de secuencias peptídicas derivadas de las proteínas del lactosuero capaces de ejercer diversas funcionalidades. Sin embargo, las metodologías para liberarlos de manera controlada, la dosificación y las concentraciones óptimas han sido poco exploradas. Por lo que es importante llevar a cabo investigación de frontera que permita avanzar el umbral del conocimiento que permita el uso de los PBDL como coadyuvantes en la prevención y tratamiento de enfermedades de nuestros tiempos.

LITERATURA CITADA

- Abadía-García, L., E. Castaño-Tostado, L. Ozimek, S. Romero-Gómez, C. Ozuna y S. L. Amaya-Llano. 2017. Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 37: 84-90.
- Abubakar, A., T. Saito, H. Kitazawa, Y. Kawai y T. Itoh. 1998. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *J. Dairy Sci.* 81: 3131-3138.
- Adjonu, R., G. Doran, P. Torley y S. Agboola. 2013. Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of heat pretreatment and enzyme specificity. *Food Chem.* 36: 1435-1443.
- Almaas, H., E. Eriksen, C. Sekse, I. Comi, R. Flengsrud, H. Holm, E. Jensen, M. Jacobsen, T. Langsurd y E. Vegarud. 2011. Antibacterial peptides derived from caprine whey proteins, by digestion with human gastrointestinal juice. *Br. J. Nutr.* 106: 896-905.
- Alvarado Carrasco, C. y M. Guerra. 2010. Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *An venez nutr.* 23: 45-50.
- Ashok, N. R. y H. S. Aparna. 2017. Empirical and bioinformatics characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) colostrum whey peptides & their angiotensin I-converting enzyme inhibition. *Food Chem.* 228: 582-594.
- Badr, G., L. H. Sayed, H. D. Omar, A. M. Abd El-Rahim, E. A. Ahmed y M. H. Mahmoud. 2017. Camel whey protein protects B and T cells from apoptosis by suppressing activating transcription factor-3 (ATF-3)-mediated oxidative stress and enhancing phosphorylation of AKT and I κ B- α in type I diabetic mice. *Cell. Physiol. Biochem.* 41: 41-54.
- Barros de Oliveira, C. M., R. Kimiko Sakata, A. Machado Issy, L. R. Gerola y R. Salomão. 2011. Citocinas y dolor. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 61: 137-42.
- Brandelli, A., D.J. Daroit, A. P. F. Corrêa. 2015. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Res. Int.* 73: 149-161.
- Brew, K., F. J. Castellino, T. C. Vanaman y R. L. Hill. 1970. The complete amino acid sequence of bovine α -lactalbumin. *J. Biol. Chem.* 10: 4570-4582.
- Chalamaiah, M., W. Yu y J. Wu. 2018. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chem.* 245: 205-222.

- Contreras, M. D. M., B. Hernández-Ledesma, L. Amigo, P. J. Martín Álvarez e I. Recio. 2011. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Sci. Technol.* 44: 9-15.
- Corrêa, A. P. F, D. J. Daroit, R. Fontoura, S. M. M. Meira, J. Segalin y A. Brandelli. 2014. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides*. 61: 48-55.
- Daliri, E. B. M., B. H. Lee y D. H. Oh. 2017. Current trends and perspectives of bioactive peptides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 12: 1-12.
- Daliri, E. B. M., B.H. Lee, B. J. Park, S. H. Kim y D. H. Oh. 2018. Antihypertensive peptides from whey proteins fermented by lactic acid bacteria. *Food Sci. Biotechnol.* 27: 1781–1789.
- Demers-Mathieu, V., S. F. Gauthier, M. Britten, I. Fliss, G. Robitaille y J. Jean. 2013. Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by nanofiltration. *Int. Dairy J.* 28: 94-101.
- Didelot, S., S. Bordenave-Juchereau, E. Rosenfeld, I. Fruitier-Arnaudin, J. M. Piot y F. Sannier. 2006. Preparation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory hydrolysates from unsupplemented caprine whey fermentation by various cheese microflora. *Int. Dairy J.* 16: 976-983.
- Eigel, W. N., J. E. Butler, C. A. Ernstrom, H. M. Farrell, V. R. Harwalkar, R. Jenness y R. McL Whitney. 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision. *J. Dairy Sci.* 67: 1599-1631.
- Esmailpour, M., M. R. Ehsani, M. Aminlari, S. Shekarforoush y E. Hoseini. 2017. Antimicrobial peptides derived from goat's milk whey proteins obtained by enzymatic hydrolysis. *J. Food Biosci. Technol.* 7: 65-72.
- Fernández-Musoles, R., J. B. Salom, D. Martínez-Maqueda, J. J. López-Díez, I. Recio y P. Manzanares. 2013. Antihypertensive effects of lactoferrin hydrolyzates: Inhibition of angiotensin- and endothelin-converting enzymes. *Food Chem.* 139: 994-1000.
- Gouw, J. W., J. Jo, L. A. P. M. Meulenbroek, S. Heijjer, E. Kremer, E. Sandalova, A. C. Knulst, P. Jeurink, J. Garssen, A. Rijnierse y L. M. J. Knippels. 2018. Identification of peptides with tolerogenic potential in a hydrolyzed whey-based infant formula. *Clin. Exp. Allergy.* 48: 1345-1353.

- Hernández-Ledesma, B., L. Amigo, M. Ramos e I. Recio. 2004. Release of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides by simulated gastrointestinal digestion of infant formulas. *Int. Dairy J.* 14: 889-898.
- Hernández-Ledesma, B., A. Dávalos, B. Bartolomé y L. Amigo. 2005. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 53: 588-593.
- Hernández-Ledesma, B., M. Miguel, L. Amigo, M. A. Aleixandre e I. Recio. 2007. Effect of simulated gastrointestinal digestion on the antihypertensive properties of synthetic beta-lactoglobulin peptide sequences. *J. Dairy Res.* 74: 336-339.
- Hernández-Ledesma, B., I. Recio, M. Ramos y L. Amigo. 2002. Preparation of ovine and caprine-lactoglobulin hydrolysates with ACE inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine-lactoglobulin hydrolyzed with thermolysin. *Int. Dairy J.* 12: 805-812.
- Ibrahim, H. R., A. S. Ahmed y T. Miyata. 2017. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. *J. Adv. Res.* 8: 63-71.
- Jakubowicz, D. y O. Froy. 2013. Biochemical and metabolic mechanisms by which dietary whey protein may combat obesity and type 2 diabetes. *J. Nutr. Biochem.* 24: 1-5.
- Jamdar, S. N., V. Rajalakshmi, M. D. Pednekar, F. Juan, V. Yardi y A. Sharma. 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chem.* 121: 178-184.
- Jeličić, I., R. Božanić y L. Tratnik. 2008. Whey based beverages-a new generation of dairy products. *Mljekarstvo.* 58: 257-274.
- Korhonen, H. y A. Pihlanto. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.* 16: 945-960.
- Koyama, M., S. Hattori, Y. Amano, M. Watanabe y K. Nakamura. 2014. Blood pressure-lowering peptides from neo-fermented buckwheat sprouts: a new approach to estimating ACE inhibitory activity. *PLoS One.* 9: e105802.
- Lacroix, I. M. E. y E. C. Y. Li-Chan. 2014. Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity from pepsin-treated bovine whey proteins. *Peptides.* 54: 39-48.

- Lacroix, I. M. E., G. Meng, I. M. Y. Cheung y E. C. Y. Li-Chan. 2016. Do whey protein-derived peptides have dual dipeptidyl-peptidase IV and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities? *J. Funct. Foods*. 21: 87-96.
- Maestri, E., M. Marmiroli y N. Marmiroli. 2016. Bioactive peptides in plant-based food stuffs. *J. Proteomics*. 147: 104-155.
- Mann, B., A. Kumari, R. Kumar, R. Sharma, K. Prajapati, S. Mahboob y S. Athira. 2014. Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *J. Food Sci. Technol*. 52: 3235-3241.
- Morikawa, K., I. Kondo y S. A. Kanamaru. 2007. Nagaoka S. A novel regulatory pathway for cholesterol degradation via lactostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 352: 697-702.
- Moslehishad, M., M. Reza Ehsani, M. Salami, S. Mirdamadi, H. Ezzatpanah, A. Niasari, A. Naslaji y A. Moosavi-Movahedi. 2013. The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637. *Int. Dairy J*. 29: 82-87.
- Mullally, M.M., H. Meisel y R. J. Fitzgerald. 1997. Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Lett*. 402: 99-101.
- Nagaoka, S., Y. Futamura, K. Miwa, T. Awano, K. Yamauchi, Y. Kanamaru, T. Tadashi y T. Kuwata. 2001. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk beta-lactoglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 281: 11-17.
- Nishanthi, M., T. Vasiljevic y J. Chandrapala. 2017. Properties of whey proteins obtained from different whey streams. *Int. Dairy J*. 66: 76-83.
- Nongonierma, A. B. y R. J. FitzGerald. 2015. Bioactive properties of milk proteins in humans: A review. *Peptides*. 73: 20-34.
- Nurminen, M. L., M. Sipola, H. Kaarto, A. Pihlanto-Leppala, K. Piilola, R. Korpela, O. Tossavainen, H. Korhonen y H. Vapaatalo. 2000. α -Lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*. 66: 1535-1543.
- O'Keefe, M. B., C. Conesa y R. J. FitzGerald. 2017. Identification of angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant peptides in a whey protein concentrate hydrolysate produced at semi-pilot scale. *Int. J. Food Sci. Technol*. 52: 1751-1759.

- O'Loughlin, I. B., B. Murray, A. Brodkorb, R. J. FitzGerald y P. M. Kelly. 2014. Production of whey protein isolate hydrolysate fractions with enriched ACE-inhibitory activity. *Int. Dairy J.* 38: 101-103.
- OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013. OECD-FAO Agricultural Outlook. OECD Publishing. http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2013en
- Onuh, J.O., A. T. Girgih, S. Malomo, R. E. Aluko, M. Aliani. 2015. Kinetics of *in vitro* renin and angiotensin converting enzyme inhibition by chicken skin protein hydrolysates and their blood pressure lowering effects in spontaneously hypertensive rats. *J. Funct. Foods.* 14: 133-143.
- Pan, D. e Y. Guo. 2010. Optimization of sour milk fermentation for the production of ACE-inhibitory peptides and purification of a novel peptide from whey protein hydrolysate. *Int Dairy J.* 20: 472-479.
- Pandey, M., R. Kapila y S. Kapilka. 2018. Osteoanabolic activity of whey-derived anti-oxidative (MHIRL and YVEEL) and angiotensin-converting enzyme inhibitory (YLLF, ALPMHIR, IPA and WLAHK) bioactive peptides. *Peptides.* 99: 1-7.
- Pellegrini, A., U. Thomas, N. Bramaz, P. Hunziker y R. Von Fellenberg. 1999. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α -lactalbumin molecule. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* 1426: 439-448.
- Pellegrini, A., C. Dettling, U. Thomas y P. Hunziker. 2001. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* 1526: 131-140.
- Peng, X., B. Kong, X. Xia y Q. Liu. 2010. Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with alcalase. *Int. Dairy J.* 20: 360-365.
- Peng, X., B. Kong, H. Yu y X. Diao. 2014. Protective effect of whey protein hydrolysates against oxidative stress in D-galactose induced ageing rats. *Int. Dairy J.* 34: 80-85.
- Piccolomini, A. F., M. M. Iskandar, L. C. Lands y S. Kubow. 2012. High hydrostatic pressure pre-treatment of whey proteins enhances whey protein hydrolysate inhibition of oxidative stress and IL-8 secretion in intestinal epithelial cells. *Food Nutr. Res.* 56:1-10.
- Power, O., A. Fernández, R. Norris, F. Riera y R. J. FitzGerald. 2014. Selective enrichment of bioactive properties during ultrafiltration of a tryptic digest of β -lactoglobulin. *J. Funct. Foods.* 9: 38-47.

- Prazeres, A. R., F. Carvalho y J. Rivas. 2012. Cheese whey management: A review. *J. Environ. Manage.* 110: 48-68.
- Rocha, G. F., F. Kise, A. M. Rosso y M. G. Parisi. 2017. Potential antioxidant peptides produced from whey hydrolysis with an immobilized aspartic protease from *Salpichroa origanifolia* fruits. *Food Chem.* 237: 350-355.
- Rodríguez-Figueroa, J. C., A. F. González-Córdova, M. J. Torres-Llanez, H. S. García y B. Vallejo-Cordoba. 2012. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides produced in fermented milk by specific wild *Lactococcus lactis* strains. *J. Dairy Sci.* 95: 5536-5543.
- Sah, B. N. P., T. Vasiljevic, S. McKechnie y O. N. Donkor. 2016. Antioxidative and antibacterial peptides derived from bovine milk proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58: 726-740.
- Saint-Sauveur, D., S. F. Gauthier, Y. Boutin, A. Montoni e I. Fliss. 2009. Effect of feeding whey peptide fractions on the immune response in healthy and *Escherichia coli* infected mice. *Int. Dairy J.* 19: 537-544.
- Silveira, S. T., D. Martínez-Maqueda, I. Recio y B. Hernández-Ledesma. 2013. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in β -lactoglobulin. *Food Chem.* 141: 1072-1077.
- Sipola, M., P. Finckenberg, H. Vapaatalo, A. Pihlanto-Leppälä, H. Korhonen, R. Korpela y M. L. Nurminen. 2002. Alpha-lactorphin and beta-lactorphin improve arterial function in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 71: 1245-1253.
- Smithers, G.W. 2008. Whey and whey proteins—from ‘gutter-to-gold’. *Int. Dairy J.* 18: 695-704.
- Smithers, G. W. 2015. Whey-ing up the options - Yesterday, today and tomorrow. *Int. Dairy J.* 48: 2-14.
- Song, J. J., Q. Wang, M. Du, X. M. Ji y X. Y. Mao. 2017. Identification of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides from mare whey protein hydrolysates. *J. Dairy Sci.* 100: 1-10.
- Tang, Z., Y. Yin, Y. Zhang, R. Huang, Z. Sun, T. Li, W. Chu, X. Kong, L. Li, M. Geng y Q. Tu. 2009. Effects of dietary supplementation with an expressed fusion peptide bovine lactoferricina lactoferrampina on performance, immune function and intestinal mucosal morphology in piglets weaned at age 21 d. *Br. J. Nutr.* 101: 998-1005.

- Tarango-Hernández, S., A. D. Alarcón-Rojo, M. Robles-Sánchez, N. Gutiérrez-Méndez y J. C. Rodríguez-Figueroa. 2015. Short communication: Potential of fresco-style cheese whey as a source of protein fractions with antioxidant and angiotensin- I-converting enzyme inhibitory activities. *J. Dairy Sci.* 98: 7635-7639.
- Théolier, J., R. Hammami, P. Labelle, I. Fliss y J. Jean. 2013. Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *J. Funct. Foods.* 5: 706-714.
- Tulipano, G., V. Sibilía, A. M. Caroli y D. Cocchi. 2011. Whey proteins as source of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl peptidase-4) inhibitors. *Peptides.* 32: 835-838.
- 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.
- Wijayanti, H. B., N. Bansal y H. C. Deeth. 2014. Stability of whey proteins during thermal processing: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13: 1235-1251.
- Wild, S., G. Roglic, A. Green, R. Sicree y H. King. 2004. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 27: 1047-1053.
- World Health Organization. 2017. The top 10 causes of death. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
- Zhang, Q. X., H. Wu, Y. F. Ling y R. R. Lu. 2013. Isolation and identification of antioxidant peptides derived from whey protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and Q-TOF MS. *J. Dairy Res.* 80: 367-373.

**ESTUDIO 1. DESARROLLO DE UNA BEBIDA DE LACTOSUERO-AVENA
PRE-TRATADA CON ULTRASONIDO Y SUPLEMENTADA CON
*Lactobacillus casei***

RESUMEN

DESARROLLO DE UNA BEBIDA DE LACTOSUERO-AVENA PRE-TRATADA CON ULTRASONIDO Y SUPLEMENTADA CON *Lactobacillus casei*

POR:

M. C. ANA LUISA HERRERA PONCE

Doctorado in Philosophia en Producción Animal

Universidad Autónoma de Chihuahua

Facultad de Zootecnia y Ecología

Secretaría de Investigación y Posgrado

Presidente: Ph. D. Alma Delia Alarcón Rojo

El objetivo de este estudio fue evaluar la combinación lactosuero-avena y la aplicación de ultrasonido de alta intensidad en el desarrollo de una bebida probiótica, en función de la viabilidad de *L. casei*, la actividad antioxidante y la aceptación sensorial. Las bebidas se formularon con 35, 50 y 65% v/v de lactosuero/avena. Se aplicó ultrasonido (40 kHz y 11 W/cm²) durante 3 o 10 min, como pre-tratamiento de la fermentación. Los tratamientos fueron identificados como 35/65/0, 50/50/0, 65/35/0, 35/65/3, 50/50/3, 65/35/3, 35/65/10, 50/50/10 y 65/35/10, de acuerdo con el porcentaje de lactosuero, porcentaje de avena y el tiempo de ultrasonicación (min), respectivamente. Se determinó la viabilidad inicial y final, el crecimiento de *L. casei*, la actividad antioxidante y la aceptación de las bebidas por panelistas no entrenados. Todos los tratamientos mostraron ser adecuados para el desarrollo de una bebida probiótica de *L. casei* con un rango de población final de 7 a 8.86 Log UFC/mL. El crecimiento de *L. casei* fue

afectado ($P < 0.001$) por la proporción lactosuero-avena, tiempo ultrasonido y la interacción. La actividad antioxidante fue afectada por la proporción lactosuero-avena ($P < 0.001$) y el tiempo de ultrasonido ($P = 0.02$). La aceptación sensorial no presentó efecto de ningún factor. En general la aceptación de las bebidas fue baja. La bebida con mayor correspondencia a “me gusta” fue la de 50/50/3. Se concluye que la combinación de lactosuero-avena con y sin ultrasonido es adecuada para el desarrollo probiótico de *L. casei*. La formulación con 50/50 de lactosuero/avena y 3 min de ultrasonido mostró buenos resultados de crecimiento de *L. casei*, actividad antioxidante y aceptación. Se recomienda mejorar sensorialmente las bebidas de lactosuero/avena, y realizar una caracterización fisicoquímica, funcional y sensorial más amplia.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A WHEY AND OAT BEVERAGE PRE-TREATED WITH ULTRASOUND AND SUPPLEMENTED WITH *Lactobacillus casei*

BY:

ANA LUISA HERRERA PONCE

The objective of this study was to assess whether the whey and oat combination and the application of high intensity ultrasound were adequate for the development of a probiotic beverage, based on the viability of *L. casei*, the antioxidant activity and the acceptability of the beverages. The beverages were formulated with 35, 50 and 65% v/v of whey and oat with *Lactobacillus casei*. Ultrasound (40 kHz and 11 W/cm²) was applied for 3 or 10 min, as a pre-treatment of the fermentation. Treatments were identified as 35/65/0, 50/50/0, 65/35/0, 35/65/3, 50/50/3, 65/35/3, 35/65/10, 50/50/10 and 65/35/10, according to the percentage of whey, oat and the ultrasound time (min), respectively. Initial and final viability, *L. casei* growth, antioxidant activity and beverage acceptance by untrained judges were determined. All treatments were shown to be suitable for the development of a *L. casei* probiotic beverage with a final population range of 7 to 8.86 Log CFU/mL. *L. casei* growth was affected ($P < 0.001$) by the whey/oat ratio, ultrasound time and their interaction. The antioxidant activity was affected by the whey-oat proportion ($P < 0.001$) and the ultrasound time ($P = 0.02$). The sensory acceptance did not show effect of any factor. In general, the beverage acceptance was low. The beverage with the highest correspondence of "like" was the 50/50/3. It is concluded that the combination of whey/oat with and without

ultrasound is suitable for the probiotic development of *L. casei*. The formulation with 50% whey, 50% oat and 3 min of ultrasound showed good results of *L. casei* growth, antioxidant activity and acceptability. Sensory improvement of whey/oat beverages is recommended, and to perform a broader physicochemical, functional and sensory characterization of the beverages.

INTRODUCCIÓN

El lactosuero es un subproducto de la elaboración de queso (Seo *et al.*, 2015). El proceso tiene un rendimiento del 10%, el 90% restante es convertido en lactosuero (Smithers, 2008). Una desventaja del lactosuero es que tiene una demanda bioquímica y química de oxígeno alta (Prazeres *et al.*, 2012) lo cual representa un problema ambiental y económico importante, debido a que no existe un equilibrio entre la producción y el uso. Por otra parte, se ha encontrado que el lactosuero posee importantes propiedades funcionales y biológicas (Smithers, 2015). Estas últimas, se atribuyen a la presencia de péptidos que influyen positivamente en el sistema inmunológico, endócrino, gastrointestinal, nervioso y cardiovascular del consumidor (Brandelli *et al.*, 2015). Sin embargo, para obtener dichas actividades es necesario que los péptidos sean liberados mediante proteólisis, la cual se puede llevar a cabo con enzimas comerciales o por fermentación (Bhat *et al.*, 2015). Otras opciones incluyen la aplicación de tratamientos térmicos o tecnologías emergentes como el ultrasonido. La aplicación de ultrasonido ha dado buenos resultados como pretratamiento o tratamiento asistido en la fermentación de alimentos lácteos (Uluko *et al.*, 2013; Shershenkov y Suchkova, 2015; Körzendörfer *et al.*, 2018; Pawar y Rathod, 2020). Estudios recientes muestran que el tratamiento ultrasónico tiene beneficios en las propiedades fisicoquímicas y funcionales del lactosuero (Ahmadi *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2018; Balthazar *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019) lo cual evidencia su potencial para la fabricación de bebidas funcionales.

En la actualidad hay un creciente interés científico e industrial por formular alimentos que contribuyan al mejoramiento y mantenimiento de la salud, una opción atractiva es el desarrollo de bebidas funcionales a base de lactosuero (Yamahata *et al.*, 2020). Algunas de éstas son las bebidas fermentadas o probióticas en cuya preparación se aprovechan las propiedades del lactosuero como un excelente sustrato para el desarrollo de bacterias y así, se obtienen bebidas probióticas que tienen más aceptación sensorial que las no fermentadas (Saha *et al.*, 2017). Para que una bebida sea probiótica es necesario que la cepa empleada cuente con evidencia científica sobre esta denominación y además tener una viabilidad del de 7 a 8 Log UFC/ml (Granato *et al.*, 2020). La evidencia científica incluye pruebas donde se sustente que el microorganismo resiste el ácido gástrico, se adhiere a las células epiteliales del intestino, no degrada la mucosa intestinal, coloniza el intestino, resiste las secreciones pancreáticas, inhibe la adhesión de patógenos, no es tóxico o patógeno, tiene actividad antimicrobiana, es susceptible a antibióticos; y cuenta con estudios clínicos y científicos sobre sus características. Además de ser avalado por varios organismos certificados, ser estable en matrices alimentarias, resistir procesos tecnológicos y seguir viable durante el almacenamiento (Borchers *et al.*, 2009; Socol *et al.*, 2010).

Por otra parte, retomando las bebidas de lactosuero, se han adicionado otros ingredientes para mejorar las propiedades funcionales o sensoriales, uno de ellos es la avena (Charalampopoulos y Rastall, 2009). En este sentido, hay reportes donde se han formulado bebidas probióticas de lactosuero con avena,

en donde el lactosuero se adiciona en forma de concentrado o aislado proteico y la avena como β -glucano (Sharma *et al.*, 2017; Wan y Xu, 2018). La avena confiere beneficios a la salud (Cheung *et al.*, 2009; Nakurte *et al.*, 2013; Alrahmany *et al.*, 2013; Martínez-Villaluenga y Peñas, 2017), que son mayores al ser combinada con probióticos (Sawas *et al.*, 2015). Aunque existen varias cepas ya aprobadas como probióticas, cada una posee características y comportamiento diferente. Herrera (2013) encontró que *L. casei* alcanzó el crecimiento máximo en menor tiempo y mejor viabilidad que *L. acidophilus* o *L. rhamnosus* durante la fermentación de una bebida de avena malteada.

Por otra parte, se ha reportado que tanto del lactosuero como de la avena se han obtenido péptidos con beneficios a la salud o biopéptidos (Madureira *et al.*, 2010; Nakurte *et al.*, 2013) y la generación de estos ha mejorado con la aplicación de ultrasonido de alta intensidad (Ozuna *et al.*, 2015). Sin embargo, no existen reportes del efecto del ultrasonido en el desarrollo de fórmulas probióticas de lactosuero-avena. Dado la falta de conocimiento en ese aspecto, el objetivo de este estudio fue desarrollar una bebida funcional de lactosuero-avena sensorialmente aceptable, utilizando ultrasonido de alta intensidad como tecnología asistente. Mediante la evaluación *in vitro* del crecimiento de *L. casei*, la actividad antioxidante y la actividad antihipertensiva, además de la evaluación sensorial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del Probiótico

La bacteria probiótica empleada fue *Lactobacillus casei* (L. casei 431[®], CHR. Hansen México) como cultivo liofilizado de una cepa única. Cabe mencionar que esta cepa cuenta con el respaldo científico para ser denominada como probiótica, de tal forma que el proveedor bajo esa denominación la comercializa.

La reactivación se realizó en caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS. Fluka[®]) a 37 °C por 18 h (Fisher Scientific. Modelo 550D. Iowa, E.U.A.). Al finalizar la incubación se hizo un lavado doble de la biomasa con buffer de fosfatos (50 mM, pH 7.0) y centrifugación (5702R Eppendorf, Alemania) a 2000 rpm, 4 °C y 10 min. La biomasa final se resuspendió en caldo MRS (Fluka[®]) y se le denominó cultivo madre. En tubos Eppendorf[®] de 1 mL se colocaron 500 µL de cultivo madre y 500 µL de glicerina (J.T. Baker[®]) estéril, se mezcló manualmente y se congeló a -20 °C hasta su uso. Previo al uso del cultivo madre, se realizó una comprobación de viabilidad y ausencia de contaminación. Se realizó un conteo de unidades formadoras de colonia (UFC/mL) (Rasheed *et al.*, 2020). Las diluciones decimales seriadas se sembraron en agar MRS (Fluka[®]) y se incubaron a 37 °C por 48 h en microaerofilia. Las UFC/mL se calcularon con la ecuación 1. Sólo se realizó conteo en las diluciones que presentaron de 10 a 100 colonias.

$$\text{UFC/mL} = (\text{Número de colonias} * \text{factor de dilución}) / 0.01 \quad \text{Ecuación 1}$$

Formulación de las Bebidas de Lactosuero-Avena

Para elaborar las bebidas de lactosuero-avena, se obtuvo lactosuero siguiendo la metodología para la elaboración de queso fresco de Villegas de Gante (2012). Se partió de leche comercial fluida entera pasteurizada (Lala®). Se calentó a 42 °C y se agregó CaCl₂ (20 g/100 L), se homogeneizó mezclando la leche con movimientos en forma de ocho con un cucharón. Se enfrió a 34 °C para agregar la renina (Cuamix® CHR Hansen) en una concentración de 15 mL/100 L. Se dejó reposar 90 min, manteniendo la temperatura en 32 °C. Una vez formada la cuajada, se cortó suavemente en cuadros de 1 cm por 1 cm, para mejorar la sinéresis de la red proteica del cuajo y posterior liberación del lactosuero. Se dejó reposar 15 min y se redujo el tamaño de los coágulos de leche muy suavemente con una cuchara grande. Se calentó lentamente elevando 1 °C cada 5 min hasta 39 °C y se dejó reposar nuevamente durante 15 min. Se desueró con la ayuda de tela de algodón. Del lactosuero obtenido, se tomaron 40 mL para obtener el extracto soluble mediante doble centrifugación (Beckman Coulter. Modelo Avanti J-26 XP1. Serie JXT12H22. Indianápolis, E. U. A.) a 4,000 x g (5,75 rpm) por 30 min y 4 °C. El extracto se filtró con membranas de 2.5 µm (Whatman #42) mediante el uso de matraz, embudo de filtración y bomba de vacío. Posteriormente, el filtrado obtenido se pasó por una membrana (filtros de 0.2 µ) y, el producto resultante se colocó en tubos de plástico de 1 mL con tapa y fondo cónico para ser almacenados a -20 °C hasta los análisis. Del lactosuero restante se tomó el volumen necesario para mezclarse con la bebida de avena. La cual se obtuvo como lo reportó Herrera (2013). Se partió de granos de avena forrajera

(*Avena sativa* var. Karma) adquiridos con un proveedor local (Semillas Purasangre, Cuauhtémoc, Chihuahua). La avena se enjuagó con agua corriente y se puso a remojar en recipientes de plástico con agua destilada durante 12 h cambiando el agua cada 4 h. Se drenó y los granos de avena se colocaron en un recipiente de plástico con una capa superior e inferior de algodón humedecido y se dejaron germinar a temperatura ambiente (~25 °C) durante 72 h o hasta la emergencia de 1 cm del coleóptilo (protuberancia que dará origen a una nueva planta). Se hizo una modificación a la metodología que consistió en proteger la avena de la luz durante el proceso de germinación y manteniendo humedecido el algodón, asperjando agua cada 24 h. La avena germinada se extendió en charolas de acero inoxidable y se colocó en un horno de convección mecánica (603 Napco Scientific Company, E.U.A.) a 45 °C por 20 h. Posteriormente la avena se transfirió a un horno convencional con corriente de aire (SLGS/12SC Southbend, E.U.A.) a 95 °C por 3 h para obtener avena malteada. Ésta se molió (Retsch. Modelo LC-170. Haan Alemania) y se usó una malla de 1 mm. En un matraz Erlen Meyer (250 mL) con rosca se preparó la bebida de avena malteada con 5% p/v (el volumen se completó con agua purificada, Epura®) de harina y se colocó en un baño maría eléctrico (1203 VWR Scientific, E.U.A.) a 90 °C por 60 min y después en un baño de agua a 50 °C por 30 min. La bebida de avena se decantó, se refrigeró (4 °C) por 24 h y se volvió a decantar. Esta bebida de avena se mezcló con lactosuero en las proporciones 65/35, 50/50 y 35/65, respectivamente. Se adicionó 1.5% p/v de azúcar morena de caña (Zulka®). Cabe mencionar que se eligieron esas proporciones debido a que Castro *et al.* (2013b)

sugirieron que las bacterias ácido lácticas probióticas del género *Lactobacillus* poseen un límite para el uso de nutrientes en lactosuero. Reportaron que la cantidad máxima para el adecuado desarrollo fue de 65% v/v, completando el volumen con 35% v/v de leche.

Tratamiento Ultrasónico

Como pre-tratamiento de la fermentación se aplicó ultrasonido en las bebidas de lactosuero-avena, contenidas en frascos de vidrio de 1 L (Pyrex®). Se hicieron nueve tratamientos, variando la proporción de lactosuero/avena con niveles complementarios de 35, 50 y 65% v/v; y la ausencia o aplicación de ultrasonido (40 kHz y 11W/cm²) por 3 o 10 min (Cuadro 7). La sonicación se realizó en un baño ultrasónico (Branson® 1510R-MTH, Branson Ultrasonic Corporation. Danbury, CT, E.U.A.) con capacidad de 2.25 L (15 x 15 x10 cm), usando 1000 mL de agua destilada. Durante la aplicación del ultrasonido, se mantuvo la temperatura del agua a 4 °C mediante el uso de un termómetro digital y hielo. Cabe mencionar que se usó este equipo de ultrasonido por ser de alta intensidad y debido a su disponibilidad en la Facultad de Zootecnia y Ecología.

Proceso de Fermentación

Para acondicionar el microorganismo a los sustratos presentes en las bebidas de avena y lactosuero con ultrasonido, primero se tomó 1 vial (congelado -20 °C) de *L. casei*, se resuspendió en 20 mL de caldo MRS (Fluka®) y se incubó (Fisher Scientific. Modelo 550D. Iowa, E.U.A.) a 37 °C por 12 h en microaerofilia. Se utilizó una concentración inicial de inóculo suficientemente alta para considerar la bebida probiótica.

Cuadro 7. Composición y tratamiento de bebidas de lactosuero/avena para la formulación de bebidas probióticas

Tratamiento	Composición (v/v)	Ultrasonido (min)
35/65/0	35% lactosuero – 65% avena	0
50/50/0	50% lactosuero – 50% avena	0
65/35/0	65% lactosuero – 35% avena	0
35/65/3	35% lactosuero – 65% avena	3
50/50/3	50% lactosuero – 50% avena	3
65/35/3	65% lactosuero – 35% avena	3
35/65/10	35% lactosuero – 65% avena	10
50/50/10	50% lactosuero – 50% avena	10
65/35/10	65% lactosuero – 35% avena	10

Se hizo un pre-cultivo de cada formulación con un inóculo al 3% v/v. Se incubó (Fisher Scientific. Modelo 550D. Iowa, E.U.A.) a 37 °C por 9 h en microaerofilia.

Posteriormente se realizó un monitoreo de viabilidad (Rasheed *et al.*, 2020) de *L. casei* (UFC/mL) en los precultivos para corroborar que se partió de una población probiótica (10^6 - 10^8 UFC/mL o 6 – 8 log UFC/mL). Es importante mencionar que la cepa empleada (*L. casei* 431®. Christian Hansen) es denominada probiótica por el proveedor y cuenta con la evidencia científica necesaria.

Por otra parte, como era desconocido el comportamiento de esta bacteria en la bebida lactosuero/avena, se decidió iniciar con una concentración probiótica de inóculo.

Se tomó el volumen necesario de precultivo para inocular al 3% v/v, 100 mL de bebida contenida en matraces Erlen Meyer de 250 mL con rosca (Herrera, 2013). La fermentación se realizó en una incubadora con agitación (Innova® 43. Connecticut, E.U.A) a 37 °C y 182 rpm, se detuvo enfriando a 4 °C cuando el pH alcanzó un valor entre 4.5 y 4.2. A este pH se alcanzó la población establecida como probiótica que es de 7 a 8 Log UFC/mL (Granato *et al.*, 2020). Esta fue evaluada mediante un monitoreo de viabilidad durante la fermentación. Sin embargo, se ha reportado que el pH recomendado sensorialmente para detener la fermentación es 4.7-4.6 (Güler-Akın *et al.*, 2016). Al inicio y al final de la fermentación se midió el pH (Thermo Scientific Orion Dual Star, Singapur), la viabilidad y crecimiento neto de *L. casei* (Rasheed *et al.*, 2020).

Actividad Antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante del extracto soluble de las bebidas probióticas de lactosuero/avena con el método del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Según lo reportado por Thaipong *et al.* (2006) con ligeras modificaciones. Se preparó una solución stock metanólica (J.T. Baker®) 0.6 mM de DPPH, se almacenó en un frasco ámbar y se congeló a -20 °C hasta su uso. Para preparar la solución de trabajo se tomaron 10 mL de la solución stock y se mezclaron con 45 mL de metanol para llegar a una absorbancia de 1.1 ± 0.02 . Para la determinación se colocaron 150 μ L de muestra (o estándar: Trolox) y 2850 μ L de la solución de trabajo DPPH en frascos ámbar y se dejaron reposar 24 h en la oscuridad a temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente, se colocó cada muestra en una celda de cuarzo y se leyó la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro UV (UV-1800. Shimadzu, Japón). La actividad antioxidante se reportó como mM equivalente Trolox/mL, empleando la absorbancia obtenida y sustituyendo en la ecuación de la recta. Esta última se generó a partir de una curva de calibración con Trolox. Se prepararon estándares de Trolox en un rango de concentración de 0.01 a 1.0 mM Trolox/mL y se siguió la misma metodología de actividad antioxidante.

Análisis Sensorial

Con el propósito de conocer el grado de aceptación sensorial de las nueve bebidas probióticas se llevaron a cabo tres sesiones de análisis sensorial. El panel estuvo integrado por 43 panelistas no entrenados, estudiantes de licenciatura de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de

Chihuahua. De los cuales 42% fueron hombres y 58% mujeres, con un rango de edad de 20 a 30 años (23 años en promedio). El reclutamiento fue vía invitación en áreas comunes y en salones de clase. Los criterios de selección de los panelistas se basaron en: 1) Ausencia de enfermedades respiratorias; 2) consumidor habitual de productos lácteos; y 3) interés por participar en la investigación. La evaluación se llevó a cabo en el laboratorio de Análisis Sensorial de dicha Facultad, equipado con 12 cabinas y se usó luz blanca fluorescente para la mejor observación de las bebidas. Las bebidas se elaboraron un día antes de la evaluación y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta la prueba. A cada panelista se le presentaron 30 mL de cada bebida, colocadas en diferente orden y codificadas con números aleatorios de tres dígitos. Los panelistas calificaron la aceptación del color, olor, sabor, viscosidad y general. A través de una escala hedónica de cinco puntos donde la calificación 5 se refiere a “me gusta”, 4 a “me gusta ligeramente”, 3 a “ni me gusta ni me disgusta”, 2 a “me disgusta ligeramente” y 1 a “no me gusta” (Lawless y Heymann, 2010). El formato empleado se muestra en el Apéndice A. Entre muestras, los panelistas descansaron durante 1 min y se enjuagaron la boca con agua. Las muestras se presentaron en un diseño equilibrado (MacFie *et al.*, 1989).

Análisis Estadístico

Dado que los resultados del análisis sensorial eran valores categóricos en escala ordinal (1 a 5), y estos generalmente no cumplen el supuesto de normalidad, los datos se analizaron adicionalmente mediante la prueba no paramétrica de Chi Cuadrada. La cual no requiere ningún supuesto distribucional.

Para ello se utilizó el procedimiento FREQ (SAS, 2006) y posteriormente, cuando la asociación fue significativa ($P < 0.05$) o mostró alguna tendencia ($0.05 < P < 0.15$), se realizó un Análisis de Correspondencias. Con el objetivo de observar el grado de similitud entre tratamientos y el nivel de correspondencia de tratamientos con los niveles de respuesta de aceptación sensorial, usando para ello el procedimiento CORRESP de SAS (SAS, 2006).

Los resultados de este estudio fueron evaluados mediante un arreglo factorial completamente al azar, donde los factores considerados y sus niveles fueron A: Proporción lactosuero/avena (se describen en el Cuadro 7) y B: Tiempo de ultrasonido, con niveles: 0, 3 y 10 min. Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) mediante el procedimiento del Modelo Lineal Generalizado del paquete SAS (SAS, 2006), con el siguiente modelo estadístico (Ecuación 2):

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Dónde: Y_{ijk} = variable respuesta medida en la repetición k del nivel de ultrasonido i y la proporción lactosuero/avena j , μ = media general, A_i = efecto de la aplicación de ultrasonido i , B_j = efecto de la proporción lactosuero/avena j , AB_{ij} = efecto de la interacción de la aplicación de ultrasonido i y proporción lactosuero/avena j , y ε_{ijk} = error aleatorio de la repetición k del nivel de ultrasonido i y la cantidad de lactosuero/avena j ; el cual se supone idéntica e independientemente distribuido de manera normal, con media 0 y varianza σ^2 . Cuando el efecto de un factor fue significativo ($P < 0.05$) se realizó la comparación múltiple de medias de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Proceso de Fermentación

Durante la fermentación de bebidas de lactosuero/avena con y sin ultrasonido, se encontró efecto ($P < 0.01$) de la proporción lactosuero/avena, el tiempo de ultrasonido y la interacción de estas dos variables en el crecimiento de *L. casei*. En general, los niveles de crecimiento significativamente ($P < 0.05$) más altos se registraron a 3 min de ultrasonido, seguido de las bebidas sin ultrasonido y finalmente las formulaciones con 10 min de ultrasonido. Mientras que en los niveles de lactosuero/avena, el mayor ($P < 0.05$) crecimiento se presentó en la proporción 50/50, seguida de 35/65 y por último 65/35. Sin embargo, lo anterior no fue consistente en todas las combinaciones de lactosuero/avena y tiempo de ultrasonido, debido al efecto de interacción (Cuadro 8).

Las combinaciones en las que se generó más alto ($P < 0.05$) crecimiento fueron 50/50/0 y 50/50/3 (lactosuero/avena/min de ultrasonido) con valores de 1.96 ± 0.007 y 2.00 ± 0.021 Log UFC/mL, respectivamente pero no fueron diferentes ($P > 0.05$) de la bebida 65/35/3 con 1.85 ± 0.051 Log UFC/mL. A su vez, esta última formulación, fue igual ($P > 0.05$) que las bebidas 35/65/0 y 35/65/10 con una viabilidad de 1.68 ± 0.034 y 1.64 ± 0.008 Log UFC/mL, respectivamente. Las formulaciones con los resultados más bajos fueron 65/35/10, 65/35/0 y 50/50/10 con 0.71 ± 0.041 , 0.84 ± 0.011 y 0.90 ± 0.063 Log UFC/mL, correspondientemente. Las dos últimas bebidas no fueron diferentes ($P > 0.05$) a la integrada por 35/65/3 con 1.02 ± 0.014 Log UFC/mL.

Cuadro 8. Efecto de la proporción lactosuero/avena y tiempo de ultrasonido sobre el pH, la población y el crecimiento de *L. casei* en bebidas probióticas (media \pm E. E.)

Proporción lactosuero/avena (% v/v)	Ultrasonido ¹ (min)	Población Inicial (Log UFC/mL)	Población Final (Log UFC/mL)	Crecimiento (Log UFC/mL)	pH Inicial	pH Final
35/65	0	7.11 \pm 0.031	8.79 \pm 0.007	1.68 \pm 0.034 ^b	6.58 \pm 0.004 ^c	4.24 \pm 0.001
50/50	0	6.48 \pm 0.000	8.44 \pm 0.007	1.96 \pm 0.007 ^a	6.62 \pm 0.001 ^b	4.32 \pm 0.002
65/35	0	6.16 \pm 0.101	7.00 \pm 0.000	0.84 \pm 0.101 ^{cd}	6.53 \pm 0.001 ^d	4.37 \pm 0.000
35/65	3	6.84 \pm 0.023	7.86 \pm 0.012	1.02 \pm 0.014 ^c	6.36 \pm 0.001 ^g	4.22 \pm 0.000
50/50	3	6.67 \pm 0.020	8.66 \pm 0.003	2.00 \pm 0.021 ^a	6.65 \pm 0.001 ^a	4.52 \pm 0.001
65/35	3	6.93 \pm 0.029	8.79 \pm 0.028	1.85 \pm 0.051 ^{ab}	6.62 \pm 0.000 ^b	4.34 \pm 0.008
35/65	10	7.10 \pm 0.014	8.74 \pm 0.014	1.64 \pm 0.008 ^b	6.58 \pm 0.001 ^c	4.25 \pm 0.001
50/50	10	6.10 \pm 0.063	7.00 \pm 0.000	0.90 \pm 0.063 ^{cd}	6.47 \pm 0.000 ^f	4.35 \pm 0.001
65/35	10	6.59 \pm 0.041	7.30 \pm 0.000	0.71 \pm 0.041 ^d	6.49 \pm 0.002 ^e	4.25 \pm 0.006

¹40 kHz, 11 W/cm²

UFC, Unidades formadoras de colonia.

a, b, c, d, e, f, g Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencia significativa (P<0.05).

A pesar de que hubo efecto de interacción de los factores proporción lactosuero/avena y tiempo de ultrasonido, al comparar los tratamientos con los mejores resultados 50/50/0 y 50/50/3 con una de las formulaciones que generó bajo crecimiento 50/50/10, se puede decir que el tiempo de ultrasonido tiene cierto “límite” para producir efectos benéficos en el desarrollo de *L. casei*. En este sentido se ha reportado que el efecto del ultrasonido de alta intensidad sobre cepas probióticas en productos lácteos depende principalmente de la intensidad, tiempo de exposición, tipo de cepa, entre otros (Huang *et al.*, 2017). Yeo y Liang (2011) aplicaron ultrasonido (30 kHz) a 20, 60 o 100 W durante 1, 2 o 3 min en el cultivo de *L. casei* ATCC 393 e inocularon una bebida de soya. Al final de la fermentación a 37 °C por 24 h y encontraron que el tiempo y la potencia tuvieron efecto significativo ($P=0.001$ y $P=0.03$) pero la interacción no ($P=0.45$). La mayor viabilidad se encontró a 100 W durante 2 min con 8.80 ± 0.29 Log UFC/mL y a esta misma potencia pero a mayor tiempo, 3 min, fue de 8.33 ± 0.77 Log UFC/mL.

Chandrapala *et al.* (2011) aplicaron ultrasonido (20 kHz, 450 W y 50% de amplitud) en lactosuero reconstituido durante 1, 5, 10, 20, 30 o 60 min. Ellos reportaron que la entalpía de la solución disminuyó hasta los 5 min de ultrasonido, desatancando la ruptura de enlaces en las proteínas. Pero después de este tiempo la entalpía de la solución aumentó, sugieren que hubo una re-agregación de proteínas. Lo anterior en base a que se ha encontrado que la agregación de moléculas desnaturalizadas, conlleva la formación de nuevos enlaces intermoleculares por un aumento en la entalpía en mediciones de calorimetría diferencial de barrido (Choi *et al.*, 2009). Adicionalmente, Chandrapala *et al.* (2011) encontraron que la viscosidad de la solución de lactosuero, disminuyó

hasta los 5 min y aumentó después de este tiempo. Jambrak *et al.* (2014) observaron una agregación parcial de proteínas de lactosuero, por el aumento en el tamaño de las mismas al aplicar ultrasonido (40 kHz y 1 W/cm²) por 30 min en comparación a cuando se aplicó durante 15 min.

Por otra parte, en el presente estudio los niveles de la población final de *L. casei*, en todos los tratamientos lactosuero/avena/ultrasonido estuvieron dentro del nivel establecido como probiótico que es de 10⁷ a 10⁸ UFC/mL o 7 a 8 Log UFC/mL (Granato *et al.*, 2020). Se han reportado valores más bajos y más altos de viabilidad en bebidas probióticas de lactosuero con *L. casei*. Pero cabe mencionar que las condiciones de fermentación e ingredientes, además del tipo de lactosuero no fueron los mismos. Bulatović *et al.* (2012) elaboraron una bebida de lactosuero reconstituido, mediante la fermentación a 37 °C durante 10.5 h con *L. casei* ssp. *casei* ATCC 27139. Ellos reportaron una población final de 6.8 Log UFC/mL, pero detuvieron la fermentación cuando el pH alcanzó 4.6. Kumar *et al.* (2017) formularon una bebida simbiótica con *Lactobacillus casei* NCDC 298 e inulina. Además, adicionaron lactosuero de búfalo, saborizante y azúcar. Fermentaron a 37°C por 16 h y obtuvieron una viabilidad de 9 x 10⁸ con un pH de 4.3.

Con lo anterior, se puede inferir que la combinación lactosuero/avena fue una adecuada combinación para favorecer el desarrollo de *L. casei*. En este sentido, se ha reportado que la avena tiene propiedades prebióticas (Sharma *et al.*, 2017).

Asimismo, se encontró que al formular una bebida de leche con 4% p/v de salvado de avena y *Lactobacillus paracasei* IMC 502, la viabilidad al final de la

fermentación a 37 °C por 16 h fue significativamente ($P < 0.05$) mejor que en leche sin avena. Los valores fueron 9.57 ± 0.12 Log UFC/ml contra 8.28 ± 0.14 Log UFC/ml (Coman *et al.*, 2013).

Por otro lado, aunque en el presente estudio no se encontró un efecto del ultrasonido por sí solo, debido a la interacción con la proporción lactosuero/avena, otros autores sí han observado influencia del ultrasonido en el crecimiento de cepas probióticas.

Barukčić *et al.* (2015) aplicaron ultrasonido (20 kHz, 84 W y 37 °C) por 150 s en el cultivo de *Lactobacillus acidophilus* La-5[®] e inocularon y fermentaron lactosuero pasteurizado. Encontraron que el tiempo de fermentación se acortó 30 min y la viabilidad al final del proceso fue $5.38 \times 10^8 \pm 0.22$ UFC/mL contra $1.39 \times 10^8 \pm 0.43$ cuando no se aplicó ultrasonido. Potoroko *et al.* (2018) usaron ultrasonido (22 kHz y 20 W/cm²) como pre-tratamiento en la elaboración de bebidas fermentadas. Evaluaron 6, 9 y 120 W por 1, 3 y 5 min. Reportaron que el mayor crecimiento del género *Lactobacillus* spp., se registró a una potencia de 90 W durante 3 min para yogurt y una potencia 120 W por 3 min para kéfir.

En cuanto al pH al inicio de la fermentación, se encontró que la proporción lactosuero/avena, el tiempo de ultrasonido y la interacción de estas dos variables presentaron efecto ($P < 0.001$) sobre el pH. En orden significativamente descendente ($P < 0.05$) los valores de pH fueron 6.58, 6.54 y 6.50 para las proporciones lactosuero/avena 50/50, 65/35 y 35/65, respectivamente. Mientras que en el tiempo de aplicación de ultrasonido fueron 6.57, 6.54 y 6.51 a 0, 3 y 10 min, respectivamente. Casi todas las formulaciones tuvieron pH inicial diferente. El mayor pH (6.65) lo tuvo la formulación 50/50/3, seguida de las bebidas 65/35/3

y 50/50/0 con 6.62 y sin diferencia entre ellas ($P>0.05$), pero diferentes ($P<0.05$) a las formulaciones 35/65/0 y 35/65/10 con 6.58 y estas a su vez diferentes ($P<0.05$) con el resto de las bebidas: 65/35/0 con 6.53, 65/35/10 con 6.49, 50/50/10 con 6.47 y 35/65/3 con 6.36. Con lo anterior, se observa el efecto de la interacción del tiempo de ultrasonido aplicado y de la proporción lactosuero/avena. Estos valores de pH fueron casi el promedio del pH de los dos ingredientes mayoritarios de la bebida, lactosuero con pH de 6.95 y la bebida de avena con 6.0.

En cuanto a los valores de pH final, se ha reportado que se recomienda detener la fermentación cuando las bebidas tienen un pH entre 4.6 y 4.7 para asegurar la aceptación sensorial (Gallardo-Escamilla *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2013a; Güler-Akın *et al.*, 2016). Sin embargo, en el presente estudio se observó que deteniendo la fermentación a dicho pH aún no se contaba con la población probiótica ideal, por lo que se decidió detener la fermentación hasta que el pH tuviera valores entre 4.2 y 4.3. Aunque tener el registro del tiempo en el que *L. casei* tardó en llegar a dicho pH en cada formulación, sería lo ideal, no se contó con ese registro. Solo se tuvo el dato de que en general, el tiempo en llegar al pH alcanzar una población de 7 Log UFC/mL mínimo fue de 8 a 11 h. Resultados similares fueron observados en la fermentación a 37 °C, de bebidas simbióticas de lactosuero, inulina y *L. casei* NCDC 298. En donde se alcanzó un pH de 4.2 a las 16 h de fermentación con una población final de 8.95 Log UFC/mL (Kumar *et al.*, 2017). Aunque los factores de pH y la población final que reportaron estos autores, fueron similares a los obtenidos en la presente investigación, el tiempo de fermentación fue mayor probablemente por la acción del ultrasonido. Nguyen

et al. (2009) fermentaron a 37 °C, leche con probióticos. Aplicaron ultrasonido (20 kHz, amplitud del 50% y 100 W) durante 7, 15 o 30 min. Ellos detuvieron la fermentación hasta que el pH llegó a 4.7 y este tiempo fue de 20 h, se usó ultrasonido por 15 min y el microorganismo empleado fue *Bifidobacterium breve*. El control tardó 25 h en llegar al pH requerido.

Actividad Antioxidante

La proporción lactosuero/avena y el tiempo de ultrasonido tuvieron un efecto significativo ($P < 0.001$) sobre la actividad antioxidante. No existió interacción significativa entre las dos variables ($P = 0.59$). En cuanto a la proporción lactosuero/avena la mejor y mayor actividad antioxidante ($P < 0.05$) se registró en las proporciones 35/65 y 50/50. En tanto que 65/35 tuvo menor actividad (Cuadro 9). Al parecer a mayor cantidad de bebida de avena, mayor actividad antioxidante. La biodisponibilidad de las avenantramidas, que son los fenoles bioactivos exclusivamente encontrados en la avena, es muy variable y puede atribuirse a la diferencia en estabilidad química o la unión a proteínas de la leche en algunas bebidas (Chen *et al.*, 2019). Chen *et al* (2020) encontraron que la fermentación de avena con una levadura (*Monascus anka*) y una bacteria (*Bacillus subtilis*) aumentó ($P < 0.05$) el contenido fenólico total, que cuando no se fermentó. Y se ha reportado que los compuestos fenólicos como las avenantramidas son los responsables de la actividad antioxidante de la avena (Fagerlund *et al.*, 2009).

Cuadro 9. Efecto de la proporción lactosuero/avena y tiempo de ultrasonido en la actividad antioxidante de bebidas probióticas (media \pm E. E.)

Proporción lactosuero/avena (% v/v)	Ultrasonido ¹ (min)	Actividad antioxidante ² (mM equivalente Trolox/mL)
35/65	0	3.77 \pm 0.160 ^{ab}
50/50	0	3.76 \pm 0.259 ^{ab}
65/35	0	3.31 \pm 0.109 ^b
35/65	3	4.41 \pm 0.056 ^a
50/50	3	3.99 \pm 0.142 ^{ab}
65/35	3	3.60 \pm 0.117 ^b
35/65	10	4.00 \pm 0.070 ^{ab}
50/50	10	3.96 \pm 0.297 ^{ab}
65/35	10	3.26 \pm 0.205 ^b

¹40 kHz, 11 W/cm²

² Medida con la metodología del radical DPPH

^{a, b} Medias con diferente literal indican diferencia significativa (P<0.05).

En lo referente al tiempo de aplicación de ultrasonido, 10 min fue estadísticamente igual ($P > 0.05$) a 0 y 3 min. Pero sí hubo diferencia ($P < 0.05$) entre 0 y 3 min, generándose mayor actividad antioxidante a 3 min. En este sentido, se ha reportado que la aplicación de ultrasonido de alta intensidad como pre-tratamiento de la fermentación mejora la actividad antioxidante (Uluko *et al.*, 2015).

Potoroko *et al.* (2018) encontraron que el tratamiento ultrasónico (22 kHz, 20 W/cm² y 90 W) por 3 min dio lugar a una mayor actividad antioxidante con un valor de 3.7 mg de ácido ascórbico/100g, que cuando no se aplicó esta tecnología y se obtuvo un valor de 1.2 mg de ácido ascórbico/100 g.

La bebida que presentó mayor valor numérico de actividad antioxidante fue la compuesta por 35/65/3. Aunque esta sólo fue diferente ($P < 0.05$) de las formulaciones con la proporción 65/35 lactosuero/avena a 0, 3 y 10 min de ultrasonido. Estos resultados indican que para la actividad antioxidante de bebidas probióticas, en las condiciones aquí empleadas influye más la proporción de lactosuero/avena que el tratamiento ultrasónico.

Se ha demostrado que la biodisponibilidad de la avena aumenta considerablemente cuando se une a las proteínas del lactosuero (Chen *et al.*, 2019). Probablemente cuando la proporción de avena es del 50% o mayor, en una bebida con lactosuero, su biodisponibilidad se encuentra al máximo como se observó en el presente estudio. Adicionalmente se ha reportado que la biodisponibilidad de la avena depende también de la secuencia que presentan los aminoácidos de sus péptidos. Ma *et al.* (2018) observaron que un péptido de la globulina de avena, contiene elevadas cantidades de residuos de aminoácidos

hidrofóbicos como Leu, Ile, Pro, Phe, Ser y Gly; aromáticos como Tyr; sulfurados como Met. Lo que puede ser la razón de la actividad antioxidante de la avena.

Gholamhosseinpour y Hashemi (2018), determinaron la actividad antioxidante de leche probiótica con *Lactobacillus plantarum* sometida a ultrasonido (30 kHz, 100 W y 25% de amplitud) por 15 min previo a la fermentación, y encontraron que esta tecnología mejoró significativamente ($P < 0.05$) la capacidad para inhibir el radical DPPH a comparación de la muestra donde no se aplicó ultrasonido; con valores de 89.6% y 60%, respectivamente.

Estos autores mencionan que el ultrasonido propició la liberación de compuestos antioxidantes. En cuanto a bebidas probióticas de lactosuero Nursiwi *et al.* (2017) prepararon formulaciones de lactosuero-jugo de tomate, 10 % p/v azúcar, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y 0.7% p/v pectina de alto metoxilo que con 15% de jugo de tomate y 85% de lactosuero se generó el mayor porcentaje de actividad antioxidante (9.07%). Por su parte, Bulatović *et al.* (2012) reportan un 45 – 50% de actividad antioxidante en bebidas con 60% lactosuero, 30% leche y probióticos. Finalmente, un estudio de Alvarado Pérez *et al.* (2018) reporta péptidos mayores a 11 kDa y menores a 3 kDa en los productos de la hidrólisis de lactosuero con *Bacillus subtilis* con un porcentaje de actividad antioxidante de 82.33 y 76.54%, respectivamente. Quizás en el presente trabajo se dieron condiciones similares a las encontradas por esos autores, de tal manera que la combinación de lactosuero, avena y tratamiento ultrasónico resultara en las condiciones favorables para tener las actividades antioxidantes que se mostraron en la presente investigación.

Lo anterior sugiere continuar con este tipo de investigación enfocada al estudio de las fracciones peptídicas que contengan las actividades antioxidantes y los factores que las afecten.

Análisis Sensorial

La aceptación sensorial de las bebidas probióticas de lactosuero/avena estuvo entre 1.74 ± 0.167 y 2.56 ± 0.177 , de una escala hedónica de 5 puntos, donde 5 se refiere a me gusta mucho, 4 a me gusta ligeramente, 3 a ni me gusta ni me disgusta, 2 a me disgusta ligeramente y 1 a me disgusta. Por lo que se podría decir que en general, la aceptación fue baja (Cuadro 10). Posiblemente debido al sabor fuerte del lactosuero/avena fermentados. No existió efecto de la proporción lactosuero/avena ($P=0.05$), tiempo de ultrasonido ($P=0.06$) ni interacción de factores ($P=0.06$) sobre la aceptación sensorial de las bebidas probióticas. Por otro lado, el análisis de chi cuadrada mostró que sí hubo asociación ($P=0.01$) entre el tratamiento y la aceptación sensorial de los panelistas.

En el análisis de correspondencia (Gráfica 1) se muestra que las bebidas con mayor correspondencia a “gusta”, “indiferente” y “disgusta” fueron 50/50/3, 50/50/0 y 35/65/0, respectivamente.

Mientras tanto, las formulaciones 35/65/3, 50/50/10, 35/65/10, 65/35/3, 65/35/0 y 65/35/10 tuvieron más correspondencia fue con la categoría “disgusta”. Cabe mencionar que hubo similitud entre las dos últimas formulaciones mencionadas.

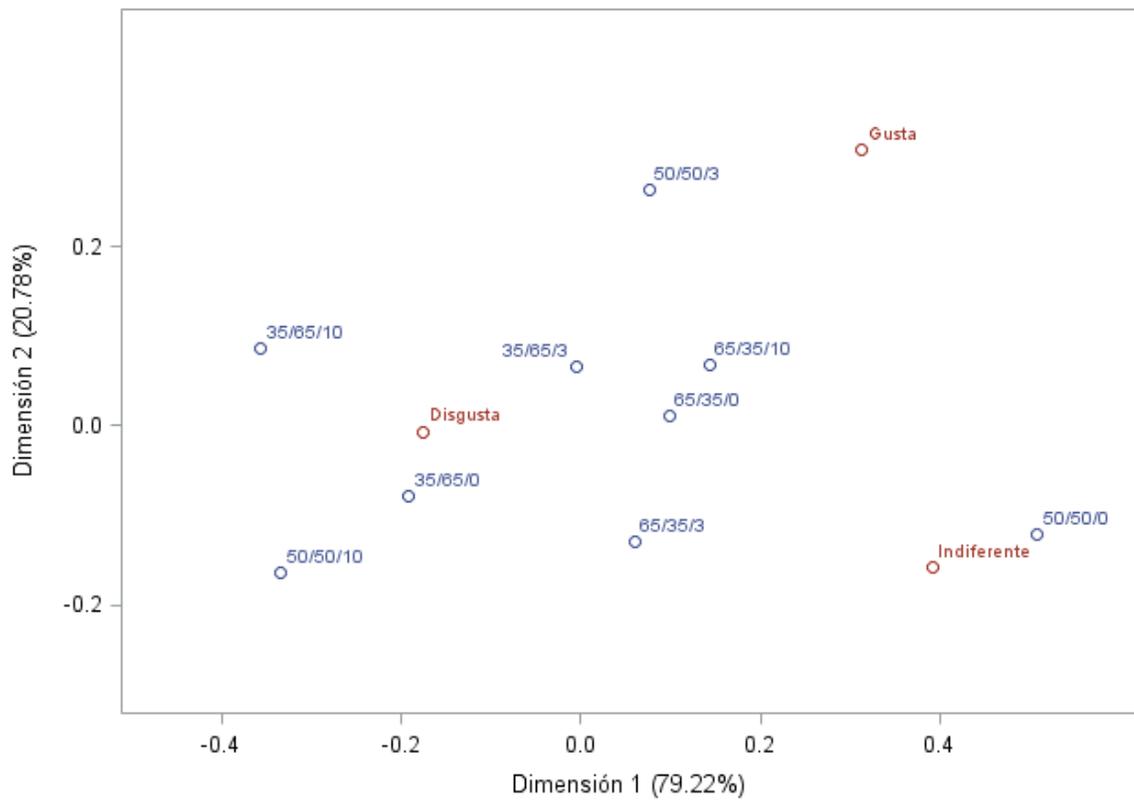
Cuadro 10. Efecto de la proporción lactosuero/avena y tiempo de ultrasonido en la aceptación sensorial de bebidas probióticas (media \pm E.E.)

Proporción lactosuero/avena (% v/v) ¹	Ultrasonido ¹ (min)	Aceptación sensorial ²
35/65	0	1.88 \pm 0.142 ^a
50/50	0	2.56 \pm 0.177 ^a
65/35	0	2.19 \pm 0.160 ^a
35/65	3	2.00 \pm 0.170 ^a
50/50	3	2.23 \pm 0.194 ^a
65/35	3	2.05 \pm 0.170 ^a
35/65	10	1.74 \pm 0.167 ^a
50/50	10	1.77 \pm 0.119 ^a
65/35	10	2.21 \pm 0.168 ^a

¹ 40 kHz, 11 W/cm²

² Escala hedónica: 5 = me gusta, 4 = me gusta ligeramente, 3 = ni me gusta ni me disgusta, 2 = me disgusta ligeramente, 1 = no me gusta

^a Medias con diferente literal indican diferencia significativa (P<0.05).



Gráfica 1. Análisis de correspondencia de la aceptación sensorial realizada por 43 panelistas no entrenados y el tratamiento aplicado a bebidas probióticas de lactosuero/avena. Los tratamientos corresponden a % v/v lactosuero / % avena / min de ultrasonido (40 kHz, 11 W/cm²).

La probabilidad para la asociación entre la aceptación sensorial y la proporción lactosuero/avena; y con el tiempo de ultrasonido, tuvo valores justo por debajo de 0.15.

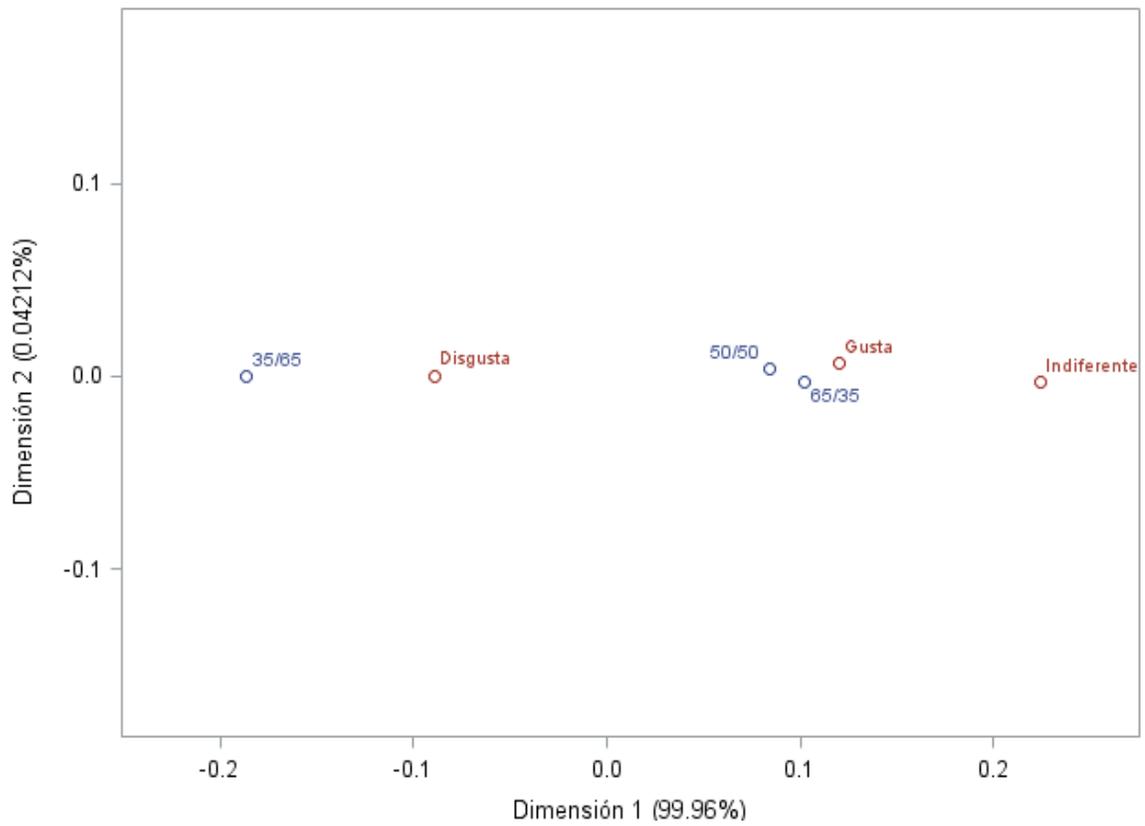
Lo que podría indicar una tendencia a la asociación ($0.05 < P < 0.15$). Por lo que se sugiere que en futuros estudios se modifique el tamaño de muestra o se agreguen otros factores al modelo de estudio. De esta manera, el valor de los residuales puede cambiar y así obtener valores de $P \leq 0.05$.

Tomando en cuenta el rango de tendencia propuesto, la proporción lactosuero/avena tuvo cierta asociación con el nivel de aceptación ($P=0.15$). Al igual que la aplicación y/o el tiempo de ultrasonido ($P=0.09$). De tal manera que, para el primer caso, la proporción lactosuero/avena con más correspondencia a “gusta” fue 65/35, seguida de 50/50, además hubo similitud entre ellas. La proporción 35/65 fue la menos aceptada ya que fue la que tuvo más correspondencia con “disgusta” que las otras (Gráfica 2). Para el segundo caso, los resultados reflejaron que el nivel de ultrasonido más correspondiente a “gusta” fue el de 3 min (MedioUS), a “indiferente” el de 0 min (SinUS) y a “disgusta” el de 10 min (AltoUS) (Gráfica 3).

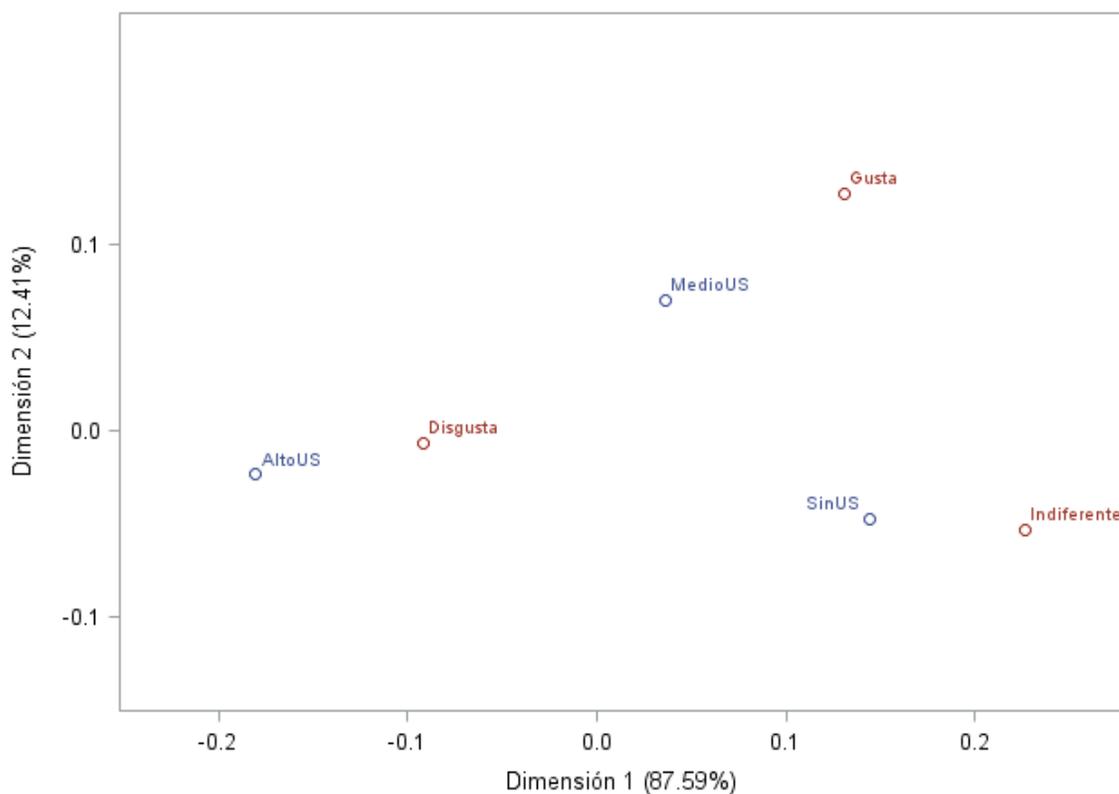
En lo que respecta a los panelistas hombres y la aceptación sensorial de las bebidas probióticas, no hubo diferencia significativa ni tendencia ($P=0.23$).

Pero en las panelistas mujeres, sí se presentó tendencia a la asociación entre los tratamientos y el nivel de aceptación ($P=0.07$).

Los resultados (Gráfica 4) muestran que la bebida con mayor correspondencia a la categoría “gusta” fue la de 50/50/3 y no tuvo similitud con las demás.



Gráfica 2. Análisis de correspondencia de la aceptación sensorial realizada por 43 panelistas no entrenados y la proporción lactosuero/avena en bebidas probióticas. Los tratamientos corresponden a 35/65 = 35 % v/v lactosuero con 65 % v/v avena; 50/50 = 50 % v/v lactosuero con 50 % v/v avena; 65/35 = 65 % v/v lactosuero con 35 % v/v avena.

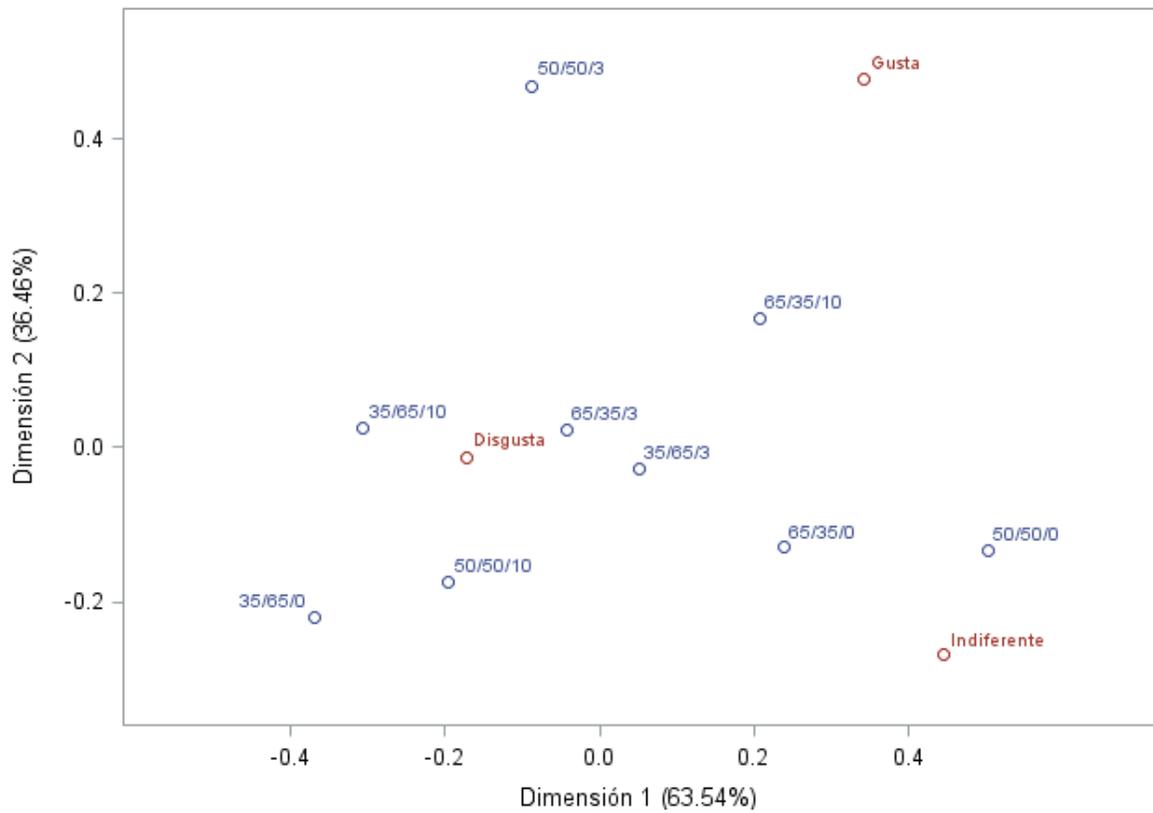


Gráfica 3. Análisis de correspondencia de la aceptación sensorial realizada por 43 panelistas no entrenados y la aplicación de diferente tiempo ultrasonido en bebidas probióticas de lactosuero/avena. El tiempo de ultrasonido (40 kHz, 11 W/cm²) corresponde a SinUS = 0 min; MedioUS = 3 min; AltoUS = 10 min.

Las formulaciones 50/50/0 y 65/35/0 fueron las más cercanas a “indiferente” y las bebidas menos aceptadas y correspondientes a “disgusta” fueron 35/65/10 y 65/35/3, esta última tuvo similitud con 35/65/3. Pero, no hubo asociación ni tendencia a esta en la aceptación y la proporción lactosuero/avena o el tiempo de ultrasonido ($P=0.23$ y $P=0.22$, respectivamente).

Para analizar la influencia del ultrasonido en la aceptación sensorial de bebidas lácteas, se han reportado efectos positivos y negativos. Por ejemplo, Jeličić *et al.* (2012) encontraron que el lactosuero con ultrasonido (24 kHz, 400 W a 100% de amplitud) a 45 °C durante 8 min, tuvo mejor aceptación sensorial que el lactosuero fresco y el pasteurizado. Los panelistas expresaron que las muestras ultrasonificadas dejaban mejor sensación en la boca que aquellas que no se ultrasonificaron.

Sfakianakis y Tzia (2017) elaboraron yogurt a partir de leche homogenizada con ultrasonido (20 kHz, 375 W y 50% de amplitud), por 10 min o de forma convencional a 30 MPa. Observaron que la aceptación general fue menor en las muestras con ultrasonido, lo cual atribuyeron a la presencia de un sabor desagradable dominante. Marchesini *et al.* (2015) también encontraron un efecto negativo sobre el sabor de la leche, al aplicar ultrasonido (24 kHz y 160.4 J/s) durante más de 100 s. Debido al desarrollo de sabores metálicos, a “quemado” y gomosos causados por la presencia de compuestos volátiles como ácido dodecanoico, ácido octanoico, δ -dodecalactona y éster metílico del ácido decanoico.



Gráfica 4. Análisis de correspondencia de la aceptación sensorial realizada por 25 panelistas mujeres no entrenadas y el tratamiento aplicado en bebidas probióticas de lactosuero/avena. Los tratamientos corresponden a % v/v lactosuero / % avena / min de ultrasonido (40 kHz, 11 W/cm²).

Adicionalmente, Riener *et al.* (2009) y Chouliara *et al.* (2010) reportaron la percepción de estos mismos sabores en leche sonicada (24 kHz, 400 W) por 15 min y (24 kHz y 200 W) por 2 min, respectivamente.

Sin embargo, Vercet *et al.* (2002) comprobaron que el sabor a “quemado” en leche manotermosonicada (20 kHz, 117 μm , 2 kg/cm²) a 40 °C por 12 s, dejó de ser percibido después de fermentar la leche para elaborar yogurt batido. Estos investigadores infieren que lo anterior, probablemente se debió a que los compuestos de aroma y sabor producidos por la fermentación lograron enmascarar el sabor desagradable de la leche manotermosonicada. Tal vez lo antes mencionado haya sucedido en la presente investigación, al no haberse presentado diferencia ($P < 0.05$) entre las muestras con y sin aplicación de ultrasonido. Similar a lo encontrado en el presente estudio Martini y Walsh (2012) tampoco encontraron influencia en la evaluación sensorial de lactosuero con ultrasonido (20 kHz y 15 W) por 15 min contra lactosuero sin tratamiento.

En cuanto a la influencia de la proporción de lactosuero en una bebida probiótica, Castro *et al.* (2013b) encontraron que la cantidad de lactosuero tuvo influencia significativa ($P < 0.05$) en la aceptación sensorial. Evaluaron la adición de 0, 20, 35, 50 o 80% v/v de lactosuero y completaron el volumen con leche. Ellos encontraron que el 35% v/v de lactosuero fue el más aceptado. A diferencia de la presente investigación, estos autores, encontraron buena aceptación sensorial con un promedio de 7.0 en una escala hedónica de 9 puntos. Pero cabe mencionar que no fue una bebida fermentada, además de que la cantidad de azúcar, adición de pulpa de fresa y colorante pudieron haber influido de forma positiva en la aceptación de ese producto. Por otra parte, y en concordancia con

la proporción 50% lactosuero y 50% avena que fue la más aceptada, Wan y Xu (2018) realizaron un estudio preliminar para la formulación de una bebida de β -glucano de avena y asilado de proteína de lactosuero. Reportaron que la combinación más aceptada fue la proporción 1:1, no mostraron la evaluación, solo el resultado.

Finalmente, de forma global las bebidas del presente estudio no fueron muy bien aceptadas. Alrededor del 67% de las frecuencias de aceptación estuvieron dentro de las categorías “no me gusta” y “me disgusta ligeramente”. Rothman (2007) sugiere que cuando el porcentaje de disgusto para un atributo es mayor al 40%, se deben hacer cambios en la formulación para mejorar la aceptación sensorial. Entre los comentarios que emitieron los panelistas se encuentran que tenían un sabor muy ácido, desagradable y fuerte. Estos comentarios concuerdan con la evaluación sensorial realizada por Sharma *et al.* (2017), donde los panelistas expresaron que las bebidas presentaban acidez y sabor picante. Estos autores formularon una bebida probiótica con *Lactobacillus acidophilus* NCDC 291, *Lactobacillus bulgaricus* NCDC 304, concentrado de proteína de lactosuero, avena y glucosa. Pero después de analizar la aceptación sensorial, decidieron adicionar el lactosuero fermentado con pulpa de mango en diferentes proporciones 1:1, 2:1 o 3:1, respectivamente. El resultado del análisis sensorial reveló que, a mayor cantidad de bebida fermentada, menor aceptabilidad. Por lo que eligieron una proporción 1:1 y esta no afectó la viabilidad de los probióticos. Bobková *et al.* (2016) observaron que el saborizante de fresa fue el más apropiado para tal efecto y además recomiendan la adición de azúcar o edulcorante en una proporción del 5 al 11%. Buriti *et al.* (2014) encontraron que

en una bebida probiótica de lactosuero, la adición de 15% p/v de pulpa de guayaba y 1.5% p/v de galactomanano se consiguió mayor aceptación, con un valor de 8.50 en una escala hedónica de 9 puntos.

Por lo anteriormente expuesto, se podría mejorar la aceptación sensorial de las bebidas probióticas de lactosuero/avena, aumentando la cantidad de azúcar, incluyendo otros ingredientes como saborizantes, pulpas de frutas, edulcorantes, etc.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se concluye que la combinación lactosuero/avena con y sin ultrasonido es adecuada para la formulación de bebidas probióticas con *L. casei* ya que fue posible generar las condiciones adecuadas para obtener un crecimiento bacteriano deseable para bebidas probióticas, de 10^7 a 10^8 UFC/mL. La formulación probiótica con 50% v/v lactosuero, 50% v/v avena y pre-tratamiento de ultrasonido por 3 min mostró buenos resultados de crecimiento de *L. casei*, actividad antioxidante y aceptación sensorial. Se encontró que la interacción del tiempo de ultrasonido y la proporción lactosuero/avena favorecieron la actividad antioxidante siendo ésta mayor cuando la proporción de avena en la bebida fue 50% o más. Aunque en la aceptación sensorial de las bebidas, la proporción lactosuero/avena no afectó significativamente la aceptación y ésta no fue alta, se observó asociación entre las bebidas 50/50 con 3 min de ultrasonido y la categoría "gusta". Se recomienda mejorar sensorialmente las bebidas probióticas de lactosuero/avena con y sin ultrasonido considerando la caracterización fisicoquímica; y un análisis funcional y sensorial más amplio.

LITERATURA CITADA

- Ahmadi Z., S. M. A. Razavi y M. Varidi. 2017. Sequential ultrasound and transglutaminase treatments improve functional, rheological, and textural properties of whey protein concentrate. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 43: 207-215.
- Alrahmany, R., T. J. Avis y A. Tsopmo. 2013. Treatment of oat bran with carbohydrases increases soluble phenolic acid content influences antioxidant and antimicrobial activities. *Food Res. Int.* 52: 568-574.
- Alvarado Pérez, Y., C. Muro Urista, A. Maciel Cerda, J. Álvarez Sánchez y F. Riera Rodríguez. 2018. Antihypertensive and antioxidant properties from whey protein hydrolysates produced by encapsulated *Bacillus subtilis* cells. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 25: 681-689.
- Balthazar, C. F., A. Santillo, J. T. Guimarães, V. Bevilacqua, M. R. Corbo, M. Caroprese, R. Marino, E. A. Esmerino, M. C. Silva, R. S. L. Raices, M. Q. Freitas, A. G. Cruz y M. Albenzio, 2019. Ultrasound processing of fresh and frozen semi-skimmed sheep milk and its effects on microbiological and physical-chemical quality. *Ultrason. Sonochem.* 51: 241-248.
- Barukčić, I., K. L. Jakopović, Z. Herceg, S. Karlović y R. Božanić. 2015. Influence of high intensity ultrasound on microbial reduction, physico-chemical characteristics and fermentation of sweet whey. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 27: 94-101.
- Bhat, Z. F., S. Kumar y H. F. Bhat. 2015. Bioactive peptides of animal origin: a review. *J. Food Sci. Technol.* 52: 5377-5392.
- Bobková, A., M. Fikselová, T. Tóth y M. Bobko. 2016. Flavored whey beverages: preparation and evaluation of selected parameters. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies.* 2: 195-199.
- Borchers, A., C. Selmi, F. Meyers, C. Keen y E. Gershwin. 2009. Review: Probiotics and immunity. *J. Gastroenterol.* 44: 26-46.
- Brandelli, A., D. Joner Daroit y A. P. Folmer Correa. 2015. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Res. Int.* 73: 149-161.
- Bulatović, M. L., M. B. Rakin, L. V. Mojović, S. B. Nikolić, M. S. Vukašinović Sekulić y A. P. Đukić Vuković. 2012. Selection of *Lactobacillus* strains for functional whey-based beverage production. *J. Food Eng.* 2: 705-711.
- Buriti, F. C. A., S. C. Freitas, A. S. Egito y K. M. O. dos Santos. 2014. Effects of tropical fruit pulps and partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds on the dietary fibre content, probiotic

viability, texture and sensory features of goat dairy beverages. *LWT - Food Sci. Technol.* 59: 196-203.

- Castro, W. F., A. G. Cruz, M. S. Bisinotto, L. M. Guerreiro, J. A. F. Faria, H. M. A. Bolini, R. L. Cunha y R. Deliza. 2013a. Development of probiotic dairy beverages: Rheological properties and application of mathematical models in sensory evaluation. *J. Dairy Sci.* 96: 16-25.
- Castro, W. F., A. G. Cruz, D. Rodrigues, G. Ghiselli, C. A. F. Oliveira, J. A. F. Faria y H. T. Godoy. 2013b. Short communication: Effects of different whey concentrations on physicochemical characteristics and viable counts of starter bacteria in dairy beverage supplemented with probiotics. *J. Dairy Sci.* 96: 96-100.
- Chandrapala, J., B. Zisu, M. Palmer, S. Kentish y M. Ashokkumar. 2011. Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrason. Sonochem.* 18: 951-957.
- Charalampopoulos, D., Rastall R. 2009. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Volume 1. Editorial Springer. E.U.A.
- Chen, C., Wang, L., Chen, Z., Luo, X., Li, Y., Wang, R., Li, J., Li, Y., Wang, T., Wu, J. 2019. Effects of milk proteins on the bioaccessibility and antioxidant activity of oat phenolics during *in vitro* digestion. *J. Food Sci* 84(4):895–903.
- Chen, G., Y. Liu, J. Zeng, X. Tian, Q. Bei y Z. Wu. 2020. Enhancing three phenolic fractions of oats (*Avena sativa* L.) and their antioxidant activities by solid-state fermentation with *Monascus anka* and *Bacillus subtilis*. *J. Cereal Sci.* 93: 102940.
- Cheung, I. W. Y., S. Nakayama, M. N. K. Hsu, A. G. P. Samaranayaka y E. C. Y. Li-Chan. 2009. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates from oat (*Avena sativa*) proteins by *in silico* and *in vitro* analyses. *J. Agric. Food Chem.* 57: 9234-9242.
- Choi, S., S. Kwok y C. Ma. 2009. Conformational study of SPI treated with ultrasound. The 2009 Annual Meeting of the Institute of Food Technologists and Food Expo. Jun 6-9, Anaheim, CA. Consultado en: <https://repository.vtc.edu.hk/thei-fac-sci-tech-sp/256>
- Chouliara, E., K. G. Georgogianni, N. Kanellopoulou y M. G. Kontominas. 2010. Effect of ultrasonication on microbiological, chemical and sensory properties of raw, thermized and pasteurized milk. *Int. Dairy J.* 20: 307-313.

- Coman, M. M., M. C. Verdenelli, C. Cecchini, S. Silvi, A. Vasile, G. E. Bahrim, C. Orpianesi y A. Cresci. 2013. Effect of buckwheat flour and oat bran on growth and cell viability of the probiotic strains *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501[®], *Lactobacillus paracasei* IMC 502[®] and their combination SYN BIO[®], in synbiotic fermented milk. *Int. J. Food Microb.* 167:261-268.
- Fagerlund, A., K. Sunnerheim, L. H. Dimberg. 2009. Radical-scavenging and antioxidant activity of avenanthramides. *Food Chem.* 113: 550-556.
- Gallardo-Escamilla, F. J., A. L. Kelly y C. M. Delahunty. 2007. Mouthfeel and flavor of fermented whey with added hydrocolloids. *Int. Dairy J.* 17: 308-315.
- Gholamhosseinpour, A. y S. M. B. Hashemi. 2018. Ultrasound pretreatment of fermented milk containing probiotic *Lactobacillus plantarum* AF1: Carbohydrate metabolism and antioxidant activity. *J. Food Process. Eng.* 42: e12930.
- Granato, D., F. J. Barba, D. B. Kovačević., J. M. Lorenzo, A. G. Cruz y P. Putnik. 2020. Functional Foods: Product development, technological trends, efficacy testing and safety. *Annu. Rev. Food Sci. T.* 11: 3.1-3.26.
- Güler-Akın, M.B., I. Ferliarslan y M. S. Akın. 2016. Apricot probiotic beverageing yoghurt supplied with inulin and oat fiber. *Adv. Microbiol.* 6: 999-1009.
- Herrera P., A. L. 2013. Evaluación de la avena germinada y avena malteada como sustrato para bacterias probióticas en una bebida. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih. México.
- Huang, G., S. Chen, C. Dai, L. Sun, W. Sun, Y. Tang, F. Xiong, R. He y H. Ma. 2017. Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. *Ultrason. Sonochem.* 37: 144-149.
- Jambrak, A. R., T. M. Mason, V. Lelas, L. Paniwnyk y Z. Herceg. 2014. Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. *J. Food Eng.* 121: 15-23.
- Jeličić, I., R. Božanić, M. Brnčić y B. Tripalo. 2012. Influence and comparison of thermal, ultrasonic and thermosonic treatments on microbiological quality and sensory properties of rennet cheese whey. *Mljekarstvo.* 62: 165-178.
- Jiang, Z., K. Yao, X. Yuan, Z. Mu, Z. Gao, J. Hou y L. Jiang. 2018. Effects of ultrasound treatment on physico-chemical, functional properties and antioxidant activity of whey protein isolate in the presence of calcium lactate. *J. Sci. Food Agric.* 98: 1522-1529.

- Körzendörfer, A., P. Temme, E. Schlücker, J. Hinrichs y S. Nöbel, 2018. Vibration-induced particle formation during yogurt fermentation—Effect of frequency and amplitude. *J. Dairy Sci.* 101: 3866–3877.
- Kumar, M. D., A. K. Beena y M. D. Baig. 2017. Optimization of *Lactobacillus casei* and inulin levels in the preparation of symbiotic whey beverage using response surface methodology. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 6: 558-568.
- Lawless, T.H. y H. Heymann. 2010. *Sensory evaluation of food: Principles and Practice*. Springer; New York, NY, USA.
- Liu, L., Li, X., Du, L., Zhang, X., Yang, W. y Zhang, H. 2019. Effect of ultrasound assisted heating on structure and antioxidant activity of whey protein peptide grafted with galactose. *LWT.* 109: 130-136.
- Ma, S., X. Yang, C. Wang y G. Mingruo. 2018. Effect of ultrasound treatment on antioxidant activity and structure of β -Lactoglobulin using the Box–Behnken design. *CyTA – J. Food.* 16: 596-606
- Marchesini G., L. Fasolato, E. Novelli, S. Balzan, B. Contiero, F. Montemurro y S. Segato. 2015. Ultrasonic inactivation of microorganisms. A compromise between lethal capacity and sensory quality of milk. *Innov. Food Sci. Emerg.* 29: 215-221.
- Martínez-Villaluenga, C. y E. Peñas. 2017. Health benefits of oat: current evidence and molecular mechanisms. *Curr. Opin. Food Sci.* 14: 26-31.
- Nakurte, I., I. Kirhnere, J. Namniece, K. Saleniece, L. Krigere, P. Mekss, Z. Vicupe, M. Bleidere, L. Legzdina y R. Muceniece. 2013. Detection of the lunasin peptide in oats (*Avena sativa* L). *J. Cereal Sci.* 57: 319-324.
- Nguyen, T. M. P., Y. K. Lee y W. Zhou. 2009. Stimulating fermentative activities of bifidobacteria in milk by high intensity ultrasound. *Int. Dairy J.* 19: 410-416.
- Nursiwi, A., E. Nurhartadi, R. Utami, A. M. Sari, P. W. Laksono y E. N. Aprilia. 2017. Characteristic of fermented whey beverage with addition of tomato juice (*Lycopersicum esculentum*). *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 193, 012009.
- Ozuna, C., I. Paniagua Martínez, E. Castaño Tostado, L. Ozimek y S. Amaya Llano. 2015. Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides. *Food Res. Int.* 77: 685-696.

- Pawar, S. V. y V. K. Rathod. 2020. Role of ultrasound in assisted fermentation technologies for process enhancements. *Prep. Biochem. Biotech.* 1–8. doi:10.1080/10826068.2020.1725773.
- Potoroko, I., I. Kalinina, V. Botvinnikova, o. Krasulya, R. Fatkullin y U. Bagale. 2018. Ultrasound effects based on simulation of milk processing properties. *Ultrason. Sonochem.* 48: 463-472.
- Prazeres, A. R., F. Carvalho y J. Rivas. 2012. Cheese whey management: A review. *J. Environ. Manage.* 110: 48-68.
- Rasheed, H. A., T. Tuoheti, Y. Zhang, F. Azi, M. Tekliye y M. Dong. 2020. Purification and partial characterization of a novel bacteriocin produced by bacteriocinogenic *Lactobacillus fermentum* BZ532 isolated from Chinese fermented cereal beverage (Bozai). *LWT - Food Sci. Technol.* 124: 109113.
- Riener, J., F. Noci, D. A. Cronin, D. J. Morgan y J. G. Lyng. 2009. Characterisation of volatile compounds generated in milk by high intensity ultrasound. *Int. Dairy J.* 19: 269-272.
- Rothman, L. 2007. The use of just-about-right (JAR) scales in food product development and reformulation. En: L. Rothman. *Consumer-led food product development.* Woodhead Publishing, Sawston, Reino Unido.
- Saha, P., P. R. Ray y T. Hazra. 2017. Evaluation of quality and stability of chhana whey beverage fermented with lactic acid bacteria. *Asian J. Dairy Food Res.* 36: 112-116.
- SAS, Institute. 2006. *SAS/STAT User's Guide.* SAS Inst. Inc., Cary, Carolina del Norte, E. U. A.
- Sawas, T., S. Al Halabi, R. Hernaez, W. D. Carey y W. K. Cho. 2015. Patients receiving prebiotics and probiotics before liver transplantation develop fewer infections than controls: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 13: 1567-1574.
- Seo, Y. H., G. W. Park y J. Han. 2015. Efficient lactulose production from cheese whey using sodium carbonate. *Food Chem.* 173: 1167-1171.
- Sfakianakis, P. y C. Tzia. 2017. Flavour profiling by gas chromatography–mass spectrometry and sensory analysis of yoghurt derived from ultrasonicated and homogenised milk. *Int. Dairy J.* 75: 120-128.
- Sharma, P., N. Trivedi e Y. Gat. 2017. Development of functional fermented whey–oat-based product using probiotic bacteria. *Biotech.* 7: 272.

- Shershenkov, B. y E. Suchkova. 2015. Upgrading the technology of functional dairy products by means of fermentation process ultrasonic intensification. *Agron. Res.* 13: 1074-1085.
- Smithers, G. W. 2008. Whey and whey proteins—from 'gutter-to-gold'. *Int. Dairy J.* 18: 695-704.
- Smithers, G. W. 2015. Whey-ing up the options – Yesterday, today and tomorrow. *Int. Dairy J.* 48: 2-14.
- Socol, C., L. Porto de Souza, M. Rigon, A. Pedroni, C. Tiemi, J. De Dea, A. Pandey y V. Thomaz. 2010. The potential of probiotics: A review. *Food Technol. Biotechnol.* 48: 413-434.
- Thaipong, K., U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros-Zevallos y D. H. Byrn. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* 19: 669–675.
- Uluko, H., S. Zhang, L. Liu. M. Tsakama, J. Lu y J. Lu. 2015. Effects of thermal, microwave, and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates. *J. Funct. Foods.* 18: 1138-1146.
- Vercet, A., R. Oria, P. Marquina, S. Crelier y P. López-Buesa. 2002. Rheological properties of yoghurt made with milk submitted to manothermosonication. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6165-6171.
- Villegas de Gante, A. 2012. *Tecnología Quesera*. A. Editorial Trillas. 2a edición. México.
- Wan, W. y B. Xu. 2018. Development of an orange juice beverage formulated with oat beta-glucan and whey protein isolate. *J. Sci. Food Agric.* 98: 4685-4691.
- Yamahata, N., Y. Toyotake, S. Kunieda y S. Wakayama. 2020. Optimal fermentation conditions and storage period of fermented beverages made from demineralized whey using *Kluyveromyces marxians*. *J. Food Sci. Nutr. Res.* 3: 001-017.
- Yeo, S. K. y M. T. Liang. 2011. Effect of ultrasound on the growth of probiotics and bioconversion of isoflavones in prebiotic-supplemented soymilk. *J. Agric. Food Chem.* 59: 885-897.
- Zhao, C-C., P-H. Kim y J-B. Eun. 2019. Influence of high-intensity ultrasound application on the physicochemical properties, isoflavone composition, and antioxidant activity of tofu whey. *LWT.* 117: 108618.

**ESTUDIO 2. ULTRASONIDO DE ALTA INTENSIDAD VS. PASTEURIZACIÓN
EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y FUNCIONALES DE
LACTOSUERO Y DE BEBIDAS DE LACTOSUERO-AVENA**

RESUMEN

ULTRASONIDO DE ALTA INTENSIDAD VS. PASTEURIZACIÓN EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y FUNCIONALES DE LACTOSUERO Y DE BEBIDAS DE LACTOSUERO-AVENA

POR:

M. C. ANA LUISA HERRERA PONCE

Doctorado in Philosophia en Producción Animal

Universidad Autónoma de Chihuahua

Facultad de Zootecnia y Ecología

Secretaría de Investigación y Posgrado

Presidente: Ph. D. Alma Delia Alarcón Rojo

La finalidad de esta investigación fue evaluar la influencia del ultrasonido y compararlo con la pasteurización sobre propiedades microbiológicas y antioxidantes del lactosuero y sobre propiedades antioxidantes y físicoquímicas de bebidas de lactosuero-avena. En la primera etapa se aplicaron seis tratamientos en lactosuero: ultrasonido (40 kHz y 11 W/cm²) a 25 o 55 °C por 3 o 10 min (U25/3, U25/10, U55/3, U55/10, respectivamente); pasteurización a 65 °C por 30 min (P65/30) y a 72 °C por 15 s (P72/15). En la segunda etapa, se formularon bebidas de lactosuero-avena y se aplicaron tres tratamientos: ultrasonido (24 kHz a 20°C) por 15 min a 23 W y a 154 W; y pasteurización a 65°C por 30 min. Todas las muestras de lactosuero fueron inocuas (cero UFC/mL). La mayor (P<0.05) actividad antioxidante en lactosuero se generó con 3 min de ultrasonido (40 kHz y 11W/cm²) a 25 y 55 °C con valores de 1.70 y 1.87 mM equivalente Trolox/mL, respectivamente. No se encontró efecto (P >0.05) de

la intensidad del ultrasonido (23 W y 54 W) sobre las características fisicoquímicas, la composición proximal y la actividad antioxidante de las bebidas de lactosuero-avena. Sin embargo, se observó diferencia entre las bebidas sonicadas y la bebida pasteurizada. Las bebidas ultrasonicadas presentaron mayor tendencia al color verde y al amarillo, mayor contenido de grasa y actividad antioxidante, y menor de ceniza y carbohidratos que la bebida pasteurizada. Se concluye que el ultrasonido es superior a la pasteurización en la mejora de la actividad antioxidante del lactosuero y de las bebidas de lactosuero-avena sin efectos determinantes en la calidad fisicoquímica y proximal.

ABSTRACT

**HIGH INTENSITY ULTRASOUND VS. PASTEURIZATION ON
PHYSICOCHEMICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF WHEY-OAT
BEVERAGES**

BY:

ANA LUISA HERRERA PONCE

The aim of this research was to evaluate the influence of ultrasound and compare it with pasteurization on the microbiological and antioxidant properties of whey and on the antioxidant and physicochemical properties of whey-oat beverage. In the first stage six treatments were applied to whey: ultrasound (40kHz, 11 W/cm²) at 25 or 55 °C for 3 or 10 min (U25/3, U25/10, U55/3, U55/10, respectively) or pasteurization at 65 °C for 30 min (P65/30) or 72 °C for 15 s (P72/15). In the second stage, whey-oat beverages were formulated and three treatments were applied: ultrasound (24 kHz at 20 °C for 15 min) at 23 W and at 154 W and pasteurization at 65°C por 30 min. All the whey samples were innocuous (zero UFC/mL). The highest (P<0.05) antioxidant activity in whey was generated with 3 min of ultrasound (40 kHz, 11W/cm²) at 25 and 55 °C with values of 1.70 and 1.87 mM equivalent Trolox/mL, respectively. No effect (P >0.05) of ultrasound intensity (23 W and 54 W) was found on the physicochemical characteristics and the proximal composition of the whey-oat beverages. However, a difference was observed between the sonicated beverages and the pasteurized or control beverage. The ultrasound beverages had a greater tendency to green and yellow color, higher fat content, and less ash and carbohydrates than the pasteurized beverage. It is concluded that ultrasound is

superior to pasteurization in improving the antioxidant activity of whey and of whey-oat beverages without detrimental effects on the proximal composition physicochemical quality.

INTRODUCCIÓN

La demanda de alimentos mínimamente procesados ha aumentado en los últimos años. Por lo que tanto la comunidad científica como la industrial están en constante búsqueda y evaluación de tecnologías de conservación que mantengan o mejoren las características nutricionales, funcionales y sensoriales de los alimentos (Krešić *et al.*, 2008). Entre las nuevas tecnologías, también llamadas tecnologías emergentes, que se han desarrollado y que tienen potencial para usarse en la industria de los alimentos se encuentra el ultrasonido. La tecnología del ultrasonido es económica y amigable con el medio ambiente que se ha aplicado con excelentes resultados a una variedad de alimentos como jugos de frutas, carne, cereales y lácteos entre otros (Peña-González *et al.*, 2017; Cui *et al.*, 2019; Ragab *et al.*, 2020; Zaho *et al.*, 2020). Se ha reportado que con la aplicación de ultrasonido se obtiene la misma inocuidad que con tratamientos térmicos como la pasteurización, pero sin pérdida o deterioro de propiedades de calidad fisicoquímica y nutricional (Erkaya *et al.*, 2015).

El uso de ultrasonido en lactosuero se ha estudiado ampliamente para mejorar su inocuidad y las propiedades funcionales y nutricionales (Jeličić *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2018; Hemar *et al.*, 2019). Se ha reportado que el ultrasonido en leche, provoca la disminución del tamaño de los glóbulos de grasa con lo cual se mejora la homogeneización y la estabilidad de la leche durante el almacenamiento y hasta el consumo de bebidas lácteas (Komes *et al.*, 2017). Esta reducción de tamaño es totalmente dependiente de la potencia y la temperatura de ultrasonido (Gregersen *et al.*, 2019). Además, se ha demostrado que la energía (W/l) de ultrasonido aplicada al medio (lactosuero) tiene mayor

efecto sobre los cambios estructurales en las proteínas que los efectos de la temperatura o el tiempo de exposición (Abadía-García *et al.*, 2016).

La mejora de las propiedades funcionales, es debida a la liberación de péptidos bioactivos o biopéptidos (Madureira *et al.*, 2010) y para tal efecto, se ha comprobado que el ultrasonido es rápido y eficiente (Uluko *et al.*, 2013). Los biopéptidos del lactosuero tienen propiedades antihipertensivas, hipocolesterolémicas, antioxidantes, entre otras (Madadlou y Abbaspourrad, 2018). Estos compuestos con actividad antioxidante (Alrahmany *et al.*, 2013; Nakurte *et al.*, 2013) y antihipertensiva (Cheung *et al.*, 2009) también se han encontrado en avena. Y en este sentido se han formulado bebidas de lactosuero con avena con propiedades funcionales (Amiruddin *et al.*, 2020)

En base a lo anterior, el objetivo de este estudio fue comparar la pasteurización contra el ultrasonido en la calidad microbiológica y la capacidad antioxidante del lactosuero, así como en las propiedades antioxidantes y fisicoquímicas de bebidas de lactosuero-avena.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se dividió en dos etapas. En la primera se preparó y se analizó el lactosuero como materia prima para la preparación de bebidas de lactosuero-avena. Las determinaciones realizadas en el lactosuero fueron análisis microbiológicos y actividad antioxidante. En la segunda etapa se prepararon y analizaron bebidas de lactosuero-avena. En estas bebidas se realizó análisis proximal, fisicoquímico, sensorial y la capacidad antioxidante.

Primera Etapa. Obtención y Análisis del Lactosuero

Obtención del lactosuero. Para obtener lactosuero se siguió la metodología para la elaboración de queso fresco de Villegas de Gante (2012). Se partió de leche fresca fluida de vacas sanas raza Holstein del establo de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. La leche se filtró con tela tipo manta para eliminar materia extraña. Se pasteurizó a 65 °C por 30 min, se enfrió a 42 °C y se agregó CaCl_2 (20 g/100 L), se homogeneizó mezclando la leche con movimientos en forma de ocho con un cucharón. Se enfrió a 34 °C para agregar la renina (Cuamix® CHR Hansen) en una concentración de 15 mL/100 L. Se dejó reposar 90 min, manteniendo la temperatura en 32 °C. Una vez formada la cuajada, se cortó suavemente en cuadros de 1 cm por 1 cm, para mejorar la sinéresis de la red proteica del cuajo y posterior liberación del lactosuero. Se dejó reposar 15 min y se redujo el tamaño de los coágulos de leche muy suavemente con una cuchara grande. Se calentó lentamente (elevando 1 °C cada 5 min) hasta 39 °C y se dejó reposar nuevamente durante 15 min. Se desueró con la ayuda de tela de algodón. El lactosuero obtenido se colocó en frascos de vidrio estériles con rosca, se enfrió en un baño

de agua con hielo. Inmediatamente se aplicaron los tratamientos de ultrasonido o pasteurización, según correspondiera. Se realizaron los análisis microbiológicos y se obtuvo el extracto soluble. Esto último, mediante la doble centrifugación (Beckman Coulter. Modelo Avanti J-26 XP1. Serie JXT12H22. Indianápolis, E. U. A.) a 4,000 x g (5,75 rpm) por 30 min y 4 °C. El extracto se filtró con membranas de 2.5 µm (Whatman #42) mediante el uso de matraz, embudo de filtración y bomba de vacío. Posteriormente, el filtrado obtenido se pasó por una membrana (filtros de 0.2 µ) y, el producto resultante se colocó en tubos de plástico de 1 mL con tapa y fondo cónico para ser almacenados a -20 °C hasta los análisis.

Tratamientos. Se diseñaron seis tratamientos para comparar el efecto del ultrasonido contra la pasteurización, sobre las propiedades microbiológicas y capacidad antioxidante del lactosuero. Los tratamientos de ultrasonido fueron cuatro, integrados por la combinación de dos temperaturas: 25 o 55 °C y dos tiempos de ultrasonido: 3 o 10 min. Los tratamientos fueron codificados de la siguiente manera: 25/3US, 25/10US, 55/3US y 55/10US, haciendo referencia a la temperatura y tiempos de ultrasonido, respectivamente. Para la pasteurización se usaron dos tipos de esta tecnología: baja y alta. La primera se codificó con PB y correspondió a 65 °C durante 30 min, y la segunda como PA referente a 75 °C durante 15 s (Cuadro 11).

La sonicación de las muestras contenidas en frascos de vidrio de 1 L (Pyrex®) se realizó en un baño ultrasónico (Branson® 1510R-MTH, Branson Ultrasonic Corporation. Danbury, CT, E.U.A.) con una capacidad de 2.25 L (15 x 15 x10 cm).

Cuadro 11. Tratamientos empleados para determinar el efecto del ultrasonido y la pasteurización en la calidad microbiológica y actividad antioxidante de lactosuero bovino

Código	Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo de ultrasonido (min)
25/3US	Ultrasonido ¹	25	3
25/10US	Ultrasonido ¹	25	10
55/3US	Ultrasonido ¹	55	3
55/10US	Ultrasonido ¹	55	10
PB	Pasteurización	65	30
PA	Pasteurización	72	15 s

¹25/3US = 25°C y 3 min de US; 25/10US = 25°C y 10 min de US; 55/3US = 55°C y 3 min de US; 55/10US = 55°C y 10 min de US; PB = Pasteurización baja 65°C por 30 min; PA = Pasteurización alta a 75 °C por 15 s.

US = Ultrasonido 40 kHz y 11 W/cm²

Se usaron 1000 mL de agua destilada como medio de difusión durante la sonicación. El tratamiento ultrasónico se llevó a cabo a una frecuencia de 40 kHz y una intensidad de 11 W/cm². Durante la aplicación de ultrasonido, se mantuvo la temperatura del agua a 4 °C mediante el uso de un termómetro digital y hielo de agua destilada. Cabe mencionar que se usó este equipo de ultrasonido por ser de alta intensidad y debido a su disponibilidad en la Facultad de Zootecnia y Ecología, en ese momento.

Los tratamientos de pasteurización se llevaron a cabo en una estufa de gas, colocando el lactosuero en una olla de acero inoxidable con tapa y monitoreando la temperatura con un termómetro digital. Las condiciones empleadas fueron 65 °C por 30 min y 75 °C por 15 s,

Análisis microbiológico. Con base a los requisitos para bebidas saborizadas no alcohólicas, establecidos por la Secretaría de Salud en México. Se realizó la determinación de hongos, levaduras (ISO 6611:2004) y coliformes totales (ISO 4832:2006) en lactosuero de leche no comercial. La muestra se agitó manualmente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7 seg, se tomó 1 mL de la muestra y se diluyó con 9 mL del diluyente (buffer de fosfatos, pH 7), evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente. Posteriormente, se transfirió 1 mL de la dilución primaria, en otro tubo estéril conteniendo nueve veces el volumen del diluyente estéril (9 mL), evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente. Esto mismo se realizó hasta tener 10 diluciones. Para hongos y levaduras, se colocó por duplicado en cajas Petri 1 mL de la muestra líquida directa o de la dilución (cada dilución por separado), se vertieron de 15 a 20 mL de agar papa dextrosa acidificado, fundido

y mantenido a 45 ± 1 °C en un baño de agua. Se mezcló cuidadosamente el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en el sentido contrario y seis de atrás para adelante. Para permitir que la mezcla se solidificara, se dejaron las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría. Adicionalmente, se preparó una caja control con 15 mL de medio, para verificar a esterilidad. Se invirtieron las cajas y se colocaron en la incubadora a 25 ± 1 °C. Se contaron las colonias de cada placa después de 3, 4 y 5 días de incubación. El mismo procedimiento se siguió para el conteo de coliformes totales, pero se usó agar rojo violeta bilis lactosa y el tiempo y temperatura de incubación fue de 35°C durante 24 ± 2 h.

Actividad antioxidante. Se partió del extracto soluble del lactosuero y de las bebidas lactosuero-avena. La determinación de la actividad antioxidante se realizó mediante la metodología del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), siguiendo lo reportado por Thaipong *et al.* (2006) con ligeras modificaciones. Se preparó una solución stock metanólica (J.T. Baker®) 0.6 mM de DPPH, se almacenó en un frasco ámbar y se congeló a -20 °C hasta su uso. Para preparar la solución de trabajo se tomaron 10 mL de la solución stock y se mezclaron con 45 mL de metanol para llegar a una absorbancia de 1.1 ± 0.02 . Para la determinación se colocaron 150 μL de muestra (o estándar: Trolox) y 2850 μL de la solución de trabajo DPPH en frascos ámbar y se dejaron reposar 24 h en la oscuridad a temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente, se colocó cada muestra en una celda de cuarzo y se leyó la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro UV (UV-1800. Shimadzu, Japón). La actividad antioxidante se reportó como mM equivalente Trolox/mL, empleando la absorbancia obtenida y

sustituyendo en la ecuación de la recta. Esta última se generó a partir de una curva de calibración con Trolox en la que se usó un rango de concentración de 0.01 a 1.0 mM Trolox/mL.

Segunda Etapa. Preparación y Evaluación de Bebidas de Lactosuero-Avena

Formulación. Para elaborar las bebidas de lactosuero-avena, se obtuvo lactosuero con la metodología para la elaboración de queso fresco de Villegas de Gante (2012). Se partió de leche comercial fluida entera pasteurizada (Lala®). Se calentó a 42 °C y se agregó CaCl₂ (20 g/100 L), se homogeneizó mezclando la leche con movimientos en forma de ocho con un cucharón. Se enfrió a 34 °C para agregar la renina (Cuamix® CHR Hansen) en una concentración de 15 mL/100 L. Se dejó reposar 90 min, manteniendo la temperatura en 32 °C. Una vez formada la cuajada, se cortó suavemente en cuadros de 1 cm por 1 cm, para mejorar la sinéresis de la red proteica del cuajo y posterior liberación del lactosuero. Se dejó reposar 15 min y se redujo el tamaño de los coágulos de leche muy suavemente con una cuchara grande. Se calentó lentamente (elevando 1 °C cada 5 min) hasta 39 °C y se dejó reposar nuevamente durante 15 min. Se desueró con la ayuda de tela de algodón. Del lactosuero obtenido, se tomaron 40 mL para obtener el extracto soluble mediante doble centrifugación (Beckman Coulter. Modelo Avanti J-26 XP1. Serie JXT12H22. Indianápolis, E. U. A.) a 4,000 x g (5,75 rpm) por 30 min y 4 °C. El extracto se filtró con membranas de 2.5 µm (Whatman #42) mediante el uso de matraz, embudo de filtración y bomba de vacío. Posteriormente, el filtrado obtenido se pasó por una membrana (filtros de 0.2 µ) y, el producto resultante se colocó en tubos de plástico de 1 mL con tapa y fondo cónico para ser almacenados a -20 °C hasta los análisis. Del lactosuero restante

se tomó el volumen necesario para mezclarse con la bebida de avena. La cual se obtuvo como lo reportó Herrera (2013). Se partió de granos de avena forrajera (*Avena sativa* var. Karma) adquiridos con un proveedor local (Semillas Purasangre, Cuauhtémoc, Chih.). La avena se enjuagó con agua corriente y se puso a remojar en recipientes de plástico con agua destilada durante 12 h cambiando el agua cada 4 h. Se drenó y los granos de avena se colocaron en un recipiente de plástico con una capa superior e inferior de algodón humedecido y se dejaron germinar a temperatura ambiente (~25 °C) durante 72 h o hasta la emergencia de 1 cm del coleóptilo (protuberancia que dará origen a una nueva planta). Se hizo una modificación a la metodología que consistió en proteger la avena de la luz durante el proceso de germinación y manteniendo humedecido el algodón, asperjando agua cada 24 h. La avena germinada se extendió en charolas de acero inoxidable y se colocó en un horno de convección mecánica (603 Napco Scientific Company, E.U.A.) a 45 °C por 20 h. Posteriormente la avena se transfirió a un horno convencional con corriente de aire (SLGS/12SC Southbend, E.U.A.) a 95 °C por 3 h para obtener avena malteada. Ésta se molió (Retsch. Modelo LC-170. Haan Alemania) y se usó una malla de 1 mm. En un matraz Erlen Meyer (250 mL) con rosca se preparó la bebida de avena malteada con 5% p/v (el volumen se completó con agua purificada, Epura ®) de harina y se colocó en un baño maría eléctrico (1203 VWR Scientific, E.U.A.) a 90 °C por 60 min y después en un baño de agua a 50 °C por 30 min. La bebida de avena se decantó, se refrigeró (4 °C) por 24 h y se volvió a decantar. Esta bebida de avena se mezcló con lactosuero en una proporción 1:1, se adicionó 5% de azúcar morena de caña (Zulka®), 1.5% de saborizante natural vainilla (Molina®) y 1 o 2%

p/v de inulina de agave. Se mezcló esta bebida con lactosuero en una proporción 1:1, se adicionó 1.5% de azúcar morena de caña (Zulka®) y 1.5% de saborizante natural vainilla (Molina®) (definido previamente en el análisis sensorial).

Análisis sensorial. Tomando en cuenta que, durante el desarrollo de cualquier alimento, la aceptación sensorial es un aspecto clave (Castro *et al.*, 2013b). Se realizó una prueba afectiva de aceptación sensorial como paso previo a la aplicación de tratamientos en bebidas de lactosuero-avena. Con el objetivo de definir si era necesaria una reformulación, además de definir el porcentaje de saborizante natural vainilla (Molina®). Se adicionó 1.0, 1.5 o 2.0% v/v de saborizante. El panel estuvo integrado por 59 panelistas no entrenados, estudiantes y empleados de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. De los cuales, 61% fueron hombres y 39% mujeres, con un rango de edad de 15 a 41 años (20 años en promedio). El reclutamiento fue vía invitación en áreas comunes y en salones de clase. Los criterios de selección de los panelistas se basaron en: 1) Ausencia de enfermedades respiratorias; 2) consumidor habitual de productos lácteos; y 3) interés por participar en la investigación. La evaluación se llevó a cabo en el laboratorio de Análisis Sensorial de dicha Facultad, equipado con 12 cabinas y se usó luz blanca fluorescente para la mejor observación de las bebidas. Las bebidas se elaboraron un día antes de la evaluación y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta la prueba. A cada panelista se le presentaron 30 mL de cada bebida, colocadas en diferente orden y codificadas con números aleatorios de tres dígitos. Los panelistas calificaron la aceptación del color, olor, sabor, viscosidad y general. A través de una escala hedónica de cinco puntos

donde la calificación 5 se refiere a “me gusta”, 4 a “me gusta ligeramente”, 3 a “ni me gusta ni me disgusta”, 2 a “me disgusta ligeramente” y 1 a “no me gusta” (Lawless y Heymann, 2010). El formato empleado se muestra en el Apéndice B. Entre muestras, los panelistas descansaron durante 1 min y se enjuagaron la boca con agua. Las muestras se presentaron en un diseño equilibrado (MacFie *et al.*, 1989).

Tratamientos. Para comparar el efecto de la aplicación del ultrasonido contra la pasteurización sobre las propiedades microbiológicas y capacidad antioxidante de las bebidas de lactosuero-avena se diseñaron tres tratamientos identificados como LSA/23, LSA/154, bebida de lactosuero-avena tratada con 23 o 154 W respectivamente, y LSA/P, bebida de lactosuero-avena con pasteurización a 65 °C y 30 min.

Aplicación de ultrasonido. Se aplicó ultrasonido de sonda (Ultrasonic Processor Hielscher UP400s) con un sonotrodo (Hielscher Sonotrode S24d22D) de titanio de 22 mm de diámetro, 430 mm² de área y 100 mm de longitud. A una frecuencia de 24 kHz, durante 15 min a 23 y 154 W. Los parámetros del equipo fueron 10% de pulso y 100% de amplitud. La punta de la sonda se sumergió a media profundidad, aproximadamente 3 cm hasta el fondo del vaso de precipitado de 1 L que contenía 500 mL de bebida. La temperatura de la bebida se mantuvo por debajo de la temperatura ambiental (25 °C).

Caracterización fisicoquímica. Las características fisicoquímicas evaluadas en las bebidas de lactosuero-avena fueron color, pH y acidez titulable.

El pH se midió con un medidor de pH (HANNA® Instruments). El pH se determinó como la media de las lecturas tomadas en tres repeticiones.

El color se midió usando un colorímetro Minolta Chroma Meter (CR-400 Konica Minolta Sensing, Inc., Tokyo, Japón) basado en el sistema CIEL (L^* , a^* y b^*). El equipo fue calibrado previamente contra una placa blanca ($Y= 94.00$, $x= 0.3155$, $y= 0.3318$). La medición se realizó por triplicado colocando directamente la apertura del medidor de forma vertical, en la superficie superior de las bebidas.

La acidez titulable se determinó siguiendo la técnica descrita en el AOAC (947.05, AOAC, 1990).

Análisis proximal. El análisis proximal de las bebidas de lactosuero-avena se realizó siguiendo los procedimientos del AOAC (1990) para la determinación de humedad (926.08, AOAC, 1990), ceniza (945.46, AOAC, 1990), proteína (991.20, AOAC, 1990), grasa (989.05, AOAC, 1990) y carbohidratos, este último determinado por diferencia.

Actividad antioxidante. Se determinó la actividad antioxidante del extracto soluble de las bebidas de lactosuero-avena y de los ingredientes mayoritarios que fueron el lactosuero y la avena. Se siguió la técnica del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS), según lo reportado por Thaipong *et al.* (2006). Se preparó una solución de ABTS 7.4 mM, disolviendo 0.038 g de sal amónica cristalizada de ABTS (Sigma Aldrich) y aforando con 10 mL de agua destilada. Posteriormente se prepararon 10 mL de una solución de persulfato de potasio 2.6 mM. Para generar el radical ABTS se mezclaron estas dos soluciones y el producto se dejó reposar en la oscuridad a temperatura ambiente (25 °C) durante 14 h (solución stock). De esta solución se tomó 1.8 mL para obtener absorbancia de 1.1 ± 0.02 , al adicionar metanol. En frascos de vidrio ámbar se colocaron 150 μ L de muestra o estándar Trolox y 2850 μ L de la solución

de trabajo ABTS, se dejaron reposar durante 2 h en la oscuridad a temperatura ambiente. La muestra se vertió en una celda de cuarzo de 4 mL y se leyó la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro UV (UV-1800. Shimadzu, Japón). La actividad antioxidante se reportó como mM equivalente Trolox/mL, empleando la absorbancia obtenida y sustituyendo en la ecuación de la recta. Esta última se generó a partir de una curva de calibración con Trolox en la que se usó un rango de concentración de 0.01 a 1.0 mM Trolox/mL. Se prepararon estándares de Trolox en un rango de concentración de 0.01 a 1.0 mM Trolox/mL y se siguió la misma metodología de actividad antioxidante.

Análisis Estadístico

Las variables de respuesta pH, acidez, color (L^* , a^* y b^*), análisis proximal, actividad antioxidante y análisis sensorial en lactosuero, avena o bebidas de lactosuero-avena de este estudio fueron evaluadas mediante un análisis de varianza de una vía, utilizando el procedimiento del modelo lineal generalizado del paquete SAS (SAS, 2006), con el siguiente modelo estadístico (Ecuación 3):

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \sum_{ij} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Dónde: y_{ij} = variable de respuesta medida en la repetición j del tratamiento i , μ = media general, τ_i = efecto del tratamiento i , y \sum_{ij} = error aleatorio de la repetición j del tratamiento i . Cuando el efecto de un factor fue significativo ($P < 0.05$) se realizó la comparación múltiple de medias de Tukey.

Es importante mencionar que los resultados del análisis sensorial al ser valores categóricos en escala ordinal (1 a 5), difícilmente alcanzan el supuesto de normalidad que exige el ANOVA. Por ello, y para mayor seguridad en los

resultados, los datos se analizaron adicionalmente mediante una técnica no paramétrica, la Prueba Exacta de Fisher, la cual tolera frecuencias absolutas menores a 5 en las celdas de la tabla de contingencia y no requiere ningún supuesto distribucional; para ello se utilizó el procedimiento FREQ (SAS, 2006) y posteriormente, cuando la asociación fue significativa ($P < 0.05$) o mostró alguna tendencia ($0.05 < P < 0.15$), se realizó un Análisis de Correspondencias. Con el objetivo de observar el grado de similitud entre tratamientos y el nivel de correspondencia de tratamientos con los niveles de respuesta de aceptación sensorial, usando para ello el procedimiento CORRESP de SAS (SAS, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primera Etapa. Evaluación del Lactosuero

Lactosuero. Se obtuvo un rendimiento del $88.5 \pm 1.65\%$ en la generación de lactosuero. En apariencia, el lactosuero presentó un color amarillos-verdoso, tal cual lo establece la literatura (Carvalho *et al.*, 2013; Baba *et al.*, 2016). Este color se ha atribuido a la riboflavina (vitamina B₂) presente en el lactosuero (Sheraz *et al.*, 2014). También, de acuerdo con la literatura, el lactosuero presentó un pH neutro (González Siso, 1996).

Análisis microbiológico. Los resultados del análisis microbiológico de leche y lactosuero (Cuadro 12) mostraron que la única muestra en la que se presentó crecimiento de coliformes totales fue en leche fluida sin pasteurizar, en la cual se encontraron 2.33 ± 0.82 UFC/mL. Esto pudo ser debido a que se usó leche que después de ser obtenida de la ordeña se almacenó por 2 h en refrigeración a 4 °C en un tanque cuya carga microbial no se determinó. En la Unión Europea el límite permitido de coliformes en leche fresca es <100 UFC/mL (Jay *et al.*, 2005). En Estados Unidos el límite de coliformes permitidos en leche pasteurizada grado 'A' es de 10 UFC/mL (FDA, 2015). Mientras que, en la República Mexicana, la Norma Oficial Mexicana 184 (NOM-184-SSA1-2002) establece que los coliformes totales en productos pasteurizados pueden contener un máximo de 10 UFC/mL estando el producto en la planta de proceso y un máximo de 20 UFC/mL cuando está en los puntos de venta. A pesar de que la leche del presente estudio no era pasteurizada, se encontraba dentro de los parámetros marcados para productos pasteurizados. Aunque se pasteurizó como parte del proceso de obtención de lactosuero.

Cuadro 12. Efecto del ultrasonido y la pasteurización en la calidad microbiológica de lactosuero bovino (media \pm E. E.)

Tratamiento ¹	Mohos (UFC/mL)	Levaduras (UFC/mL)	Coliformes totales (UFC/mL)
25/3US	0	0	0
25/10US	0	0	0
55/3US	0	0	0
55/10US	0	0	0
PB	0	0	0
PA	0	0	0
Leche sin pasteurizar	0	0	2.33 \pm 0.82

¹25/3US = 25°C y 3 min de US; 25/10US = 25°C y 10 min de US; 55/3US = 55°C y 3 min de US; 55/10US = 55°C y 10 min de US; PB = Pasteurización baja 65°C por 30 min; PA = Pasteurización alta 75 °C por 15 s.

US = Ultrasonido 40 kHz y 11 W/cm².

En el presente estudio no fue posible evaluar la eliminación o disminución de los mohos, levaduras por efecto del ultrasonido o pasteurización debido a que hubo ausencia total de dichos microorganismos. Sin embargo, ya se ha comprobado que el efecto bactericida del ultrasonido. Camerón *et al* (2009) analizaron la efectividad del ultrasonido mediante la inoculación de patógenos como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomona fluorescens* en leche. Estos autores aplicaron ultrasonido (20 kHz, 750 W y 100 % de amplitud=124 μ m) durante 2.5, 5, 6 o 10 min. Reportaron que el ultrasonido es efectivo en letalidad de patógenos al eliminar el 100% de *E. coli*, 100% de *L. monocytogenes* y 99% de *P. fluorescens*, al ser aplicado por 10, 6 y 10 min de aplicación, respectivamente. Erkaya *et al.*, 2015 observaron que debido a la termosonicación (35 kHz a 70°C por 3 min) en ayran, una bebida oriental formulada con leche acidificada, los niveles de hongos y levaduras fueron menores a 1 Log UFC/mL durante el almacenamiento (30 días a 4 °C) Además, los resultados fueron similares cuando aplicaron menor tiempo y temperatura (60 °C por 1 min). La bebida control tuvo conteos de hongos y levaduras de 3.30 y 5.09 UFC/ml al día 15 y 30 de almacenamiento, respectivamente.

Por su parte, Jeličić *et al.* (2012) observaron que la termosonicación (65.06 W/cm² a 55 °C por 8 min) de lactosuero fue más efectiva en reducir la carga microbiana (2.4 ciclos logarítmicos) de coliformes, mohos y levaduras, en comparación con la pasteurización (72 °C por 15 s o 65 °C por 30 min). Ellos concluyen que la letalidad de esta tecnología se debe mayormente a la temperatura que alcanzó la muestra (~ 70 °C). Barukčić *et al.* (2015) también usaron la combinación ultrasonido y temperatura (480 W a 55 °C por 10 min) en

lactosuero, encontraron que este tratamiento genera mejor calidad microbiológica y sensorial que la pasteurización (65 °C por 30 min) reduciendo la carga microbiana 2 ciclos logarítmicos. Estos autores atribuyeron tal efecto a una sinergia entre la cavitación del ultrasonido y la temperatura. De igual forma, Juraga *et al.* (2011) probaron diferentes temperaturas (20, 40 y 60 °C), amplitudes (120, 90 y 60 µm) y tiempos (6, 9 y 12 min) de ultrasonido (20 kHz) en leche y la mayor reducción fue con los niveles de ultrasonido a 60 °C, 120 µm por 12 min al reducir 4.02 UFC/ml enterobacterias, dejando un conteo final de 1.06 UFC/mL. Herceg *et al.* (2012) también observaron que la combinación de los factores: amplitud de las ondas de ultrasonido, tiempo y temperatura, son clave en la inactivación de bacterias. Al encontrar que las condiciones de ultrasonido (20 kHz) para la inactivación en leche de *S. aureus* fueron 59.99 °C, 12 min y 117.27 µm; y para *E. coli*. 59.99 °C, 12 min, 110.4 µm. Por lo observado, fueron más susceptibles las bacterias Gram negativas (*E. coli*) que las Gram positivas (*S. aureus*). En concordancia con estos autores, Gera y Doores (2011) observaron mediante microscopía electrónica que posterior a la aplicación de ultrasonido (24 kHz, 85 W/cm² y 100 µm) en leche con microorganismos patógenos las células de *E. coli* tuvieron más daño. La pared y la membrana celular presentaron invaginaciones, vesículas y rupturas por efecto del ultrasonido, además las células se rompieron y el contenido celular se dispersó. Mientras que en el caso de *Listeria monocytogenes* las células sólo se dividieron a la mitad, el contenido celular no se dispersó en el medio ni tuvieron invaginaciones o vesículas. Sin embargo, sí se observó daño celular. Mortazavi y Aliakbarlu (2019) también analizaron el efecto antimicrobiano del ultrasonido (24 kHz, 400 W y 124 µm

durante 15 min) en leche y encontraron que la población de *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes* se redujo 1.6 y 0.7 ciclos logarítmicos, respectivamente. Sin embargo, reportaron que la letalidad fue más efectiva al combinar ultrasonido con aceite esencial de canela, argumentando que esta tecnología puede dañar las células bacterianas y así aumentar la susceptibilidad a ese aceite esencial.

Se ha encontrado que el efecto antimicrobiano del ultrasonido se debe a que la implosión de burbujas de aire, provocada por la cavitación genera porosidad en las membranas celulares por esfuerzos de corte, calor o generación de radicales libres. Además de que durante la fase de crecimiento de las burbujas provocadas por el ultrasonido se genera estrés en la membrana celular bacteriana (Runyan *et al.*, 2006).

Actividad antioxidante. La aplicación de 3 min de ultrasonido en lactosuero tanto a 25 °C como a 55 °C fue significativamente mejor ($P < 0.05$). Con valores de 1.70 ± 0.010 y 1.87 ± 0.014 mM equivalente Trolox/mL, respectivamente, que cuando se aplicaron 10 min de ultrasonido o pasteurización. El tratamiento de 10 min de ultrasonido a 55 °C generó 1.14 ± 0.012 mM equivalente Trolox/mL y fue igual de efectivo que la pasteurización alta y baja con 1.22 ± 0.033 y 1.30 ± 0.097 mM equivalente Trolox/mL, respectivamente. Finalmente, la combinación de 10 min de ultrasonido a 25 °C tuvo el menor efecto al registrar 0.41 ± 0.052 mM equivalente Trolox/mL (Cuadro 13). Con los resultados anteriores se puede decir que, en las condiciones estudiadas, la aplicación de 3 min de ultrasonido fue mejor que 10 min, al generar mayor actividad antioxidante.

Cuadro 13. Efecto de la temperatura y tiempo de ultrasonido y la comparación con la pasteurización en la actividad antioxidante de lactosuero bovino (media \pm E. E.)

Tratamiento ¹	Actividad antioxidante (mM equivalente Trolox/mL) ²
25/3US	1.70 \pm 0.010 ^a
25/10US	0.41 \pm 0.052 ^c
55/3US	1.87 \pm 0.014 ^a
55/10US	1.14 \pm 0.012 ^b
PB	1.30 \pm 0.097 ^b
PA	1.22 \pm 0.033 ^b

¹25/3US = 25°C y 3 min de US; 25/10US = 25°C y 10 min de US; 55/3US = 55°C y 3 min de US; 55/10US = 55°C y 10 min de US; PB = Pasteurización baja 65°C por 30 min; PA = Pasteurización alta a 75 °C por 15 s.

²Medida con la técnica del radical DPPH

^{a, b, c} Medias con diferente literal indican diferencia significativa (P<0.05)

Con la aplicación de 3 min de ultrasonido, no hubo efecto de la temperatura (25 o 55 °C), mientras que a 10 min sí y fue mejor a 55 °C que a 25 °C. Esto puede deberse a que, a mayor tiempo de exposición de ultrasonido, los cambios estructurales causados en las proteínas no son los adecuados para la formación de péptidos antioxidantes (Chandrapala *et al.*, 2011; Uluko *et al.*, 2015). Se ha reportado que los péptidos de tamaño medio son los mayormente responsables de la captación de radicales (Elmalimadi *et al.*, 2017).

Estos péptidos se pudieron haber generado al aplicar 3 min de ultrasonido. Mientras que a 10 min de ultrasonido o con la pasteurización, la degradación de las proteínas pudo haber sido mayor o se re agregaron las proteínas. Como lo reportaron Chandrapala *et al.* (2011) al aplicar ultrasonido (20 kHz, 450 W y 50% de amplitud) en lactosuero reconstituido durante 10, 20, 30 o 60 min. Estos autores observaron que la entalpía de la solución aumentó y sugirieron que hubo una re-agregación de proteínas. Lo anterior debido a que la agregación de moléculas desnaturalizadas conlleva a la formación de nuevos enlaces intermoleculares por un aumento en la entalpía determinada en mediciones de calorimetría diferencial de barrido (Choi *et al.*, 2009). Shanmugam *et al.* (2012) también observaron agregación de proteínas al aplicar ultrasonido (20 kHz y 450 W) por 30 min, en leche descremada, homogenizada y pasteurizada.

Uluko *et al.* (2015) reportaron que los hidrolizados de concentrado de proteína de leche, sometida a ultrasonificación (20 kHz y 800 W) por 10 min previo a la hidrólisis, presentaron mayor actividad antioxidante ($EC_{50}=0.283$ mg/mL) que aquellos en los que no se aplicó algún tratamiento ($EC_{50}=0.316$ mg/mL). Estos investigadores encontraron que la cantidad de aminoácidos azufrados como

metionina y cisteína, tiene una influencia positiva en el efecto antioxidante. Estos aminoácidos pertenecen a la clasificación de hidrofóbicos y se ha publicado que este tipo de compuestos son algunos de los responsables de la capacidad antioxidante en lactosuero (Jobara *et al.*, 2014). También se ha reportado que la capacidad antioxidante del lactosuero proviene principalmente de las proteínas solubles α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y sus péptidos, y en menor medida de inmunoglobulinas, proteosa-peptonas y lactoferrina (Hernández-Ledesma *et al.*, 2005).

Segunda Etapa. Evaluación de Bebidas de Lactosuero-Avena

Análisis sensorial. Debido a los resultados sensoriales del estudio 1 se decidió iniciar el estudio 2 con una evaluación sensorial de las bebidas de lactosuero-avena. Lo anterior con el objetivo de evaluar la aceptación de la “nueva” bebida, que incluyó un saborizante de vainilla. Por lo que se pretendió conocer primeramente el porcentaje adecuado de este saborizante para una mejor aceptación de la bebida.

Los resultados mostraron que, en general, las bebidas de lactosuero-avena con vainilla tuvieron buena aceptación con valor medio de aceptación general de 3.50 ± 0.073 que está por arriba de la media de una escala hedónica de 5 puntos (Cuadro 14). Cabe mencionar que la aceptación sensorial se mide en escala de aceptación de un producto, pero los valores no tienen unidades. No se encontró diferencia en la aceptación sensorial de los atributos de color ($P=0.94$), sabor ($P=0.87$), viscosidad ($P=0.54$) y aceptación general ($P=0.78$) de las bebidas de lactosuero-avena con 1.0, 1.5 o 2.0% v/v de saborizante vainilla. Pero en el olor de las bebidas, sí ($P=0.002$).

Cuadro 14. Efecto de la adición de saborizante vainilla en la aceptación sensorial de una bebida funcional de lactosuero-avena (media \pm E.E.)

Vainilla ¹ (% v/v)	Color ²	Olor ²	Sabor ²	Viscosidad ²	Aceptación general ²
1.0	3.53 \pm 0.129 ^a	3.76 \pm 0.144 ^b	3.34 \pm 0.140 ^a	3.63 \pm 0.125 ^a	3.47 \pm 0.133 ^a
1.5	3.58 \pm 0.109 ^a	4.27 \pm 0.105 ^a	3.24 \pm 0.133 ^a	3.54 \pm 0.122 ^a	3.46 \pm 0.133 ^a
2.0	3.58 \pm 0.116 ^a	4.27 \pm 0.099 ^a	3.29 \pm 0.130 ^a	3.73 \pm 0.110 ^a	3.58 \pm 0.116 ^a

¹Saborizante natural líquido (Molina®)

² Escala hedónica: 5 = me gusta, 4 = me gusta ligeramente, 3 = ni me gusta ni me disgusta, 2 = me disgusta ligeramente, 1 = no me gusta

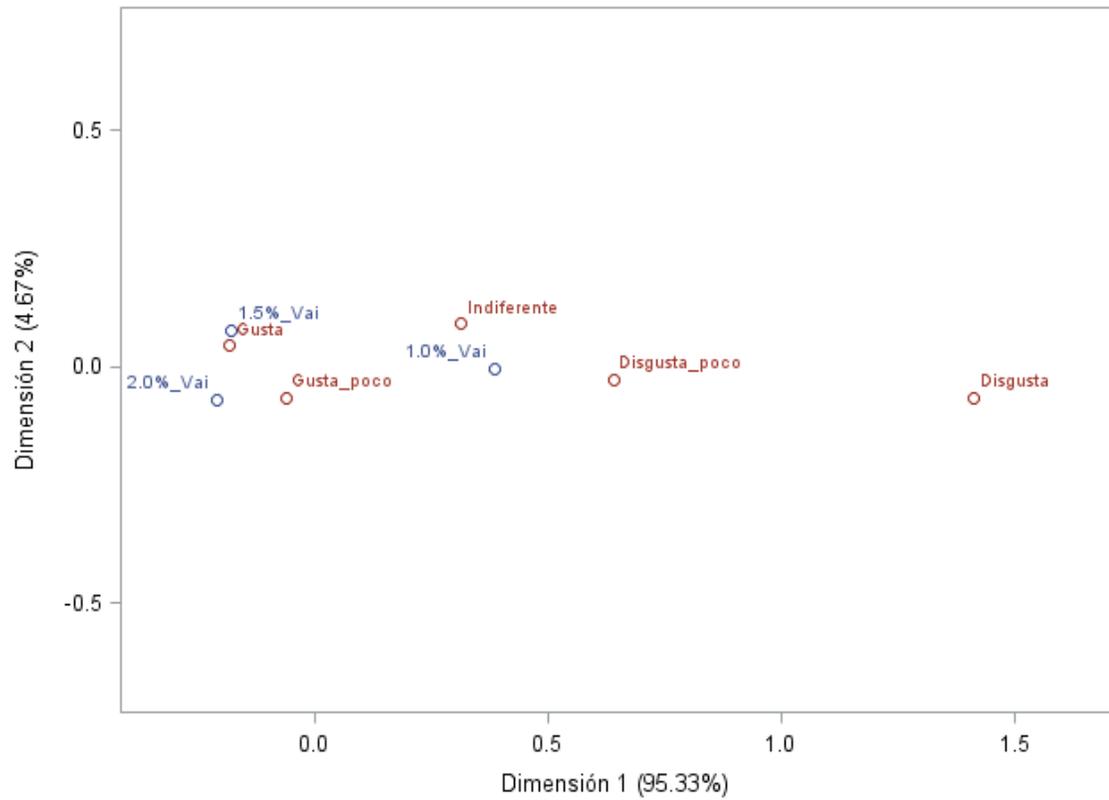
^{a, b} Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencia significativa (P<0.05).

Las bebidas con el olor más aceptado ($P < 0.05$) y sin diferencia entre ellas ($P > 0.05$), fueron las que contenían 1.5 o 2.0% v/v de vainilla, con valores de 4.27 ± 0.105 y 4.27 ± 0.099 , respectivamente. Mientras que la bebida con 1% v/v de vainilla fue estadísticamente menos aceptada ($P < 0.05$) con una puntuación de 3.76 ± 0.144 .

Los resultados de la prueba de no paramétrica, muestran que no existió asociación entre la aceptación del color ($P = 0.86$), sabor ($P = 0.94$), viscosidad ($P = 0.88$) ni aceptación general ($P = 0.98$) con la cantidad de vainilla. Se podría decir que el olor mostró una tendencia de asociación ($P = 0.07$). Al tener un valor $0.05 < P < 0.15$. Por lo que se sugiere que en futuros estudios se modifique el tamaño de muestra o se agreguen otros factores al modelo de estudio. De esta manera, el valor de los residuales puede cambiar y así obtener valores de $P \leq 0.05$.

Tomando en cuenta el rango de tendencia propuesto, los resultados (Gráfica 5) del análisis de correspondencia, muestran que la bebida más cercana a “me gusta” fue la de 1.5% v/v de vainilla, mientras que la de 2% v/v estuvo más alejada de este nivel de aceptación, pero fue igual de correspondiente a “me gusta” y “me gusta poco”. La formulación con 1% v/v de vainilla, se ubicó cercana a “indiferente”. En esta dirección, se ha reportado que los atributos sensoriales más relevantes en bebidas son sabor y olor (Režek Jambrak *et al.*, 2018).

En cuanto a los saborizantes, al igual que en la presente investigación, Cho *et al.* (2015) adicionaron saborizante de vainilla en bebidas fermentadas de lactosuero. A razón de que observaron baja aceptabilidad sensorial debida a la excesiva acidez y sabor desagradable.



Gráfica 5. Análisis de correspondencia de la aceptación del olor realizada por 59 panelistas y la cantidad de saborizante natural de vainilla (Vai) en bebidas funcionales de lactosuero-avena.

Aunque no mostraron los datos sobre la cantidad en la que fue añadida la vainilla, ni la evaluación donde fue elegido este saborizante ante el sabor plátano o fresa. Estos autores, no encontraron diferencia significativa ($P > 0.05$) entre la bebida formulada en la investigación y una bebida comercial de plátano. Montesdeoca *et al.* (2017) también usaron saborizante artificial de vainilla francesa para formular una bebida fermentada de lactosuero, leche, azúcar, yogurt natural, colorante y estabilizante. Obtuvieron buena aceptación sensorial con valores en una escala hedónica de 9 puntos (4.60 en textura, 5.00 aroma, 5.87 sabor, 4.77 color y 6.43 calidad general). Pero no especificaron el nivel de vainilla adicionado.

La adición de saborizantes en bebidas de lactosuero es debida a la composición del lactosuero, que le confiere un sabor salado o desagradable. Aunque una opción sería retirar las sales, pero esto implicaría el deterioro de propiedades funcionales (Bobková *et al.* 2016).

Además de vainilla, los saborizantes que se han usado en bebidas a base de lactosuero, son uva (Williams Mena, 2002), melón (Saxena *et al.*, 2013), limón (Singh *et al.*, 2014), fresa (Janiaski *et al.*, 2016), frutas tropicales, zanahoria (Liutkevičius *et al.*, 2016), menta (Sohrabi *et al.*, 2016), maracuyá (Gomes Rocha *et al.*, 2017) y naranja (Kumar *et al.*, 2017). Algunas de estas investigaciones se basaron en información ya reportada para la elección del tipo y concentración de saborizante, pero en otros casos, se definió dentro del estudio. Bobková *et al.* (2016) formularon una bebida probiótica de lactosuero, con el principal objetivo de elegir el mejor saborizante para enmascarar el sabor desagradable de la bebida. Probaron 2.5% v/v de arándano, 2.0 % de durazno y 2.0% v/v de fresa.

Observaron que la bebida control, es decir sin saborizante, tuvo la menor aceptación y la más aceptada fue la que tenía sabor fresa. Para evaluar el sabor, emplearon 5 panelistas entrenados y usaron una escala de 5 puntos. La bebida con saborizante fue evaluada como excelente (calificación 5) y la bebida sin saborizante fue evaluada como mala (calificación 1). No mostraron promedios ni desviación estándar. Amiruddin *et al.* (2020) mezclaron proteína de lactosuero con β -glucano de avena para elaborar una bebida. Los valores de la evaluación sensorial, medida en una escala hedónica de 9 puntos fueron de 7.4, 7 y 6.8 para el aroma, viscosidad y aceptación general, respectivamente.

Wan y Xu (2018) también emplearon β -glucano de avena y proteína de lactosuero en una bebida que además contenía agua, jugo de naranja y azúcar. Al comparar sensorialmente esta bebida con el jugo de naranja solo, encontraron una aceptación similar con valores de 4.5 aproximadamente, en una escala hedónica de 9 puntos. En los últimos dos estudios los autores representaron los resultados en gráficas de telaraña por lo que no fue posible conocer los valores precisos ni la desviación estándar de los mismos.

Caracterización fisicoquímica. No se encontró diferencia estadística ($P < 0.05$) al aplicar una potencia de 23 W o de 154 W de ultrasonido (24 kHz) por 15 min, en las características fisicoquímicas de bebidas de lactosuero-avena. Sin embargo, sí existió diferencia ($P < 0.05$) de estas bebidas con el control en la mayoría de los parámetros analizados. A excepción de la luminosidad (L^*), acidez titulable y pH (Cuadro 15). En el actual estudio, las bebidas ultrasonificadas tuvieron un color mayor tendencia al “verde” y “amarillo” que la bebida control.

Cuadro 15. Efecto del ultrasonido y la pasteurización en características fisicoquímicas de bebidas funcionales de lactosuero-avena (media \pm E.E.)

Característica ¹	Tratamiento ²		
	LSA/23	LSA/154	LSA/P
L*	24.80 \pm 0.186 ^a	24.66 \pm 0.161 ^a	25.00 \pm 0.335 ^a
a*	-0.34 \pm 0.048 ^a	-0.39 \pm 0.041 ^a	-0.42 \pm 0.069 ^b
b*	4.62 \pm 0.026 ^a	4.59 \pm 0.029 ^a	4.42 \pm 0.069 ^b
C*	4.64 \pm 0.027 ^a	4.61 \pm 0.032 ^{ab}	4.44 \pm 0.073 ^b
Acidez titulable (%)	0.01 \pm 0.000 ^a	0.01 \pm 0.000 ^a	0.01 \pm 0.000 ^a
pH	6.37 \pm 0.015 ^a	6.40 \pm 0.004 ^a	6.39 \pm 0.004 ^a

¹ L* o luminosidad, con valores de 0 a 100; a*, tendencia al color rojo (cuando los valores son positivos) o al verde (cuando los valores son negativos) y b*, tendencia al color amarillo (cuando los valores son positivos) o al azul (cuando los valores son negativos). La acidez es expresada como porcentaje de la concentración de ácido láctico

² LSA/23 = Ultrasonido de 24 kHz y 23 W por 15 min; LSA/154 = Ultrasonido de 24 kHz y 154 W por 15 min; LSA/P- = Pasteurización a 65 °C por 30 min.

^{a, b} Medias con diferente literal en la misma fila indican diferencia estadística (P<0.05).

Se ha dado a conocer que con la termosonicación se obtienen mejores características fisicoquímicas y de color en tiempos más cortos que con la pasteurización convencional (Bermúdez-Aguirre et al., 2009).

El color de los alimentos es uno de los primeros parámetros de calidad que el consumidor evalúa en los alimentos. Por lo tanto, es clave en la aceptación sensorial. Pero cabe mencionar que en este estudio el color de bebidas de lactosuero-avena con ultrasonido sólo se midió instrumentalmente y se desconoce cómo o cuánto pueda influir sensorialmente. Dentro del color, analíticamente los componentes cromáticos son: L^* o luminosidad, con valores de 0 a 100; a^* , tendencia al color rojo (cuando los valores son positivos) o al verde (cuando los valores son negativos) y b^* , tendencia al color amarillo (cuando los valores son positivos) o al azul (cuando los valores son negativos) y los valores pueden variar de -120 a 120 (León *et al.*, 2006).

Similar al presente estudio, Dias *et al.* (2015) encontraron que al aplicar ultrasonido (19 kHz y 75-373 W/cm²) por 2-10 min, los valores de a^* y b^* en jugo de guanábana disminuyeron.

Por otra parte, Guimarães *et al.* (2018), sí encontraron diferencia ($P < 0.05$) en todos los parámetros del color (L^* , a^* , b^* y C^*) de bebidas de lactosuero e inulina al aplicar pasteurización (75 °C por 15 s), o ultrasonido (19 kHz) por 3 min a 200, 400 o 600 W.

Las muestras con ultrasonido tuvieron un color más opaco (menor L^*), con mayor tendencia al verde (valores de a^* negativos), mayor tendencia al azul (valores de b^* positivos) y menos intenso (menor C^*) que las muestras donde no se aplicó tratamiento o se usó pasteurización.

El mismo comportamiento encontraron Komes *et al.* (2017), al usar ultrasonido (30 kHz y 60% amplitud) por 5 o 10 min en leche de cabra. La luminosidad (L^*) disminuyó y las muestras fueron más oscuras entre mayor fue el tiempo de ultrasonido. De igual manera sucedió con los parámetros a^* y b^* .

El tipo de tratamiento aplicado, no tuvo efecto en la acidez titulable (0.1%) ni en el pH (6.37 - 6.40). Komes *et al.* (2017) tampoco encontraron un impacto significativo ($P>0.05$) en el pH de leche de cabra sin o con ultrasonido (30 kHz y 60% amplitud) durante 5 min, con valores de pH de 6.60 y 6.68, respectivamente. Similarmente, Jambrak *et al.* (2008) no observaron diferencias en el pH muestras sin y con aplicación de ultrasonido (20 kHz y 43-48 W/cm²) por 15 o 30 min. De igual forma, Barukčić *et al.* (2015) reportaron los mismos valores de acidez de 0.074% para lactosuero fermentado con pretratamiento de pasteurización (65 °C por 30 min) o ultrasonido (20 kHz) a 45°C durante 8 min y 480 o 600 W.

Análisis proximal. Los parámetros de composición proximal de las bebidas de lactosuero-avena (Cuadro 16) muestran que la humedad fue estadísticamente igual ($P>0.05$) entre las bebidas sonicadas a 23 W y 154 W con valores de 93.92 ± 0.018 y 93.94 ± 0.024 , respectivamente. Pero estos valores fueron mayores ($P<0.05$) que la humedad de la bebida control, con un contenido de $93.58\% \pm 0.173$. Aunque en bebidas de lactosuero con ultrasonido no es común que se cuantifique la humedad, se ha reportado que el ultrasonido de alta intensidad cambia la conformación y estructura de las proteínas de tal forma que las partes hidrofílicas internas quedan expuestas (Wang, 1975; Moulton y Wang, 1982; Morel *et al.*, 2000).

Cuadro 16. Efecto del ultrasonido y la pasteurización en la composición proximal de bebidas funcionales de lactosuero-avena (media \pm E.E.)

Componente (%)	Tratamiento ¹		
	LSA/23	LSA/154	LSA/P
Humedad	93.92 \pm 0.018 ^a	93.94 \pm 0.024 ^a	93.58 \pm 0.173 ^b
Grasa	0.99 \pm 0.044 ^a	0.92 \pm 0.044 ^a	0.76 \pm 0.072 ^b
Ceniza	0.29 \pm 0.004 ^b	0.29 \pm 0.006 ^b	0.33 \pm 0.007 ^a
Proteína	3.32 \pm 0.068 ^a	3.33 \pm 0.071 ^a	3.21 \pm 0.057 ^a
Carbohidratos	1.36 \pm 0.104 ^b	1.55 \pm 0.090 ^b	2.36 \pm 0.041 ^a

¹ LSA/23 = Ultrasonido de 24 kHz y 23 W por 15 min; LSA/154 = Ultrasonido de 24 kHz y 154 W por 15 min; LSA/P = Pasteurización a 65 °C por 30 min.

^{a, b} Medias con diferente literal en la misma fila indican diferencia estadística (P<0.05).

Aunado a esto, Jambrak *et al.* (2014) usaron ultrasonido (20 kHz, 43–48 W/cm²) por 15 o 30 min en proteína de lactosuero y encontraron que el peso molecular de las proteínas disminuyó. Además, se dieron cambios en la estructura tridimensional, lo que causó un aumento de los grupos cargados (NH₄⁺, COO⁻) por lo que las interacciones agua-proteína aumentaron.

En cuanto a la cantidad de grasa no hubo diferencia (P>0.05) entre aplicar ultrasonido (40 kHz y 11 W/cm²) por 15 min a potencia de 23 o 154 W, con registros de 0.99 y 0.92%, respectivamente. Por otra parte, la cantidad de grasa de bebidas ultrasonicadas fue significativamente mayor (P<0.05) que la de la bebida control (pasteurización 65°C por 30 min) que tuvo 0.76% de grasa. Estudios previos han encontrado que la pasteurización no tiene efecto en la grasa láctea (Kim *et al.*, 1990) mientras que el ultrasonido sí (Shanmugam *et al.*, 2012).

La reducción del tamaño de los glóbulos de grasa es debida a la implosión de burbujas generadas por la cavitación acústica, que genera ondas de choque de alta intensidad (Chucheval y Chow, 2008). Lo anterior, se traduce en una homogeneización y esto genera mayor cantidad de glóbulos por unidad de volumen, pero de menor tamaño. Por lo que probablemente esta haya sido la causa de que se cuantificara más grasa en las muestras donde se aplicó ultrasonido. Se ha reportado que la disminución del tamaño de los glóbulos de grasa depende mayormente del tiempo (Wu *et al.*, 2000; Shanmugam *et al.*, 2012) y la amplitud del ultrasonido (Bosiljkov *et al.*, 2011). Sin embargo, Gregersen *et al.* (2019) enuncian que el grado de homogeneización también depende de la temperatura y la potencia. Pero estos autores usaron una potencia de 10, 30 o 50 W con temperatura de 27, 50 o 70 °C. En el presente estudio la

temperatura de las bebidas se mantuvo menor a 25 °C. De hecho, ellos comentaron que en las condiciones donde estuvo presente baja temperatura (27 °C) y/o potencia (10 W), la reducción fue mínima. Estos resultados concuerdan con Shanmugam *et al.* (2012) que tampoco encontraron diferencia en el tamaño de los glóbulos de grasa de leche ultrasonicada (20 kHz) a 90 o 18 W durante 15 min. Sin embargo, Monteiro *et al.* (2020) sí encontraron diferencia en el tamaño de los glóbulos de grasa al aplicar 160 W por 937 s o 720 W por 208 s; de ultrasonido (19 kHz) en una bebida de lactosuero y chocolate. Esto puede conducir a diferencias en los contenidos porcentuales de grasa, lo cual se puede confirmar, por ejemplo, al comparar los resultados de la presente investigación con un rango de grasa de 0.92 a 0.99% contra 0.43% del estudio de Trajan *et al.* (2009) en bebidas de lactosuero con fresa y mango, sin tratamiento ultrasónico.

La cantidad de cenizas fue diferente dependiendo del tipo de tratamiento, es decir, la bebida control o pasteurizada tuvo mayor ($P < 0.05$) cantidad $0.33 \pm 0.007\%$ que las bebidas ultrasonicadas con 0.29 ± 0.004 y 0.29 ± 0.006 , y estas últimas no fueron diferentes entre sí ($P > 0.05$). De igual manera, Monteiro *et al.* (2020) no encontraron diferencia en el contenido de minerales al aplicar 160 o 720 W de ultrasonido (19 kHz) por 937 o 208 s, respectivamente a en una bebida de lactosuero con chocolate. Un valor similar, de 0.30% de ceniza, fue reportado por Baba *et al.* (2016) en una bebida con 30% v/v de lactosuero y 70% v/v de jugo de piña.

En cuanto al contenido de proteína en bebidas de lactosuero-avena de la presente investigación, no hubo diferencia ($P > 0.05$) entre aplicar ultrasonido o pasteurización. Los registros fueron de $3.32 \pm 0.068\%$ cuando se aplicó

ultrasonido (24 kHz) a 23 W y $3.33 \pm 0.071\%$ a 154 W, ambos por 15 min; y $3.21 \pm 0.057\%$ con pasteurización a 65 °C por 30 min. Gregersen *et al.* (2019) al igual que en la presente investigación, no encontraron diferencia ($P > 0.05$) en el contenido de proteína, α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, de leche con ultrasonido (20 kHz) por 30 min a 10, 30 o 50 W, el control (calentamiento a 50 o 70°C) o sin algún tratamiento. Estos autores encontraron que entre mayor potencia y temperatura la desnaturalización de la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina aumentó y alcanzó un punto máximo con las combinaciones 70 °C a 30 o 50 W y 50 °C a 50 W, pero no es directamente proporcional a la potencia empleada. Jambrak *et al.* (2008) reportaron que la solubilidad de las proteínas de lactosuero aumentó con el ultrasonido (20 kHz) por 15 y 30 min, y se lo atribuyeron a los cambios en la estructura terciaria de las proteínas. A diferencia del presente estudio, Barukčić *et al.* (2015) encontraron diferente contenido de proteína en lactosuero, al aplicar pasteurización (65°C por 30 min) o ultrasonido (20 kHz) a 60 W, 45 o 55°C por 10 min. Los porcentajes de proteína observados fueron de $0.56 \pm 0.13\%$ y $0.43 \pm 0.09\%$, respectivamente. Sin embargo, en base a que la proteína fue cuantificada mediante el método Kjeldahl (AOAC, 1990) que determina solo la cantidad de nitrógeno y no la proporción de proteínas desnaturalizadas, no se puede concluir si los tratamientos aplicados a bebidas de lactosuero-avena influyeron en la desnaturalización.

Actividad antioxidante. La capacidad antioxidante de bebidas ultrasonicadas a 23 o 154 W sí fue diferente ($P < 0.05$) a la de la bebida control, con valores de 4.24, 4.27 y 4.12 mM equivalente Trolox/mL, respectivamente (Cuadro 17).

Cuadro 17. Efecto del ultrasonido y la pasteurización en la actividad antioxidante de bebidas funcionales de lactosuero-avena (media \pm E. E.)

Bebida	Actividad antioxidante ² (mM equivalente Trolox/mL)	Actividad antioxidante ² (%)
LSA/23 ¹	4.24 \pm 0.032 ^a	77.05 \pm 0.002 ^a
LSA/154 ¹	4.27 \pm 0.011 ^a	76.51 \pm 0.006 ^a
LSA/P	4.12 \pm 0.035 ^b	74.25 \pm 0.006 ^b

¹ Ultrasonido 24 kHz por 15 min

²Medida con la técnica del radical ABTS

LSA/23 = Ultrasonido a 23 W; LSA/154 = Ultrasonido a 154 W; LSA/P = Pasteurización a 65 °C por 30 min.

^{a, b}, Medias con diferente literal indican diferencia estadística (P<0.05).

Pero no se detectó influencia significativa ($P>0.05$) del nivel de potencia de ultrasonido en la capacidad antioxidante de las bebidas de lactosuero-avena.

Guimarães *et al.* (2019) encontraron en una bebida prebiótica de guanábana y lactosuero, que esta capacidad aumenta con la potencia. Las mejores actividades antioxidantes se registraron a 600 y 400 W con 79.5 ± 0.4 y $78 \pm 1.0\%$, mientras que con 200 W se tuvo $63 \pm 1.0\%$. Esta actividad fue significativamente menor ($P<0.05$) al aplicar pasteurización de 75°C a 15 s con $46 \pm 2.0\%$. Abadía-García *et al.* (2016) probaron diferentes tiempos, temperaturas y densidades en la aplicación de ultrasonido (20 kHz y 750 W) como pre-tratamiento de la hidrólisis enzimática de proteína de lactosuero con papaína. Encontraron que el ultrasonido mejoró la actividad antioxidante y que la temperatura y la densidad del ultrasonido influyeron significativamente ($P<0.05$). Las condiciones que generaron mayor capacidad antioxidante fueron a 52.5°C , 0.092 W/mL por 15 min con 22.31% ; y 12°C , 0.220 W/mL por 15 min con 22.10% . Mientras que el control, sin pre tratamiento, registró 19.62% . Liu *et al.* (2019) encontraron que aplicar un tratamiento térmico que consistió en un baño maría durante 180 min, en aislado de proteína de lactosuero, se generó menor ($P<0.05$) actividad antioxidante que cuando se usó termosonicación (20 kHz, 110 W/cm^2) a 90°C por 60 min, pulsado con 5 s encendido y 5 s apagado. Con valores de 38.97% y 44.85% , respectivamente.

Existen estudios que indican que el ultrasonido favorece la generación de péptidos con actividad antioxidante (Uluko *et al.*, 2015).

Los valores de actividad antioxidante de esta investigación fueron mayores que los reportados por Sady *et al.* (2013) en una bebida de lactosuero y

concentrado de naranja con 0.0185 mM equivalente Trolox/mL. También que una bebida láctea con hidrolizado de proteína de suero sabor fresa (2.16 equivalente Trolox/L) o chocolate (2.58 equivalente Trolox/l) o con jugo de chabacano (2.48 equivalente Trolox/L), durazno (2.51 equivalente Trolox/l), limón (2.21 equivalente Trolox/L), manzana (1.83 equivalente Trolox/l) y piña (1.50 equivalente Trolox/L) (Mann *et al.*, 2014). Floegel *et al.* (2011) determinaron la capacidad antioxidante (con la metodología ABTS) de los 50 productos ricos en antioxidantes más populares en Estados Unidos. Los clasificaron en frutas, vegetales y bebidas. De forma global los primeros tres lugares fueron ocupados por las frutas mora azul, ciruela y fresa con valores de 476.6, 372.0 y 273.5 mg de vitamina C/100 g (o 6.552, 7.581 y 3.577 mM equivalente Trolox/100 g con la metodología ORAC. AgricResServ, 2007), respectivamente. Y dentro de la categoría de bebidas, el vino tinto, el té verde y el té verde descafeinado con 223.0, 184.7 y 145.2 mg de vitamina C/100 g (o 3.873, 1.253 y 1.253 mM equivalente Trolox/100 g con la metodología ORAC. AgricResServ, 2007), correspondientemente. También se ha reportado que la vainillina y el ácido vainillinico frecuentemente usados como agentes saborizantes en bebidas y postres, protegen a los alimentos de la peroxidación, reflejada en actividad antioxidante (Murcia y Martínez-Tome, 2001).

Los resultados de la actividad antioxidante para las bebidas de lactosuero-avena obtenidos con la metodología ABTS resultaron mayores que con la de DPPH. Los valores de la actividad antioxidante obtenida con la técnica de DPPH fueron 0.361 ± 0.023 , 0.321 ± 0.034 y 0.141 ± 0.012 mM equivalente Trolox/mL en las bebidas ultrasonificadas a 154 W y 23 W; y la bebida control,

respectivamente. Sin embargo, es relevante mencionar se presentó el mismo comportamiento estadístico. Floegel *et al.* (2011) también tuvieron este comportamiento en la investigación sobre la comparación de estas dos metodologías en la actividad antioxidante de frutas, verduras y bebidas estadounidenses. Concluyen que la técnica de ABTS es mejor que la de DPPH para estimar esta característica en productos que contienen compuestos hidrofílicos, lipofílicos y pigmentos antioxidantes. En base a que el DPPH sólo se disuelve en compuestos orgánicos (especialmente alcohólicos) (Sah *et al.*, 2014) y el radical ABTS reacciona con compuestos antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos (Komes *et al.*, 2017). Una vez que el radical reaccionó con el antioxidante, la absorbancia del DPPH disminuye al estar en contacto con luz (natural o artificial) y oxígeno (Karadag *et al.*, 2009); finalmente en la reacción, el DPPH actúa como agente oxidante y como indicador de la reacción (Sah *et al.*, 2014). Aunado a lo anterior, la mayoría de los estudios que emplean esta técnica reportan los resultados como porcentaje de inhibición, es decir, no lo hacen en base a un compuesto con alta actividad antioxidante como el Trolox o el ácido gálico.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En lactosuero, la aplicación de ultrasonido (40 kHz y 11 W/cm²) durante 3 min tanto a 25 como 55 °C generó mayor actividad antioxidante que cuando se aplicó durante 15 min o se pasteurizó. En bebidas de lactosuero-avena, la adición de 1.5 o 2.0% v/v de saborizante vainilla tuvo mejor olor sensorialmente que cuando se usó 1.0% v/v. En la capacidad para inhibir radicales libres y las características fisicoquímicas, no hay diferencia en la aplicación de ultrasonido (24 kHz) por 15 min a 23 o 154 W. Las bebidas ultrasonicadas presentaron mayor tendencia al color verde y al amarillo, mayor contenido de grasa y actividad antioxidante, pero menor de ceniza y carbohidratos que la bebida pasteurizada. En general, el ultrasonido es superior a la pasteurización en la mejora de la actividad antioxidante del lactosuero y de las bebidas de lactosuero-avena sin efectos determinantes en la calidad fisicoquímica y proximal. Se recomienda evaluar más parámetros, comparar características sensoriales usando ultrasonido en la formulación y determinar la vida de anaquel de las bebidas de lactosuero-avena.

LITERATURA CITADA

- Abadía-García, L., E. Castaño-Tostado, L. Ozimek, S. Romero-Gómez, C. Ozuna y S. L. Amaya-Llano. 2016. Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 37: 84-90.
- AgricResServ, 2007. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2007. USDA database for the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of selected foods, Release 2007. Consultado el 22 de junio de 2009 En: www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=15866.
- Alrahmany, R., T. J. Avis y A. Tsopmo. 2013. Treatment of oat bran with carbohydrases increases soluble phenolic acid content influences antioxidant and antimicrobial activities. *Food Res Int.* 52: 568-574.
- Amiruddin, N. E. N., M. N. Zahary, R. Bhaskar y A. M. Mhd Jalil. 2020. Glycaemic index, palatability and acceptability of energy beverages prepared with β -glucan and whey protein. *Food Res.* 4: 421-430.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15va edición. Arlington, Virginia, Estados Unidos.
- Baba, W. N., S. Din, H. A. Punoo, T. A. Wani, M. Ahumad y F. A. Masoodi. 2016. Comparison of cheese and paneer whey for production of a functional pineapple beverage: Nutraceutical properties and shelf life. *J Food Sci Technol.* 53: 2558-2568.
- Barukčić, I., K. L. Jakopović, z. Herceg, S. Karlović y R. Božanić. 2015. Influence of high intensity ultrasound on microbial reduction, physico-chemical characteristics and fermentation of sweet whey. *Innov Food Sci Emerg.* 27: 94-101.
- Bermúdez-Aguirre, D., M. G. Corradini, R. Mawson y G. V. Barbosa-Cánovas. 2009. Modeling the inactivation of *Listeria innocua* in raw whole milk treated under thermosonication. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 10: 172-178.
- Bobková, A., M. Fikselová, T. Tóth y M. Bobko. 2016. Flavored whey beverages: preparation and evaluation of selected parameters. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies.* 49: 195-199.
- Bosiljkov, T., B. Tripalo, M. Brnčić, D. Ježek, S. Karlović e I. Jaguš. 2011. Influence of high intensity ultrasound with different probe diameter on the degree of homogenization (variance) and physical properties of cow milk. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 34-41.
- Carvalho, F., A. R. Prazeres, y J. Rivas. 2013. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Sci. Total Environ.* 445: 385-396.

- Chandrapala, J., B. Zisu, M. Palmer, S. Kentish y M. Ashokkumar. 2011. Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrason. Sonochem.* 18: 951-957.
- Cheung, I. W. Y., S. Nakayama, M. N. K. Hsu, A. G. P. Samaranayaka y E. C. Y. Li-Chan. 2009. Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Activity of Hydrolysates from Oat (*Avena sativa*) Proteins by *in silico* and *in vitro* Analyses. *J. Agric. Food Chem.* 57: 9234-9242.
- Cho, Y. H., I. S. Shin, S. M. Hong y C. H. Kim. 2015. Production of functional high-protein beverage fermented with lactic acid bacteria isolated from korean traditional fermented food. *Korean J. Food Sci. An.* 35: 159-196.
- Chucheval, A. y R. C. Y. Chow. 2008. A study on the emulsification of oil by power ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* 15: 916-920.
- Cui, P., X. Yang, Q. Liang, S. Huang, F. Lu, J. owusu, X. Ren y H. Ma. 2019. Ultrasound-assisted preparation of ACE inhibitory peptide from milk protein and establishment of its in-situ real-time infrared monitoring model. *Ultrason Sonochem.* 62: 104859.
- Dias, D.d.R.C., Z.M.P. Barros, C.B.O.d. Carvalho, F.A. Honorato, N.B. Guerra, P.M. Azoubel. 2015. Effect of sonication on soursop juice quality. *LWT - Food Sci. Technol.* 62: 883-889.
- Elmalimadi, M. B., J. R. Jovanović, A. B. Stefanović, S. J. Tanasković, S. B. Djurović, B. M. Bugarski y Z. D. Knežević-Jugović. 2017. Controlled enzymatic hydrolysis for improved exploitation of the antioxidant potential of wheat gluten. *Ind. Crop Prod.* 109: 548-557.
- Erkaya, T., M. Başlar, M. Şengül, M. F. Ertugay. 2015. Effect of thermosonication on physicochemical, microbiological and sensorial characteristics of ayran during storage. *Ultrason. Sonochem.* 23: 406-412.
- FDA. 2015. Standards for grade "A" milk and milk products. Grade "A" pasteurized milk ordinance. Standards for grade "A" milk and milk products. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Washington, DC. 34-35.
- Floegel, A., D-O. Kim, S-J. Chung, S. I. Koo y O. K. Chun. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Compost Anal.* 24: 1043-1048.
- Gomes Rocha, J. C., A. Corrêa Mendonça, K. W. Coutinho Viana, M. de Paiva Maia, A. Fernandes de Carvalho, V. P. Rodrigues Minim y P. C. Stringheta. 2017. Beverages formulated with whey protein and added lutein. *Ciência Rural.* 47: 1-7.

- González Siso, M.I. 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: review. *Bioresour Technol.* 57: 1-11.
- Gregersen, S. B., L. Wiking y M. Hammershøj. 2019. Acceleration of acid gel formation by high intensity ultrasound is linked to whey protein denaturation and formation of functional milk fat globule-protein complexes. *J. Food Eng.* 254: 17-24.
- Guimarães, J. T. E. K. Silva, C. s. Ranadheera, J. Morales, R. S. L. Raices, M. C. Silva, M. S. Ferreira, M. Q. Freitas, M. A. A. Meireles y A. G. Cruz. 2019. Effect of high-intensity ultrasound on the nutritional profile and volatile compounds of a prebiotic soursop whey beverage. *Ultrason. Sonochem.* 55: 157-164.
- Guimarães, J. T., E. K. Silva, V. O. Alvarenga, A. L. R. Costa, R. T. Cunha, A. S. Sant'Anna, M. Q. Freitas, M. A. M. Meireles y A. G. Cruz. 2018. Physicochemical changes and microbial inactivation after high-intensity ultrasound processing of prebiotic whey beverage applying different ultrasonic power levels. *Ultrason. Sonochem.* 44: 251-260.
- Hemar, Y., C. Xu, S. Wu, M. Ashokkumar. 2019. Size reduction of “reformed casein micelles” by high-power ultrasound and high hydrostatic pressure. *Ultrason Sonochem.* 63: 104929.
- Herceg, Z., A. R. Jambrak, V. Lelas y S. M. Thagard. 2012. The effect of high intensity ultrasound treatment on the amount of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in milk. *Food Technol. Biotechnol.* 50: 46-52.
- Hernández-Ledesma, B. A. Dávalos, B. Bartolomé y L. Amigo. 2005. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from β -Lactalbumin and α -Lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 53: 588-593.
- ISO 6611:2004. Milk and milk products — Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds — Colony-count technique at 25 degrees C. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/40473.html>.
- ISO 4832:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/38282.html>
- Jambrak, A. R., T. M. Mason, V. Lelas, Z. Herceg e I. L. Herceg. 2008. Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *J. Food Eng.* 86: 281-287.
- Jambrak, A. R., T. M. Mason, V. Lelas, L. Paniwnyk y Z. Herceg. 2014. Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. *J Food Eng.* 121: 15-23.

- Janiaski, D. R., T. C. Pimentel, A. G. Cruz y S. H. Prudencio. 2016. Strawberry-flavored yogurts and whey beverages: What is the sensory profile of the ideal product?. *J. Dairy Sci.* 99: 5273-5283.
- Jay J. M., M. J. Loessner y D. A. Golden. 2005. *Modern food microbiology*. 7ma ed. Springer Science, Nueva York. E. U. A.
- Jeličić I, Božanić R, Brnčić M, Tripalo B. 2012. Influence and comparison of thermal, ultrasonic and thermo-sonic treatments on microbiological quality and sensory properties of rennet cheese whey. *Mljekarstvo*. 62: 165-78.
- Jiang, Z., K. Yao, X. Yuan, Z. Mu, Z. Gao, J. Hou y L. Jiang. 2018. Effects of ultrasound treatment on physicochemical, functional properties and antioxidant activity of whey protein isolate in the presence of calcium lactate. *J. Sci. Food Agric.* 98: 1522-1529.
- Jobara, K., T. Kaido, T. Hori, K. Iwaisako, K. Endo, Y. Uchida y S. Uemoto. 2014. Whey-hydrolyzed peptide-enriched immunomodulating diet prevents progression of liver cirrhosis in rats. *Nutr.* 30: 1195-1207.
- Juraga, E., B. S. Šalamon, Z. Herceg y A. R. Jambrak. 2011. Application of high intensity ultrasound treatment on Enterobacteriae count in milk. *Mljekarstvo*. 61: 125-134.
- Karadag, A., B. Ozcelik y S. Saner. 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Anal. Methods*. 2: 41-60.
- Kim, Y.L., D. M. Barbano y R. R. Rasmussen. 1990. Influence of pasteurization on fat and nitrogen recoveries and cheddar cheese yield. *J Dairy Sci.* 73: 561-570.
- Komes, D., A. Bušić, A. Belščak-Cvitanović, M. Brnčić, T. Bosiljkov, A. Vojvodić y F. Dujmić. 2017. Novel approach to the development of functional goat's milk-based beverages using medicinal plant extracts in combination with high intensity ultrasound treatment. *Food Technol. Biotechnol.* 55: 484-495.
- Krešić, G. V. Lelas, A. R. Jambrak, Z. Herceg, S. R. Brnčić. 2008. Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins. *J. Food Eng.* 87: 64-73.
- Kumar, M. D., A. K. Beena y M. D. Baig. 2017. Optimization of *Lactobacillus casei* and inulin levels in the preparation of symbiotic whey beverage using response surface methodology. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 6: 558-568.
- Lawless H. T. y H. Heymann. 2010. *Sensory evaluation of food*. 2a ed. Springer, Nueva York, E. U.A.

- León, K., D. Mery, F. Pedreschi y J. León. 2006. Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images. *Food Res. Int.* 39: 1084-1091.
- Liu, L., X. Li, L. Du, X. Zhang, W. Yang y H. Zhang. 2019. Effect of ultrasound assisted heating on structure and antioxidant activity of whey protein peptide grafted with galactose. *LWT - Food Sci. Technol.* 109: 130-136.
- Liutkevičius, A., V. Speičienė, A. Kaminskas, V. Jablonskienė y G. Alenčikienė. 2016. Development of a functional whey beverage, containing calcium, vitamin D, and prebiotic dietary fiber, and its influence on human health. *CyTA J Food.* 14: 309-316.
- Madadlou y Abbaspourrad. 2018. Bioactive whey peptide particles: An emerging class of nutraceutical carriers. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58: 468-1477.
- Madureira, A. R., T. Tavares, A. M. P. Gomes, M. E. Pintado y F. X. Malcata. 2010. Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *J. Dairy Sci.* 93: 437-455.
- Mann, B., A. Kumari, R. Kumar, R. Sharma, K. Prajapati, S. Mahboob y S. Athira. 2014. Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *J Food Sci Technol.* 52: 3235-3241.
- Monteiro, S. H. M. C., E. K. Silva, J. T. Guimarães, M. Q. Freitas, M. A. A. Meireles y A. G. Cruz. 2020. High-intensity ultrasound energy density: How different modes of application influence the quality parameters of a dairy beverage. *Ultrason. Sonochem.* 63: 104928.
- Montesdeoca, R., I. Benítez, R. Guevara y G. Guevara. 2017. Procedimiento para la producción de una bebida láctea fermentada utilizando lactosuero. *Rev. Chil. Nutr.* 44: 39-44.
- Morel, M. H., P. Dehlon, J. C. Autran, J. P. Leygue, C. Bar-L'Helgouac'h. 2000. Effects of temperature, sonication time, and power settings on size distribution and extractability of total wheat flour proteins as determined by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.* 77: 685-691.
- Mortazavi, N. y J. Aliakbarlu. 2019. Antibacterial effects of ultrasound, cinnamon essential oil, and their combination against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in milk. *J. Food Sci.* 84: 3700-3706.
- Moulton, K. J. y L. C. Wang. 1982. A pilot-plant study of continuous ultrasonic extraction of soybean protein. *J. Food Sci.* 47: 1127-1129.
- Murcia, M. A. y M. Martínez-Tome. 2001. Antioxidant activity of resveratrol compared with common food additives. *J. Food Prot.* 64: 379-84.

- Nakurte, I., I. Kirhnere, J. Namniece, K. Saleniece, L. Krigere, P. Mekss, Z. Vicupe, M. Bleidere, L. Legzdina y R. Muceniece. 2013. Detection of the lunasin peptide in oats (*Avena sativa* L). *J. Cereal Sci.* 57: 319-324.
- Peña-González, E., A. D. Alarcón-Rojo, A. Rentería, I. García, E. Santellano, A. Quintero y L. Luna. 2017. Quality and sensory profile of ultrasound-treated beef. *Ital. J. Food Sci.* 29: 463-475.
- Ragab, E. S., S. Zhang, X. Pang, J. Lu, K. S. Nassar, B. Yang, U. J. Obaroakpo y J. Lv. 2020. Ultrasound improves the rheological properties and microstructure of rennet-induced gel from goat milk. *Int. Dairy J.* 104: 104642.
- Režek Jambrak, A., M. Šimunek, F. Grbeš, A. Mandura e I. Djekic. 2018. Analysis of apple beverages treated with high-power ultrasound: a quality function deployment approach. *J Sci Food Agric.* 98: 2258-2266.
- Runyan, C. M., J. C. Carmen, B. L. Beckstead, J. L. Nelson, R. A. Robinson y W. G. Pitt. 2006. Low-frequency ultrasound increases outer membrane permeability of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 52: 295-301.
- Sady, M., G. Jaworska, T. Grega, E. Bernaś y J. Domagała. 2013. Application of acid whey in orange beverage production. *Food Technol. Biotechnol.* 51: 266-277.
- Sah, B. N. P., T. Vasiljevic, S. McKechnie y O. N. Donkor. 2014. Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. *Food Chem.* 156: 264-270.
- SAS, Institute. 2006. SAS/STAT User's Guide. SAS Inst. Inc., Cary, Carolina del Norte, E. U. A.
- Saxena, D., S. Kumar Chakraborty, L. Sabikhi y D. Singh. 2013. Process optimization for a nutritious low-calorie high-fiber whey-based ready-to-serve watermelon beverage. *J. Food Sci. Technol.* 52: 960-967.
- Shanmugam, A., J. Chandrapala y M. Ashokkumar. 2012. The effect of ultrasound on the physical and functional properties of skim milk. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 16: 251-258.
- Sheraz, M. A., S. H. Kazi, S. Ahmed, Z. Anwar e I. Ahmad. 2014. Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin. *Beilstein J. Org. Chem.* 10: 1999-2012.
- Singh, S., P. Khemariya y A. Rai. 2014. Process optimization for the manufacture of lemon based beverage from hydrolyzed whey. *J Food Sci Technol.* 51: 691-699.

- Sohrabi, Z., M. H. Eftekhari, M. H. Eskandari, A. Rezaeianzadeh y M. M. Sagheb. 2016. Development and characterization of fermented and unfermented whey beverages fortified with vitamin E. *J. Agr. Sci. Tech.* 18: 1511-1521.
- Thaipong, K., U. Boonprakoba, K. Crosbyb, L. Cisneros-Zevallosc y D. H. Byrne. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* 19: 669-675.
- Uluko, H., H. Li, W. Cui, S. Zhang, L. Liu, J. Chen, Y. Sun, Y. Su y J. Lv. 2013. Response surface optimization of angiotensin converting enzyme inhibition of milk protein concentrate hydrolysates *in vitro* after ultrasound pretreatment. *Innov. Food Sci. Emerg.* 20: 133-139.
- Uluko, H., S. Zhang, L. Liu, M. Tsakama, J. Lu y J. Lu. 2015. Effects of thermal, microwave, and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates. *J. Funct. Foods.* 18: 1138-1146.
- Wan, W. y B. Xu. 2018. Development of an orange juice beverage formulated with oat beta-glucan and whey protein isolate. *J. Sci. Food Agric.* 98: 4685-4691.
- Wang, L.C. 1975. Ultrasonic extraction of proteins from autoclaved soybean flakes. *J. Food Sci.* 40: 549-551.
- Williams Mena, P. 2002. Formulación y elaboración de dos bebidas refrescantes con base en suero dulce de queso Fresco y sabores de frutas. Tesis de licenciatura. Universidad de Zamorano. San Antonio de Oriente, Francisco Morazán, Honduras.
- Wu, H., G. J. Hulbert y J. R. Mount. 2000. Effects of ultrasound on milk homogenisation and fermentation with yoghurt starter. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 1: 211-218.
- Zaho, Q., X. Hu, Q. Guo, S. W. Cui, Y. Xian, A. You, X. Chen, C. Xu y X. Gao. 2020. Physicochemical properties and regulatory effects on db/db diabetic mice of β -glucans extracted from oat, wheat and barley. *Food Hydrocoll.* 37: 60-68.

**ESTUDIO 3. INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE INULINA Y EL TIEMPO DE
ULTRASONIDO EN PROPIEDADES FUNCIONALES DE UNA BEBIDA DE
LACTOSUERO-AVENA DURANTE LA VIDA DE ANAQUEL**

RESUMEN

INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE INULINA Y EL TIEMPO DE ULTRASONIDO EN PROPIEDADES FUNCIONALES DE UNA BEBIDA DE LACTOSUERO- AVENA DURANTE LA VIDA DE ANAQUEL

POR:

M. C. ANA LUISA HERRERA PONCE

Doctorado in Philosophia en Producción Animal

Universidad Autónoma de Chihuahua

Facultad de Zootecnia y Ecología

Secretaría de Investigación y Posgrado

Presidente: Ph. D. Alma Delia Alarcón Rojo

El objetivo de este estudio fue determinar la influencia del tiempo de ultrasonido (24 kHz y 23 W), nivel de inulina y su interacción, en propiedades funcionales y sensoriales de bebidas de lactosuero-avena durante el almacenamiento a 4 °C. Se evaluaron por separado el lactosuero y la avena como principales ingredientes de las bebidas. El pH de los dos ingredientes disminuyó ($P < 0.05$) durante el almacenamiento y la acidez titulable aumentó. La actividad antioxidante del lactosuero se elevó al día 7 pero disminuyó al día 14 de almacenamiento mientras que la avena incrementó esta propiedad durante el almacenamiento. El lactosuero presentó mayor ($P < 0.05$) capacidad para inhibir la ECA que la avena, sin efecto de almacenamiento. Respecto a las bebidas, la acidez no tuvo cambios en el almacenamiento, pero el pH disminuyó ligeramente. Durante el almacenamiento, la bebida con mayor capacidad antioxidante y mayor AIECA ($P < 0.05$) fue la tratada con 1% p/v de inulina y 15 min de ultrasonido.

Respecto a la aceptación sensorial existió asociación entre la aceptación general y el tipo de bebida, pero sin efecto de tratamiento sobre la aceptación de atributos sensoriales específicos. En general, las bebidas más aceptadas fueron las tratadas con ultrasonido. Mientras que la bebida pasteurizada a 65 °C por 30 min y sin inulina, presentó correspondencia con la categoría de desagradado. Basado en los análisis estadísticos de la evaluación funcional y sensorial de las bebidas, la mejor formulación fue la bebida con 1% p/v de inulina y 15 min de ultrasonido. Asimismo, se demostró que el lactosuero y la avena son excelentes ingredientes para formular bebidas con propiedades funcionales sobresalientes y con buena aceptación sensorial. Se recomienda perfeccionar sensorialmente la bebida y monitorear la vida de anaquel con un análisis microbiológico y sensorial.

ABSTRACT

INFLUENCE OF INULIN AND ULTRASOUND ON FUNCTIONAL PROPERTIES DURING SHELF LIFE OF OAT – WHEY BEVERAGE

BY:

ANA LUISA HERRERA PONCE

The objective of this study was to determine the influence of ultrasound (24 kHz, 23 W) time, inulin level and their interaction on functional and sensory properties of whey-oat beverages during storage at 4 °C. Whey and oat were evaluated separately as the main ingredients of the beverages. The pH of the two ingredients decreased ($P < 0.05$) during storage and titratable acidity increased. The antioxidant activity of whey increased by day 7 but it decreased to day 14 of storage, while oats showed an increase in this property along storage. Whey had a greater ($P < 0.05$) ability to inhibit ACE than oats without storage effect. Regarding the formulated beverages, the acidity did not show changes in storage but the pH decreased slightly. During storage, the beverage with the highest antioxidant capacity ($P < 0.05$) and the highest angiotensin converting enzyme inhibitory activity (ACEIA) ($P < 0.05$) was that treated with 1% inulin and 15 min of ultrasound. Regarding the sensory acceptability, there was an association between the preference and the type of beverage, without effect in the acceptability of specific sensory attributes. In general, ultrasound-treated beverages were the most accepted, while the pasteurized beverage at 65 °C for 30 min without inulin was the less accepted. Based on a statistical analysis of the functional and sensory evaluation of the beverages, the optimal formulation is found to have 1% inulin and 15 min of ultrasound. Furthermore, whey and oats

are excellent ingredients for formulating beverages with outstanding functional properties and good consumer acceptance. It is recommended to improve the sensory properties of this type of beverages and to determine their shelf life with microbiological and sensory analysis.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales se definen como “alimentos que, cuando se consumen regularmente dentro de una dieta diversa a niveles eficaces, tienen efectos potencialmente positivos en la salud, más allá de la nutrición básica” (Granato *et al.*, 2017). El consumo de alimentos funcionales ha ido en aumento los últimos años (Granato *et al.*, 2020). Dentro de esta categoría, las bebidas funcionales son la categoría más amplia y diversa en base a idoneidad para satisfacer las necesidades del consumidor en cuanto a tamaño, transporte, apariencia, facilidad de almacenamiento y contenido nutricional dado por los compuestos bioactivos antioxidantes, vitaminas, minerales, probióticos y prebióticos que contienen (Corbo *et al.*, 2014).

Las bebidas funcionales de lactosuero se han elaborado desde la antigüedad (Holsinger *et al.*, 1974). Sin embargo, es hasta la fecha que se les ha dado mayor importancia (Schoina *et al.*, 2020). El lactosuero es un subproducto de la manufactura de queso y tiene un alto potencial contaminante (Carvalho *et al.* 2013), pero también tiene un elevado valor nutricional (Brandelli *et al.*, 2015).

La formulación de las bebidas de lactosuero está en constante mejora. En los últimos años se han adicionado con otros ingredientes funcionales como la fibra soluble (β -glucano e inulina) que además de ser prebiótico puede fungir como estabilizante (Nikmaram *et al.*, 2015) o mejorar la textura (Güler-Akın *et al.*, 2016; Guimarães *et al.*, 2018). Asimismo, se han aplicado nuevas tecnologías como el ultrasonido para alargar la vida de anaquel (Ashokkumar, 2015) y mejorar las características funcionales, sensoriales y nutricionales del lactosuero (Monteiro *et al.*, 2020). El ultrasonido es una tecnología “verde e innovadora” ya

que involucra menos gasto de agua, tiempo y energía y, por consiguiente, involucra también menos costos e impacto ambiental en comparación con tecnologías tradicionales como la pasteurización (Pereira y Vicente, 2010; Chemat *et al.*, 2017). El ultrasonido en el lactosuero propicia la liberación de péptidos con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (Wu *et al.*, 2018) y/o antioxidante (Jiang *et al.*, 2018). Sin embargo, a la fecha no hay reportes de la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina en bebidas de lactosuero-avena.

La adición de hidrocoloides, como la inulina, pueden prevenir la sedimentación de bebidas de lactosuero (Gad *et al.*, 2013). La inulina es un carbohidrato formado por uniones β (2,1)- de residuos de fructosil con un residuo de glucosa terminal y está presente como carbohidratos de reserva en un gran número de plantas (van Loo *et al.*, 1995; Ritsema y Smeekens, 2003). El uso tecnológico de la inulina se basa en sus propiedades como sustituto de azúcar, sustituto de grasa y modificador de textura. Se ha reportado que la adición de inulina al yogur bajo en grasa da como resultado una cremosidad mejorada. Cuando se agrega inulina a los alimentos en bajas concentraciones las propiedades reológicas y la calidad sensorial del producto se afecta ligeramente debido a la neutralidad o sabor ligeramente dulce y el efecto limitado sobre la viscosidad de este ingrediente (Villegas y Costell, 2007; De Castro *et al.*, 2009). Sin embargo, la inulina tiene efecto en el grosor y sabor de la bebida y depende del tipo de producto, de la concentración y del tipo de inulina que se utilice (Villegas *et al.*, 2007; Debon *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2011).

A la fecha no existen estudios donde se haya evaluado el efecto conjunto de la inulina y el ultrasonido en las propiedades funcionales de bebidas elaboradas con lactosuero-avena. A tal efecto que el objetivo de este estudio fue evaluar la influencia del tiempo de ultrasonido y el nivel de inulina sobre pH, acidez titulable, actividad antioxidante, actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina y la aceptación sensorial de bebidas de avena-lactosuero, durante el almacenamiento a 4 °C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Formulación de la Bebida de Lactosuero-Avena

Para elaborar la bebida de lactosuero-avena, se obtuvo lactosuero con la metodología para la elaboración de queso fresco de Villegas de Gante (2012). Se partió de leche comercial fluida entera pasteurizada (Lala[®]). Se calentó a 42 °C y se agregó CaCl₂ (20 g/100 L), se homogeneizó se homogeneizó mezclando la leche con movimientos en forma de ocho con un cucharón. Se enfrió a 34 °C para agregar la renina (Cuamix[®] CHR Hansen) en una proporción de 15 mL/100 L. Se dejó reposar 90 min, manteniendo la temperatura en 32 °C. Una vez formada la cuajada, se cortó suavemente en cuadros de 1 cm por 1 cm, para mejorar la sinéresis de la red proteica del cuajo y posterior liberación del lactosuero. Se dejó reposar 15 min y se redujo el tamaño de los coágulos de leche muy suavemente con una cuchara grande. Se calentó lentamente (elevando 1 °C cada 5 min) hasta 39 °C y se dejó reposar nuevamente durante 15 min. Se desueró con la ayuda de tela de algodón. Del lactosuero obtenido, se tomaron 40 mL para obtener el extracto soluble mediante doble centrifugación (Beckman Coulter. Modelo Avanti J-26 XP1. Serie JXT12H22. Indianápolis, E. U. A.) a 4,000 x g (5,75 rpm) por 30 min y 4 °C. El extracto se filtró con membranas de 2.5 µm (Whatman #42) mediante el uso de matraz, embudo de filtración y bomba de vacío. Posteriormente, el filtrado obtenido se pasó por una membrana (filtros de 0.2 µ) y, el producto resultante se colocó en tubos de plástico de 1 mL con tapa y fondo cónico para ser almacenados a -20 °C hasta los análisis. Del lactosuero restante se tomó el volumen necesario para mezclarse con la bebida de avena. La cual se obtuvo como lo reportó Herrera (2013). Se partió de granos

de avena forrajera (*Avena sativa* var. Karma) adquiridos con un proveedor local (Semillas Purasangre, Cuauhtémoc, Chih.). La avena se enjuagó con agua corriente y se puso a remojar en recipientes de plástico con agua destilada durante 12 h cambiando el agua cada 4 h. Se drenó y los granos de avena se colocaron en un recipiente de plástico con una capa superior e inferior de algodón humedecido y se dejaron germinar a temperatura ambiente (~25 °C) durante 72 h o hasta la emergencia de 1 cm del coleóptilo (protuberancia que dará origen a una nueva planta). Se hizo una modificación a la metodología que consistió en proteger la avena de la luz durante el proceso de germinación y manteniendo humedecido el algodón, asperjando agua cada 24 h. La avena germinada se extendió en charolas de acero inoxidable y se colocó en un horno de convección mecánica (603 Napco Scientific Company, E.U.A.) a 45 °C por 20 h. Posteriormente la avena se transfirió a un horno convencional con corriente de aire (SLGS/12SC Southbend, E.U.A.) a 95 °C por 3 h para obtener avena malteada. Ésta se molió (Retsch. Modelo LC-170. Haan Alemania) y se usó una malla de 1 mm. En un matraz Erlen Meyer (250 mL) con rosca se preparó la bebida de avena malteada con 5% p/v (el volumen se completó con agua purificada, Epura®) de harina y se colocó en un baño maría eléctrico (1203 VWR Scientific, E.U.A.) a 90 °C por 60 min y después en un baño de agua a 50 °C por 30 min. La bebida de avena se decantó, se refrigeró a 4 °C por 24 h y se volvió a decantar. Esta bebida de avena se mezcló con lactosuero en una proporción 1:1, se adicionó 5% de azúcar morena de caña (Zulka®), 1.5% de saborizante natural vainilla (Molina®) y 1 o 2% p/v de inulina de agave.

Tratamientos

Para evaluar el tiempo de aplicación de ultrasonido y la cantidad de inulina adicionada sobre propiedades fisicoquímicas y funcionales de las bebidas de lactosuero-avena se diseñaron cuatro tratamientos definidos como LSA/1/3, LSA/2/3, LSA/1/15 y LSA/2/15. Que corresponden a bebidas de lactosuero-avena (LSA) con 1 o 2% p/v de inulina y 3 o 15 min de ultrasonido respectivamente.

Aplicación de Ultrasonido

Se aplicó ultrasonido de sonda (Ultrasonic Processor Hielscher UP400s) con un sonotrodo (Hielscher Sonotrode S24d22D) de titanio de 22 mm de diámetro, 430 mm² de área y 100 mm de longitud. A una frecuencia de 24 kHz, durante de 3 o 15 min (Jambrak *et al.*, 2014) y a una potencia fija de 23 W. Los parámetros del equipo fueron 10% de pulso y 100% de amplitud. La punta de la sonda se sumergió a media profundidad, aproximadamente 3 cm hasta el fondo del vaso de precipitado de 1 L que contenía 500 mL de bebida. La temperatura de la bebida se mantuvo por debajo de la temperatura ambiental que era de 25 °C.

Análisis Sensorial

Para evaluar la influencia de la adición de inulina y la aplicación de ultrasonido contra la aplicación de pasteurización en bebidas de lactosuero-avena, sobre la aceptación y preferencia sensorial se realizó un análisis sensorial. El panel estuvo integrado por 123 panelistas no entrenados entre estudiantes y personal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. De los cuales, 46% fueron hombres y 54% mujeres, con un rango de edad de 17 a 70 años (27 años en promedio). El reclutamiento

fue vía invitación en áreas comunes y salones de clase. Los criterios de selección de los panelistas se basaron en: 1) Ausencia de enfermedades respiratorias; 2) consumidor habitual de productos lácteos; y 3) interés por participar en la investigación. La evaluación se llevó a cabo en el laboratorio de Análisis Sensorial de dicha Facultad, equipado con 12 cabinas y se usó luz blanca fluorescente para la mejor observación de las bebidas. Las bebidas se elaboraron un día antes de la evaluación y se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta la prueba. A cada panelista se le presentaron 30 mL de cada bebida, colocadas en diferente orden y codificadas con números aleatorios de tres dígitos. Los panelistas recibieron muestras de todos los tratamientos y se les indicó que probaran y evaluaran cada uno utilizando la escala provista. Entre muestras, los panelistas descansaron durante 1 min y se enjuagaron la boca con agua. Las muestras se presentaron en un diseño equilibrado (MacFie *et al.*, 1989). El tratamiento aplicado en la bebida control fue pasteurización a 65 °C por 30 min.

Prueba de aceptabilidad. Se les pidió a los panelistas que evaluaran la aceptación de los atributos de apariencia, color, olor, sabor, dulzor, viscosidad, regusto y aceptación general. Utilizando una escala hedónica de 5 puntos donde la calificación 5 se refiere a “me gusta”, 4 a “me gusta ligeramente”, 3 a “ni me gusta ni me disgusta”, 2 a “me disgusta ligeramente” y 1 a “no me gusta” (Lawless y Heymann, 2010). El formato empleado se muestra en el Apéndice C.

Prueba de preferencia. La preferencia se evaluó mediante la prueba de ordenamiento de preferencia de acuerdo con el grado de gusto de los panelistas. Se pidió a los panelistas que clasificaran los productos en orden descendente de preferencia (Meilgaard *et al.*, 1991; 2015). Las muestras se presentaron

simultáneamente a los panelistas para minimizar la variabilidad aportada por los efectos de la memoria. El formato empleado se muestra en el Apéndice D.

Vida de Anaquel

Para determinar la vida de anaquel de las bebidas de lactosuero-avena, se dividieron en lotes para cada determinación analítica y tiempo de monitoreo (1, 7, 14 y 21 días a 4 °C). Cuando fue día de monitoreo, se midió pH y acidez y se obtuvo el extracto soluble mediante la doble centrifugación (Beckman Coulter. Modelo Avanti J-26 XP1. Serie JXT12H22. Indianápolis, E. U. A.) a 4,000 x g (5,75 rpm) por 30 min y 4 °C. El extracto se filtró con membranas de 2.5 µm (Whatman #42) con el uso de un matraz, embudo de filtración y bomba de vacío. Posteriormente, el filtrado obtenido se pasó por una membrana de 0.2 µ. El producto resultante se colocó en tubos de plástico de 1 mL con tapa y fondo cónico y se almacenó a -20 °C hasta el análisis. Es importante mencionar que las muestras de todos los días de monitoreo, se analizaron en conjunto el mismo día.

Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante del extracto soluble de los ingredientes mayoritarios y de las bebidas, se midió al inicio y cada 7 días durante el almacenamiento a 4 °C por 14 días. Se siguió la técnica del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS). Según lo reportado por Thaipong *et al.* (2006). Se preparó una solución de ABTS 7.4 mM, disolviendo 0.038 g de sal amónica cristalizada de ABTS (Sigma Aldrich) y aforando con 10 mL de agua destilada. Posteriormente se prepararon 10 mL de una solución de persulfato de potasio 2.6 mM. Para generar el radical ABTS se mezclaron estas dos soluciones y el producto se dejó reposar en la oscuridad a temperatura

ambiente (25 °C) durante 14 h (solución stock). De esta solución se tomó 1.8 mL para obtener absorbancia de 1.1 ± 0.02 , al adicionar metanol. En frascos de vidrio ámbar se colocaron 150 μ L de muestra o estándar Trolox y 2850 μ L de la solución de trabajo ABTS, se dejaron reposar durante 2 h en la oscuridad a temperatura ambiente. La muestra se vertió en una celda de cuarzo de 4 mL y se leyó la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro UV (UV-1800. Shimadzu, Japón). La actividad antioxidante se reportó como mM equivalente Trolox/mL, empleando la absorbancia obtenida y sustituyendo en la ecuación de la recta. También se reportó como porcentaje de inhibición (Ecuación 4).

$$\% \text{ inhibición} = [(A \text{ control} - A \text{ muestra}) / A \text{ control}] * 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Dónde *A control* es la absorbancia de la solución de trabajo de ABTS y *A muestra* es la absorbancia de la muestra o estándar Trolox con el ABTS después 2 h de reposo en la oscuridad.

Actividad Inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina (AIECA)

De igual manera, la AIECA del extracto soluble de los ingredientes mayoritarios y de las bebidas, se midió al inicio y cada 7 días durante el almacenamiento a 4 °C por 14 días. Se siguió la metodología reportada por Cushman y Cheung (1971) con las modificaciones de Donkor *et al.* (2005). Se mezclaron 100 μ L de una disolución 5mM de HHL (N-Hippuryl-His-Leu hydrate, H1635. Sigma, E.U.A.) elaborada con buffer de fosfatos (Fosfato de sodio dibásico, 7-dihidrato 0.1 M y cloruro de sodio 0.3 M) con 40 μ L de muestra o agua destilada (blanco) y 20 μ L de una solución 0.1 U/mL de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Sigma Aldrich). Se incubaron a 37 °C por 30 min en baño maría, posteriormente se adicionaron 250 μ L de ácido clorhídrico (J.T. Baker) 1

M y 1 mL de acetato de etilo y se agitó. Se centrifugó (IKA, Staufen, Alemania) a 2,000 x g por 10 min. Se tomaron 750 µL del sobrenadante o acetato de etilo (sin tocar la fase inorgánica o precipitado) y se evaporaron en baño maría (colocado en una campana de extracción) durante 30 min. Se colocó 1 mL de agua destilada para disolver el residuo, se agitó, se colocó en una celda de cuarzo de 1 mL y se leyó la absorbancia a 228 nm en un espectrofotómetro (UV-1800. Shimadzu, Japón). El resultado se reportó como el porcentaje de la actividad inhibitoria de la ECA (Ecuación 5).

$$\% \text{ inhibición} = [(A \text{ control} - A \text{ muestra}) / A \text{ control}] * 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Dónde *A muestra* es la absorbancia de cada muestra (bebida) con el sustrato (HHL) y la ECA; y *A control* es la absorbancia del control de ECA: Sustrato (HHL), agua desionizada y ECA.

Análisis Estadístico

Las variables pH, acidez titulable, actividad antioxidante, actividad inhibitoria de la angiotensina y análisis sensorial del lactosuero, avena o bebida de lactosuero-avena, fueron evaluadas mediante un arreglo factorial completamente al azar, donde los factores considerados y sus niveles fueron: inulina, en los niveles: 1 y 2%; y tiempo de ultrasonido a 3 y 15 min. Se realizó un Análisis de Varianza mediante el procedimiento del modelo lineal generalizado del paquete SAS (SAS, 2006), con el siguiente modelo estadístico (Ecuación 6):

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad \text{(Ecuación 6)}$$

Dónde: Y_{ijk} = variable respuesta medida en la repetición k del nivel de inulina i y el tiempo de ultrasonido j , μ = media general, A_i = efecto de la aplicación

del nivel de inulina i , B_j = efecto del tiempo de ultrasonido j , AB_{ij} = efecto de la interacción de la aplicación del nivel de inulina i y del tiempo de ultrasonido j , y ε_{ijk} = error aleatorio de la repetición k del nivel de inulina i y el tiempo de ultrasonido j ; el cual se supone idéntica e independientemente distribuido de manera normal, con media 0 y varianza σ^2 .

Cuando el efecto de un factor fue significativo ($P < 0.05$) se realizó la comparación múltiple de medias de Tukey.

Los resultados del análisis sensorial al ser valores categóricos en escala ordinal (1 a 5), no complementan los supuestos del ANOVA; por consiguiente, los datos se analizaron adicionalmente mediante una técnica no paramétrica, la prueba de chi cuadrada, la cual no requiere ningún supuesto distribucional; para ello se utilizó el procedimiento FREQ (SAS, 2006) y posteriormente, cuando la asociación fue significativa ($P < 0.05$) o mostró alguna tendencia ($0.05 < P < 0.15$), se realizó un análisis de correspondencias. Para observar el grado de similitud entre tratamientos y el nivel de correspondencia entre tratamientos con los niveles de respuesta de aceptación sensorial, usando para ello el procedimiento CORRESP de SAS (SAS, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características de la Avena y del Lactosuero

pH. El pH del lactosuero y de la avena, en general disminuyó significativamente ($P < 0.05$) durante el almacenamiento de 21 días a 4 °C (Cuadro 18). La única excepción se observó el día 1 y 7 en el lactosuero, donde no hubo diferencia ($P > 0.05$) con el control. Al comparar los valores de pH de los ingredientes, el mismo día de monitoreo, el lactosuero presentó valores más altos ($P < 0.05$) que la bebida de avena, a excepción del día 14. Los valores para el lactosuero fueron 6.63 ± 0.005 , 6.63 ± 0.005 , 4.66 ± 0.001 y 4.50 ± 0.001 , los días 1, 7, 14 y 21 respectivamente. Mientras que para la bebida de avena fueron 5.71 ± 0.002 , 5.73 ± 0.002 , 5.34 ± 0.001 y 3.61 ± 0.001 los días 1, 7, 14 y 21 respectivamente.

En el pH del lactosuero del día 1, fue mayor al reportado por Chatterjee *et al.* (2015) con 6.27 ± 0.12 en lactosuero que emplearon para formular una bebida con jugo de naranja. Castro *et al.* (2013) midieron el pH del lactosuero que obtuvieron de la elaboración de queso fresco Minas para la formulación de una bebida probiótica y fue de 6.26, aunque las características del lactosuero dependen del tipo de queso del que provenga, entre otras cosas, en este caso fue similar al pH del lactosuero del presente estudio probablemente por ser subproducto de queso fresco.

El pH de la bebida de avena a los 21 días de almacenamiento, fue similar al obtenido por Herrera (2013) en una bebida probiótica de avena, con 3.65 al fermentar durante 8 h a 27 °C y 182 rpm.

Cuadro 18. Caracterización fisicoquímica y funcional de los ingredientes mayoritarios de bebidas de lactosuero-avena durante el almacenamiento a 4 °C (media ± E. E.)

Ingrediente	Día de almacenamiento	pH	Acidez titulable ¹ (%)	Actividad antioxidante ² (mM equivalente Trolox/mL)	Actividad antioxidante ² (%)	AIECA ³ (%)
Lactosuero	1	6.63 ± 0.005 ^{Aa}	0.11 ± 0.001 ^{Ba}	4.47 ± 0.016 ^{Ba}	95.61 ± 0.286 ^{Ba}	72.92 ± 3.994 ^{Aa}
	7	6.63 ± 0.005 ^{Aa}	0.12 ± 0.002 ^{Ba}	6.89 ± 0.033 ^{Aa}	99.57 ± 0.016 ^{Aa}	68.39 ± 1.699 ^{Aa}
	14	4.66 ± 0.001 ^{Bb}	0.31 ± 0.002 ^{Aa}	3.94 ± 0.050 ^{Cb}	53.94 ± 0.766 ^{Cb}	77.45 ± 2.247 ^{Aa}
	21	4.50 ± 0.001 ^{Ca}	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
Bebida de avena	1	5.71 ± 0.002 ^{Bb}	0.06 ± 0.001 ^{Cb}	3.56 ± 0.003 ^{Cb}	79.58 ± 0.053 ^{Cb}	63.83 ± 3.134 ^{Aa}
	7	5.73 ± 0.002 ^{Ab}	0.07 ± 0.005 ^{Bb}	6.32 ± 0.007 ^{Bb}	90.21 ± 0.108 ^{Bb}	55.25 ± 0.971 ^{Bb}
	14	5.34 ± 0.001 ^{Ca}	0.08 ± 0.002 ^{Ab}	6.44 ± 0.005 ^{Aa}	92.01 ± 0.074 ^{Aa}	64.52 ± 1.550 ^{Aa}
	21	3.61 ± 0.001 ^{Db}	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.

¹ Expresada como porcentaje de la concentración de ácido láctico

² Medida con la metodología ABTS

³ Actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina

N. D. = No determinada

^{A, B, C, D} Medias con diferente literal mayúscula en la misma columna indican diferencia significativa (P<0.05) entre los días de almacenamiento en el mismo ingrediente.

^{a, b} Medias con diferente literal minúscula en la misma columna indican diferencia significativa (P<0.05) entre los ingredientes el mismo día de almacenamiento.

Por lo que se puede decir que probablemente, tanto en el lactosuero como en la bebida de avena de esta investigación estuvieron presentes microorganismos que disminuyeron el pH durante el almacenamiento.

Güler-Akın *et al.* (2016) elaboraron un yogurt adicionado con inulina y fibra de avena y reportaron valores de pH menores a los observados en la bebida de avena de la presente investigación, pero con la misma tendencia descendente, durante el almacenamiento a 4 °C. Los valores fueron 4.62 ± 0.049 , 4.54 ± 0.049 , 4.42 ± 0.064 y 4.33 ± 0.035 el día 1, 7, 14 y 21, respectivamente. Sharma *et al.* (2017) también reportaron una disminución del pH en una bebida de lactosuero-avena, durante el almacenamiento en refrigeración a 4 °C, con registros de 4.31 ± 0.02 , 4.08 ± 0.03 y 3.99 ± 0.02 , el día 1, 7 y 15, respectivamente.

Acidez titulable. La acidez titulable de los dos ingredientes fue aumentando a medida que trascurrió el tiempo de almacenamiento (Cuadro 18). Pero en base a que visualmente la viscosidad aumentó considerablemente, no fue posible medir la acidez titulable el día 21. Debido a que era imposible mezclar la bebida, como marca la técnica.

Por otra parte, el lactosuero mostró valores de acidez más altos ($P < 0.05$) que la bebida de avena durante los 14 días de almacenamiento. El lactosuero tuvo valores de 0.11 ± 0.001 , 0.12 ± 0.002 y $0.31 \pm 0.002\%$, los días 1, 7 y 14, respectivamente; y no hubo diferencia entre los primeros dos monitoreos, pero sí ($P < 0.05$) de estos dos con el día 14. Sakhale *et al.* (2012) reportaron un valor similar de acidez en lactosuero el día 1 con 0.18%. Mientras que Chatterjee *et al.* (2015) encontraron valores de $0.193 \pm 0.041 \%$ el día 1 de monitoreo. Güler-Akın *et al.* (2016) formularon un yogurt con fibra de avena e inulina y analizaron la

leche que emplearon como materia prima, ésta tuvo una acidez mayor a la del lactosuero de esta investigación el día 1 y 7 de almacenamiento, con un valor de $0.18 \pm 0.01\%$.

Se detectó diferencia estadística ($P < 0.05$) en la acidez titulable de la bebida de avena durante el almacenamiento y ésta fue aumentando conforme trascurrieron los días. Los porcentajes de acidez fueron 0.06 ± 0.001 , 0.07 ± 0.005 y 0.08 ± 0.002 el día 1, 7 y 14, respectivamente. Valores similares se presentaron en el estudio de Salmerón *et al.* (2015) durante la fermentación a 37°C por 10 h, de avena con *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus reuteri*, por separado. Estos fueron 0.07 ± 0.02 , 0.05 ± 0.01 y $0.04 \pm 0.01\%$, respectivamente.

En su estudio, Güler-Akın *et al.* (2016) no encontraron diferencia ($P > 0.01$) en la acidez de un yogurt con 2% p/v de fibra de avena, el día 1 y 7 de almacenamiento con 0.576 ± 0.004 y $0.584 \pm 0.006\%$, respectivamente. Pero sí una disminución significativa ($P < 0.01$) a partir del día 14 con $0.625 \pm 0.001\%$. Tsetsegmaa y Tsetsegee (2016) de igual forma, encontraron en una bebida de avena fermentada, que la acidez aumentó durante el paso del tiempo en refrigeración. Los valores observados fueron 0.36, 0.38, 0.41 y 0.44 los días 0, 7, 14 y 21.

Actividad antioxidante La actividad antioxidante del lactosuero y de la bebida de avena dependió del tiempo de almacenamiento (Cuadro 18). Al comparar estos dos ingredientes, los días 1 y 7, el lactosuero tuvo mayor ($P < 0.05$) actividad con 4.47 ± 0.016 y 6.89 ± 0.033 mM equivalente Trolox/mL (95.61 ± 0.286 y $99.57 \pm 0.016\%$) respectivamente, contra 3.56 ± 0.003 y $6.32 \pm$

0.007 mM equivalente Trolox/mL (79.58 ± 0.053 y $90.21 \pm 0.108\%$) de la bebida de avena. Pero el día 14, la bebida de avena fue más antioxidante con 6.44 ± 0.005 mM equivalente Trolox/mL ($90.01 \pm 0.074\%$) que el lactosuero con 3.94 ± 0.050 mM equivalente Trolox/mL ($53.94 \pm 0.766\%$).

La capacidad del lactosuero para neutralizar radicales libres fue fluctuante y diferente estadísticamente ($P < 0.05$) durante los 14 días de almacenamiento. Inició con 4.47 ± 0.016 mM equivalente Trolox/mL ($95.61 \pm 0.286\%$), aumentó el día 7 a 6.89 ± 0.033 mM equivalente Trolox/mL ($99.57 \pm 0.016\%$) y bajó a 3.94 ± 0.050 mM equivalente Trolox/mL ($53.94 \pm 0.766\%$) el día 14.

Estos resultados indican que la actividad antioxidante del lactosuero es variable durante el almacenamiento. Arranz *et al.* (2019) también encontraron un comportamiento variable en la actividad antioxidante en una bebida pasteurizada de aislado de proteína de lactosuero. Registraron ~16% de inhibición al inicio del almacenamiento, seguido de ~10% a las dos semanas y ~16% a las 4 semanas. Por otro lado, Shah *et al.* (2016) en una bebida simbiótica (*Lactobacillus helveticus* e inulina) de lactosuero, reportaron que la inhibición de ABTS disminuyó de 44.42% el día 7 a 38.95% el día 14 de almacenamiento a 4 °C. Al igual que Sady *et al.* (2013) quienes encontraron que después de 12 meses la actividad antioxidante de una bebida de lactosuero con naranja bajó de 18.5 a 7.9 μm equivalente Trolox/mL. Adicionalmente, reportes previos han demostrado que la actividad antioxidante de quesos en los que se agregó proteína de lactosuero, disminuye hasta un 63% durante el almacenamiento del queso por 30 días, siendo la actividad máxima durante los primeros 10 días (Bierzuńska *et al.*, 2017). Los resultados de estos autores apoyan las observaciones del presente

estudio. Además, se ha demostrado que factores tales como el procesado, empaquetado, condiciones y tiempo del almacenamiento tienen un efecto pronunciado en los antioxidantes naturales relacionados con los productos lácteos (Zygoura *et al.*, 2004).

Aunque el tipo de lactosuero, tratamiento aplicado, metodología de evaluación y forma de reportar hace complicada la comparación. Dryáková *et al.* (2010), encontraron una actividad menor a la del presente estudio el día 1. Esta fue de 19.8% y aumentó a 54% con 180 min de hidrólisis con alcalasa en concentrado de proteína de lactosuero. Mann *et al.* (2015) observaron 1.42 μM Trolox/mg en péptidos de concentrado de proteína de lactosuero, mientras que Önay-Uçaret *et al.* (2014) reportaron 0.350 μM Trolox/mg en aislado de proteína de lactosuero. Cao y Xiong (2017) reportaron una actividad similar a la del día 1 y 14 de almacenamiento del actual estudio, con ~ 4.5 y 4.0 mM equivalente Trolox, al hidrolizar aislado de proteína de lactosuero con pancreatina durante 2 y 1 h, respectivamente. Kumar *et al.* (2020a) observaron un $74.45 \pm 0.42\%$ de neutralización del radical DPPH durante el almacenamiento a 4 °C, en una bebida simbiótica de leche, avena, mijo y *L. acidophilus*.

La actividad antioxidante del lactosuero proviene principalmente de las proteínas séricas como la α -lactoalbúmina (Zulueta *et al.*, 2009), β -lactoglobulina, lactoferrina e inmunoglobulinas (Wakabayashi *et al.*, 2006). Además, se ha reportado que péptidos como INYW, LDQW, VGINYWLAHK, VEELKPT, entre otros, de dichas proteínas inhiben el radical ABTS. Pero la actividad antioxidante se reportó como IC_{50} , por lo que no serán comparados con el presente estudio (Sadat *et al.*, 2011; Folmer Correa *et al.*, 2014; Mann *et al.*, 2014).

En cuanto a la actividad antioxidante de la bebida de avena, ésta aumentó ($P < 0.05$) durante el almacenamiento con valores de 3.56 ± 0.003 , 6.32 ± 0.007 mM y 6.44 ± 0.005 mM equivalente Trolox/mL (79.58 ± 0.053 , 90.21 ± 0.108 y $92.01 \pm 0.074\%$) el día 1, 7 y 14, respectivamente. Probablemente debido a la acción de microorganismos presentes. Tal como lo reportan Chen *et al.* (2020), que la capacidad para captar radicales ABTS en avena, aumentó con la fermentación. Con esto, estos autores indicaron que el cambio en la actividad antioxidante de fracciones fenólicas está estrechamente relacionado con la modificación estructural causada por enzimas microbianas.

Se ha encontrado que la actividad antioxidante de extractos de avena es debida en gran parte a los polifenoles totales, integrados principalmente por las avenantramidas (Bratt *et al.*, 2003; Brindzová *et al.*, 2008). Además de las avenantramidas, la avena contiene otros polifenoles como la vainillina, el ácido clorogénico y el ácido ferúlico. Los polifenoles totales en avena están presentes en una cantidad de 100 a 150 mg/100 g y las avenantramidas en 4 a 72 mg/100 g, dependiendo de la variedad (Tong *et al.*, 2014). Por otra parte, Nakurte *et al.* (2013) encontraron que la avena posee un péptido con capacidad antioxidante, denominado lunasina y tiene un porcentaje de inhibición del radical DPPH de 17%.

Actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (AIECA). Los resultados de la AIECA del lactosuero y de la bebida de avena (Cuadro 18) muestran que, al inicio del almacenamiento, fueron estadísticamente iguales ($P > 0.05$). Pero durante el resto del almacenamiento (día 7 y 14) el lactosuero presentó mayor ($P < 0.05$) capacidad de inhibir la ECA que la bebida

de avena. En el lactosuero no hubo influencia del tiempo de almacenamiento por lo que la AIECA fue igual ($P>0.05$). Los porcentajes de inhibición fueron 72.92 ± 3.994 , 68.39 ± 1.699 y 77.45 ± 2.247 el día 1, 7 y 14, respectivamente. Esto pudo ser debido a que al no ser la bebida un producto estéril, los microorganismos presentes, pudieron haber descompuesto los compuestos con actividad sobre la ECA, dando lugar a la formación de otros con menor capacidad AIECA. Sin embargo, al continuar con el metabolismo durante la fermentación algunos compuestos se derivaron en otros de menor tamaño y con mayor actividad ECA. Así como lo propusieron Shu *et al.* (2020) durante el almacenamiento a 4 °C de kéfir con leche de cabra, durante 14 días. Estos autores reportaron porcentajes de AIECA de 82.1%, 84.1% y 82.9%, el día 1, 7 y 14, respectivamente.

Se ha reportado que la AIECA del lactosuero es debida principalmente a las proteínas y sus péptidos. Las fracciones peptídicas de 3 a <1000 Da presentan actividad contra la ECA (O'Loughlin *et al.*, 2014; Cheung *et al.*, 2015). Chobert *et al.* (2005) encontraron que el péptido IIVTQTMK, obtenido de la hidrólisis de lactosuero ovino presentó un porcentaje de inhibición de la ECA de 70.8, que es similar al obtenido en el presente estudio el día 1 de almacenamiento. Igual que en el presente estudio, Lim *et al.* (2011) tampoco observaron cambio en la AIECA entre el día 1 y el día 7 de almacenamiento a 4 °C, en un yogurt adicionado con 5 mg/mL de hidrolizado de proteína de lactosuero, con un porcentaje de ~64%.

Los valores de AIECA del presente estudio, fueron mayores a los reportados por Ibrahim *et al.* (2017) con 20% de AIECA en lactosuero obtenido con leche de cabra; y a los de Mazorra-Manzano *et al.* (2020) con 22% en

lactosuero de queso fresco. Por otro lado, fueron similares al observado por Chobert *et al.* (2005) que fue de 70.8% en el péptido IIVTQTMK de la β -lactoglobulina de lactosuero ovino. Se ha comprobado que los péptidos IIAE y LIVTQ de la β -lactoglobulina tienen AIECA (IC_{50}) de 128 y 113 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Welderufael *et al.*, 2012), e interactúan con los mismos residuos de aminoácidos de la ECA que lisinopril y el enalapril, que son fármacos recetados para inhibir la ECA. El péptido IIAE se enlaza con el residuo Asp de la posición 140 al igual que el lisinopril y el péptido LIVTQ con el residuo Ala de la posición 332, al igual que lo hacen el lisinopril y el enalapril.

En cuanto a la AIECA de la bebida de avena, fue fluctuante y la mayor inhibición y sin diferencia ($P>0.05$) fue los días 1 y 14 con $63.83 \pm 3.134\%$ y $64.52 \pm 1.550\%$, respectivamente. En tanto que el día 7 tuvo significativamente ($P<0.05$) menor poder de inhibir la enzima convertidora de angiotensina con un porcentaje de 55.25 ± 0.971 . Zheng *et al.* (2020) encontraron que 1 mg/mL de hidrolizado de globulina de avena, presentó una AIECA de $48.18 \pm 3.57\%$. De este hidrolizado, se obtuvo el péptido SSYYPFK con un IC_{50} de 91.82 μM . Y reportan que el mecanismo de acción fue a través de inhibición competitiva en el sitio S1 de la ECA vía puentes de hidrógeno, que es un mecanismo similar al ejercido por el captopril. También, reportaron que este péptido, en una concentración de 100 a 150 mg/kg de peso corporal disminuyó ($P<0.05$) la presión sistólica y diastólica de ratas hipertensas y suprimió la actividad de la renina y la endotelina-1 un 47.59 y 27.88% a 1.5 mg/mL, respectivamente.

Cheung *et al.* (2009) hidrolizaron 30mg/mL de aislado de proteína de avena con una relación 0.1% enzima/sustrato, usando termolisina por 3 h a pH

de 8.0 y 70 °C. Reportaron una AIECA de ~70%. Por lo que al comparar el valor que estos autores obtuvieron y el observado en el día 1 de la bebida de avena, se puede inferir que probablemente el tratamiento empleado para elaborar la bebida de avena genera una AIECA similar a la hidrólisis enzimática de aislado de proteína de avena.

Bleakley *et al.* (2017) mediante un análisis *in silico* reportaron una AIECA de 96.5 a 86.5% en 1 mg de extracto seco/mL de aislado de proteína de avena de siete variedades diferentes. Cabe mencionar que se ha reportado que existe poca literatura sobre la actividad antihipertensiva de péptidos de avena (Zheng *et al.*, 2020).

Vida de Anaquel de Bebidas Funcionales de Lactosuero-Avena

Para definir la vida de anaquel de las bebidas de lactosuero-avena, se determinó el pH y la acidez titulable, en base a que el pH tiene impacto directo en la inocuidad del producto y la acidez en la percepción sensorial. Mientras que la acidez titulable se refiere al contenido de ácido total y predice mejor el impacto en la percepción sensorial de la acidez que el pH (Sadler y Murphy, 2010).

La bebida de lactosuero-avena fue aceptable hasta el día 14 de almacenamiento a 4 °C, en base al pH, acidez titulable y apariencia. Cabe mencionar que se planeó medir estos parámetros durante 21 días, pero no fue posible determinar la acidez titulable el día 21 debido a alta viscosidad y apariencia “gelatinosa” detectadas visualmente en todas las bebidas, además del olor desagradable típico de descomposición por causa microbial. Por lo que probablemente la presencia de microorganismos fue la causa de la disminución del pH como del aumento de la acidez titulable. Chatterjee *et al.* (2015)

formularon una bebida de lactosuero, jugo de naranja y 0.1% p/v del estabilizador alginato de sodio. Reportaron una vida de anaquel en refrigeración de 49 días, pero ésta aumentó a 3 meses al adicionar 150 ppm del conservador benzoato de sodio. La acidez titulable de bebidas de lactosuero-avena se muestra en el Cuadro 19. En el día 1 de refrigeración no hubo efecto de la cantidad de inulina ($P=1.00$), el tiempo de ultrasonido ($P=0.45$) ni de la interacción de estos factores ($P=0.45$). Todas las bebidas tuvieron la misma acidez de $0.11 \pm 0.001\%$.

El día 7, la inulina y el ultrasonido tuvieron influencia estadística ($P=0.001$) pero la interacción de estos factores no ($P=0.05$). La bebida más ácida y diferente ($P<0.05$) a las demás fue LSA/1/3 con $0.12 \pm 0.003\%$. Las demás bebidas fueron iguales ($P>0.05$) con $0.11 \pm 0.001\%$.

Finalmente, en el día 14, se pudo observar el efecto estadístico ($P<0.05$) del ultrasonido, la inulina y la interacción de éstos. Todas las bebidas tuvieron acidez diferente ($P<0.05$), y se puede decir que el nivel de acidez fue proporcional a la cantidad de inulina en primera instancia y posteriormente al tiempo de ultrasonido. De tal forma que la bebida más ácida fue LSA/2/15 con 0.28 ± 0.001 , seguida de LSA/2/3 con 0.26 ± 0.001 , posteriormente LSA/1/15 con 0.251 ± 0.002 y por último $0.21 \pm 0.002\%$ en LSA/1/3. Probablemente el efecto de las variables fue evidente hasta el día 14 porque previo a esto no existía un notable desarrollo de microorganismos. En base a que las bebidas no se sometieron a ningún tratamiento tradicional de conservación, ni se usó temperatura durante la sonicación. Además de que no se elaboraron en condiciones estériles sino sólo con medidas de inocuidad.

Cuadro 19. Efecto de la aplicación de ultrasonido y la adición de inulina en la acidez titulable y pH de bebidas funcionales de lactosuero-avena durante el almacenamiento a 4 °C (media ± E. E.)

Bebida ¹	Acidez titulable ² (%)			pH			
	Día 1	Día 7	Día 14	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21
LSA/1/3	0.11 ± 0.001 ^{Ca}	0.12 ± 0.003 ^{Ba}	0.21 ± 0.002 ^{Ad}	6.33 ± 0.004 ^{Aa}	5.77 ± 0.008 ^{Bd}	5.41 ± 0.008 ^{Cb}	3.96 ± 0.003 ^{Dd}
LSA/2/3	0.11 ± 0.001 ^{Ba}	0.11 ± 0.001 ^{Bb}	0.26 ± 0.001 ^{Ab}	6.28 ± 0.001 ^{Ab}	5.87 ± 0.009 ^{Bc}	4.97 ± 0.003 ^{Cc}	3.98 ± 0.001 ^{Dc}
LSA/1/15	0.11 ± 0.001 ^{Ba}	0.11 ± 0.001 ^{Bb}	0.25 ± 0.001 ^{Ac}	6.29 ± 0.005 ^{Ab}	5.90 ± 0.002 ^{Bb}	5.44 ± 0.005 ^{Ca}	4.21 ± 0.004 ^{Db}
LSA/2/15	0.11 ± 0.001 ^{Ba}	0.11 ± 0.001 ^{Bb}	0.28 ± 0.001 ^{Aa}	6.25 ± 0.001 ^{Ac}	6.04 ± 0.003 ^{Ba}	4.72 ± 0.002 ^{Cd}	4.46 ± 0.001 ^{Da}

¹ Bebidas de lactosuero-avena (LSA). LSA/1/3 = 1% p/v de inulina y 3 min de ultrasonido; LSA/2/3 = 2% p/v de inulina y 3 min de ultrasonido; LSA/1/15 = 1% p/v de inulina y 15 min de ultrasonido; LSA/2/15 = 2% p/v de inulina y 15 min de ultrasonido.

² Expresada como porcentaje de la concentración de ácido láctico.

Ultrasonido = 24 kHz y 23 W.

A, B, C Medias con literales mayúsculas en la misma fila de cada variable indican diferencia significativa (P<0.05) entre los días de almacenamiento.

a, b, c, d Medias con literales minúsculas en la misma columna indican diferencia significativa (P<0.05) entre las bebidas

En cuanto a la inulina, tal vez se presentó mayor acidez conforme aumentaba la cantidad, porque este es un polisacárido compuesto por fructosa que es fuente de carbono (Ahmed y Rashid, 2017). Aghbashlo *et al.* (2016) reportaron que el hongo *Mucor indicus* es capaz de asimilar de igual forma la glucosa que la fructosa, pero es necesario el desarrollo de enzimas para poder obtener dicho azúcar. Por lo que también puede haber sido mejor la aplicación de 15 min de ultrasonido que quizás hidrolizó mejor la inulina que cuando se aplicaron 3 min.

Güler-Akın *et al.* (2016), observaron en un yogurt probiótico de durazno con inulina y β -glucano de avena, la viscosidad aumentó ($P < 0.01$) durante 21 días de almacenamiento a 4 °C. También Sahan *et al.* (2008) agregaron β -glucano de avena a un yogurt y mostraron que la viscosidad aumentó ($P < 0.05$) por la adición de esta fibra y por el tiempo de almacenamiento durante 15 días a 4 °C. Similar a los resultados del presente estudio, Martini y Walsh (2012) reportaron que suspensiones de lactosuero ultrasonicadas a 15 W por 15 min a 60 °C tuvieron mayor viscosidad que aquellas en las que no se aplicó ningún tratamiento. Adicionalmente Krešić *et al.* (2008) reportaron un aumento en la viscosidad de lactosuero ultrasonicado (20 kHz, 43-48 W/cm²) por 15 min. Se lo atribuyeron al aumento en la capacidad para enlazar moléculas de agua. Otros autores relacionan la viscosidad de las bebidas con la presencia de microorganismos. Cassani *et al.* (2017) reportaron que en jugos de fresa almacenados durante 14 días a 5 °C, formulados con diferentes proporciones de inulina:oligofructosa y tiempos ultrasonido (40 kHz y 180 W): 1:1 con 0 min, 1:1 con 30 min y 1:3 con 15 min, respectivamente, el conteo de hongos y levaduras

alcanzó un nivel de 8 Log UFC/mL y el género *Enterobacteriaceae* y coliformes totales se mantuvo en 5 Log UFC/mL. Sin embargo, estos autores no reportaron valores de acidez. Al igual que en la investigación de estos autores, en las bebidas formuladas en el presente estudio, pudieron estar presentes microorganismos causantes del deterioro y así aumentar la viscosidad de las bebidas.

Por otra parte, Güler-Akın *et al.* (2016) en una bebida de lactosuero, avena e inulina, no encontraron diferencia ($P > 0.01$) en la acidez titulable, al adicionar 1 o 2% p/v. Pero al igual que en la presente investigación, sí observaron diferencia entre los días de refrigeración 1, 7 y 14. Los valores de acidez que reportaron fueron de 0.554 ± 0.004 , 0.585 ± 0.005 y $0.674 \pm 0.004\%$, respectivamente en la formulación con 1% p/v de inulina. Y 0.564 ± 0.002 , 0.592 ± 0.008 y $0.678 \pm 0.002\%$, respectivamente en la formulación con 2% p/v de inulina.

En tanto que Sakhale *et al.* (2012) reportaron que el porcentaje de acidez de una bebida de lactosuero y mango, no varió mucho durante 30 días a 4 °C con un valor de 0.35% en promedio, pero encontraron conteos de hongos y levaduras y de conteo total en placa de 3 a 20 UFC/mL y de 2 a 2.5×10^4 UFC/mL, respectivamente. De igual forma, Chatterjee *et al.* (2015) reportaron a los 14 días de almacenamiento a 7 °C, una acidez de 0.118% en una bebida pasteurizada de lactosuero con naranja, alginato de sodio como estabilizador y benzoato de sodio como conservador. Además de un conteo de hongos y levaduras de 18 UFC/mL.

En el presente estudio no existió diferencia en la acidez de las bebidas por la aplicación de 3 o 15 min de ultrasonido el día 1 del almacenamiento.

Resultados similares son los observados por Aadil *et al.* (2013) quienes tampoco encontraron cambios en la acidez de jugo de uva al aplicar ultrasonido (28 kHz) a 20 °C por 0, 30, 60 o 90 min, obteniendo un valor de acidez de $0.16 \pm 0.01\%$. De igual manera, Abid *et al.* (2013) no encontraron cambios en la acidez titulable de jugo de manzana con ultrasonido (25 kHz a 20°C) por 0, 30, 60 o 90 min, registrando una acidez de 0.19 ± 0.01 , 0.20 ± 0.01 , 0.21 ± 0.01 y $0.21 \pm 0.02\%$, respectivamente.

En el pH, se observó efecto de la cantidad de inulina ($P < 0.001$), tiempo de ultrasonido ($P < 0.001$) y la interacción de éstos ($P < 0.05$), durante los 21 de almacenamiento a 4 °C. En el día 1, la formulación con el mayor pH ($P < 0.05$) fue la de LSA/1/3 con 6.33 ± 0.004 , seguida de las formulaciones LSA/1/15 y LSA/2/3 con 6.29 ± 0.005 y 6.28 ± 0.001 , respectivamente y sin diferencia entre ellas ($P > 0.05$) y la de menor pH fue la bebida LSA/2/15 con 6.25 ± 0.001 . El día 7, todas las bebidas fueron diferentes entre sí ($P < 0.05$). A pesar de que el pH sí se pudo medir el día 21, los valores estuvieron en un rango de 3.96 a 4.46 y se ha reportado que la producción de ácido define las características de calidad y la vida útil de un producto; por ejemplo, en bebidas fermentadas el pH mínimo para garantizar un sabor ligero es de 4.6 (Thamer y Penna, 2005).

Güler-Akın *et al.* (2016) también reportaron diferente ($P < 0.01$) pH en una bebida de lactosuero, avena, puré de durazno, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* BB-12 y 2% p/v de inulina. Con registros de 4.46 ± 0.007 , 4.32 ± 0.028 , 4.24 ± 0.028 y 4.15 ± 0.042 durante el almacenamiento a 4 °C, el día 1, 7, 14 y 21, respectivamente. Souza *et al.* (2019) reportaron un pH de 5.7 ± 0.01 en una bebida de lactosuero, fresa y prebióticos,

que es similar al observado en las bebidas de esta investigación el día 7. Kumar *et al.* (2017) reportaron valores de pH en un rango de 3.80 a 4.75 en bebidas fermentadas a 37 °C por 16 h de lactosuero con diferentes niveles de inóculo de *L. casei* e inulina. Ramchandran y Shah (2010) también elaboraron yogurt con inulina y observaron valores de pH menores a los de la presente investigación los días 1, 7, 14 y 21 con 4.5, 4.38, 4.33 y 4.52, respectivamente.

Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante de las bebidas durante almacenamiento, fue influenciada por la cantidad de inulina ($P < 0.05$), el tiempo de aplicación de ultrasonido ($P < 0.05$) y la interacción de estas dos variables ($P = 0.001$) (Cuadro 20). La bebida LSA/1/15 presentó la mayor actividad todo el almacenamiento. El día 1 con 3.68 ± 0.045 mM equivalente Trolox/mL ($81.70 \pm 0.782\%$), seguida de LSA/1/3 con 3.43 ± 0.028 mM equivalente Trolox/mL ($77.36 \pm 0.486\%$) y por último las bebidas LSA/2/15 y LSA/2/13 con 3.16 ± 0.020 y 3.11 ± 0.004 mM equivalente Trolox/mL (72.64 ± 0.355 y $71.75 \pm 0.077\%$), respectivamente y sin diferencia ($P > 0.05$) entre ellas. Al parecer, en la adición de 2% p/v de inulina no tuvo efecto el tiempo de ultrasonido en la actividad antioxidante. Al día 7, la bebida LSA/1/15 tuvo 6.05 ± 0.003 mM equivalente Trolox/mL ($86.05 \pm 0.044\%$), seguida por LSA/2/3 con un valor de 6.00 ± 0.007 mM equivalente Trolox/mL ($85.29 \pm 0.109\%$) y por último las bebidas LSA/1/3 y LSA/2/15 con 5.98 ± 0.008 y 5.98 ± 0.001 mM equivalente Trolox/mL (84.96 ± 0.115 y $84.96 \pm 0.016\%$) ambas.

Cuadro 20. Efecto de la aplicación de ultrasonido y la adición de inulina en la actividad antioxidante de bebidas funcionales de lactosuero-avena durante el almacenamiento a 4 °C (media ± E. E.)

Tratamiento ¹	Actividad antioxidante ² (mM equivalente Trolox/mL)			Actividad antioxidante (%)		
	Día 1	Día 7	Día 14	Día 1	Día 7	Día 14
	LSA/1/3	3.43 ± 0.028 ^{Cb}	5.98 ± 0.008 ^{Bc}	6.15 ± 0.027 ^{Ab}	77.36 ± 0.486 ^{Cb}	84.96 ± 0.115 ^{Bc}
LSA/2/3	3.11 ± 0.004 ^{Cc}	6.00 ± 0.007 ^{Ab}	4.57 ± 0.028 ^{Bc}	71.75 ± 0.077 ^{Cc}	85.29 ± 0.109 ^{Ab}	63.33 ± 0.146 ^{Bc}
LSA/1/15	3.68 ± 0.045 ^{Ca}	6.05 ± 0.003 ^{Ba}	6.52 ± 0.026 ^{Aa}	81.70 ± 0.782 ^{Ca}	86.05 ± 0.044 ^{Ba}	93.24 ± 0.399 ^{Aa}
LSA/2/15	3.16 ± 0.020 ^{Cc}	5.98 ± 0.001 ^{Ac}	4.58 ± 0.006 ^{Bc}	72.64 ± 0.355 ^{Cc}	84.96 ± 0.016 ^{Ac}	63.65 ± 0.096 ^{Bc}

¹ Bebidas de lactosuero-avena (LSA). LSA/1/3 = 1% de inulina y 3 min de ultrasonido; LSA/2/3 = 2% de inulina y 3 min de ultrasonido; LSA/1/15 = 1% de inulina y 15 min de ultrasonido; LSA/2/15 = 2% de inulina y 15 min de ultrasonido.

² Medida con la técnica del radical ABTS.

Ultrasonido = 24 kHz y 23 W.

^{A, B, C} Medias con literal mayúscula en la misma fila de cada forma de reportar (mM equivalente Trolox/mL o porcentaje) indican diferencia significativa (P<0.05) entre los días de almacenamiento.

^{a, b, c} Medias con literal minúscula en la misma columna indican diferencia significativa (P<0.05) entre tratamiento.

El día 14, la formulación LSA/1/15 6.52 ± 0.026 mM equivalente Trolox/mL ($93.24 \pm 0.399\%$), la bebida LSA/1/3 con 6.15 ± 0.027 mM equivalente Trolox/mL ($87.55 \pm 0.416\%$) y con menor actividad antioxidante y sin diferencia entre ellas ($P > 0.05$) las formulaciones LSA/2/15 y LSA/2/13 con 4.58 ± 0.006 mM equivalente Trolox/mL ($63.65 \pm 0.096\%$) y 4.57 ± 0.028 mM equivalente Trolox/mL ($63.33 \pm 0.146\%$) respectivamente.

Un porcentaje similar al máximo obtenido en este estudio, observaron Bei *et al.* (2020) durante la fermentación de avena durante a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 14 días, con la levadura *Monascus anka* GIM 3.592. Reportaron que la capacidad de fracciones fenólicas para captar radicales ABTS fue de 93%, con $28\text{ }\mu\text{g/mL}$ de la fracción soluble y $18\text{ }\mu\text{g/mL}$ de la fracción insoluble.

La tendencia en la actividad antioxidante cuando se adicionó 1% p/v de inulina fue en aumento ($P < 0.05$) durante todo el almacenamiento de 14 días. El mismo comportamiento encontraron Madhu *et al.* (2012) en yogurts simbióticos con *Lactobacillus plantarum* CFR 2194, *Lactobacillus fermentum* CFR 2192 y 1% p/v de fructooligosacáridos. Los registros de actividad antioxidante fueron 82.7%, 85.4% y 86.2% los días 1, 7 y 14 de almacenamiento a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estos autores se lo atribuyeron a la actividad fermentativa de los probióticos. Aunque Kumar *et al.* (2020b) encontraron que la actividad para inhibir el radical DPPH, disminuyó durante el almacenamiento de una bebida funcional de leche, avena y mijo.

Por otro lado, en el presente estudio, cuando se usó 2% p/v de inulina, el comportamiento de la capacidad para inhibir radicales libres fue fluctuante. Presentó un aumento el día 7 y una disminución el día 14. Shakerian *et al.* (2015) encontraron en yogurt probiótico que con la adición de 1% p/p de inulina se afectó

negativamente la hidrólisis, a comparación de cuando no se adicionó. Lo que probablemente sucedió en esta investigación fue que a 2% p/v de inulina, disminuyó la hidrólisis por parte de los microorganismos presentes e hizo que la actividad antioxidante disminuyera al día 14. También se ha encontrado que los polifenoles disminuyen con el almacenamiento, debido tal vez a la pérdida de grupos reactivos hidroxilo (Kumar *et al.*, 2020a). Zaho *et al.* (2020) evaluaron diferentes tiempos de ultrasonido (40 kHz y 122-126 W/cm²) durante 0, 10, 20, 30 o 40 min en suero de tofu y al igual que en la presente investigación, reportaron que la actividad antioxidante fue mejor ($P < 0.05$) cuando aplicó el mayor tiempo de ultrasonido. Este fue de 40 min, con una actividad de 0.7485 $\mu\text{mol Trolox/mL}$, determinada con la técnica DPPH.

El aumento en la actividad antioxidante a mayor tiempo de ultrasonido, probablemente se deba a la ruptura de enlaces proteína-polifenoles que se pudieron haber formado en las bebidas, en base a que los polifenoles tienen afinidad por moléculas proteicas ricas en prolina (Tong *et al.*, 2000). Por lo que a 15 min de ultrasonido se pueden haber liberado estos compuestos y generado mayor actividad antioxidante ($P < 0.05$) que a 3 min de ultrasonido. Este argumento se apoya con lo observado por Chen *et al.* (2019) quienes mencionan que la aplicación de ultrasonido (40 kHz y 200 W) por 20 min, en aislado de proteína de lactosuero tuvo efecto sobre la estructura secundaria de las proteínas donde algunas regiones y aminoácidos hidrofóbicos como el triptófano quedaron expuestos en la superficie de la proteína. En este sentido, se ha encontrado que los péptidos antioxidantes están compuestos por 5 a 11 aminoácidos hidrofóbicos como prolina, histidina, tirosina y triptófano (Pihlanto, 2006). A su vez, Liu *et al.*

(2019) encontraron que, con la aplicación de ultrasonido (20 kHz y 110 W/cm²) durante 60 min, a comparación de 0, 15, 30 o 45 min, obtuvieron la mayor (P<0.05) capacidad antioxidante en aislado e hidrolizado de proteína de lactosuero. Los valores registrados fueron de 44.85% y 51.71%, respectivamente. Además, fueron significativamente (P<0.05) más altos que cuando se usó un tratamiento térmico, que generó una AIECA de 38.97% y 43.16%, respectivamente.

En cuanto a bebidas de lactosuero sin ultrasonido, Gad *et al.* (2013) formularon una bebida de lactosuero con mango en polvo, azúcar, aceite de linaza y pectina. Encontraron una actividad antioxidante menor a la de esta investigación con 0.00885 mM equivalente Trolox/mL.

Finalmente, la combinación de lácteos con inulina genera buena actividad antioxidante, de tal forma que Jiménez *et al.* (2008) determinaron la actividad antioxidante de algunas bebidas comerciales e ingredientes. Encontraron que el yogurt bajo en calorías y con inulina tuvo un valor de 13.27 ± 0.01 μm equivalente Trolox y fue más antioxidante que la leche fermentada, la leche enriquecida con vitamina E, la pulpa de limón y la pectina, con valores de 10.96 ± 0.01 , 12.67 ± 0.02 , 1.99 ± 0.01 y 0.63 ± 0.01 μm equivalente Trolox.

Actividad Inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina (AIECA)

En general, la AIECA de las bebidas de lactosuero-avena con ultrasonido e inulina disminuyó al día 7 y aumentó el día 14 de almacenamiento (Cuadro 21).

Al inicio, la AEICA fue influenciada por el tiempo de ultrasonido (P=0.05) y la interacción de este con la cantidad de inulina (P=0.01), pero el porcentaje de inulina por sí solo no tuvo efecto (P=0.41).

Cuadro 21. Efecto del tiempo de ultrasonido y la adición de inulina en la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina de bebidas funcionales de lactosuero-avena durante el almacenamiento a 4 °C (media ± E. E.)

Tratamiento ¹	Actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (%)		
	Día 1	Día 7	Día 14
LSA/1/3	64.61 ± 2.46 ^{Bb}	63.53 ± 1.09 ^{Bab}	72.52 ± 1.28 ^{Ab}
LSA/2/3	71.24 ± 1.89 ^{Aab}	59.44 ± 1.01 ^{Bb}	71.69 ± 0.95 ^{Ab}
LSA/1/15	73.57 ± 1.07 ^{Ba}	68.05 ± 1.63 ^{Ca}	79.63 ± 0.89 ^{Aa}
LSA/2/15	70.03 ± 1.76 ^{Aab}	60.73 ± 2.00 ^{Bb}	70.85 ± 0.80 ^{Ab}

¹ Bebidas de lactosuero-avena (LSA). LSA/1/3 = 1% de inulina y 3 min de ultrasonido; LSA/2/3 = 2% de inulina y 3 min de ultrasonido; LSA/1/15 = 1% de inulina y 15 min de ultrasonido; LSA/2/15 = 2% de inulina y 15 min de ultrasonido.

Ultrasonido = 24 kHz y 23 W.

^{A, B, C} Medias con literal mayúscula en la misma fila indican diferencia significativa (P<0.05) entre los días de almacenamiento.

^{a, b} Medias con literal minúscula en la misma columna indican diferencia significativa (P<0.05) entre tratamiento.

La bebida con más AIECA fue LSA/1/15 con $73.57\% \pm 1.07$ y solo fue diferente ($P < 0.05$) de la formulación LSA/1/3 con $64.61\% \pm 2.46$. Mientras que las bebidas iguales estadísticamente ($P > 0.05$) entre sí y con las demás, fueron LSA/2/3 con $71.24\% \pm 1.89$ y LSA/2/15 con $70.03\% \pm 1.76$. El día 7, el porcentaje de inulina ($P = 0.001$) y el tiempo de ultrasonido ($P = 0.06$) fueron significativamente relevantes, pero no la interacción ($P = 0.29$). Nuevamente la formulación LSA/1/15 mostró la más alta actividad contra la ECA con $68.05\% \pm 1.63$ y fue mejor ($P < 0.05$) que las bebidas que contenían más inulina. Con valores de $60.73 \pm 2.00\%$ y $59.44 \pm 1.01\%$, para LSA/2/15 y LSA/2/3, respectivamente. En tanto que la muestra LSA/1/3 fue igual ($P > 0.05$) a todas las demás con $63.53 \pm 1.09\%$. Finalmente, en el último día de monitoreo, tanto las variables independientes como la interacción tuvieron efecto estadístico ($P < 0.05$) sobre la AIECA. Y de igual manera que los demás días de almacenamiento, la bebida LSA/1/15 fue la que presentó mayor habilidad de inhibir la ECA con $79.63\% \pm 0.89$. Las otras formulaciones LSA/1/3, LSA/2/3 y LSA/2/15, tuvieron menos ($P < 0.05$) capacidad inhibitoria y no fueron diferentes entre sí. Los valores fueron con $72.52 \pm 1.28\%$, $71.69 \pm 0.95\%$ y $70.85 \pm 0.80\%$, respectivamente.

En general, las bebidas mostraron una disminución significativa ($P < 0.05$) de la AIECA el día 7 y un aumento al día 14. Pero en el caso de las bebidas con 2% p/v de inulina, el día 1 y 14 tuvieron una AIECA estadísticamente ($P > 0.05$) igual. Esto mismo sucedió en la investigación de Erkaya-Kotan (2020) en una bebida en yogurt adicionado con 1% p/v de fibra de naranja y sin ultrasonido. Con registros de IC_{50} de 105, 86 y 91 mg/mL, el día 1, 7 y 14 respectivamente. Mientras que lo que respecta a las formulaciones con 1% p/v de inulina, la AIECA

fue mayor y mejor ($P < 0.05$) el día 14 que el día 1. De igual manera, Erkaya-Kotan (2020) encontraron en un yogurt adicionado con 1.5% de fibra de naranja, valores de 48%, 49% y 54%, el día 1, 7 y 14 a 4 °C. Además, se ha observado que, en leche fermentada con bacterias ácido lácticas, la actividad proteolítica continúa durante el almacenamiento a 5 °C, por el aumento de AIECA (Nielsen *et al.*, 2009). Ramchandran y Shah (2010) en un yogurt bajo en grasa con la adición de *Streptococcus thermophilus*, observaron este mismo comportamiento. Estos autores se lo atribuyeron a la continua actividad proteolítica de los microorganismos, lo que modificó la concentración de péptidos y la capacidad de inhibir la ECA.

La razón por la cual la formulación LSA/1/15 presentó la mayor AIECA puede atribuirse a que el aumento de la energía acústica del ultrasonido aumentada por la amplitud y el tiempo de aplicación, puede romper aglomerados de proteína e incrementar el área superficial y generar más sitios reactivos (Ma *et al.*, 2018). A tal efecto, se ha encontrado que el ultrasonido acelera la hidrólisis enzimática, Madadlou *et al.* (2011) emplearon ultrasonido de 1.5 W y 4.5 μm para mejorar la generación de péptidos inhibidores de la ECA a partir de caseína, hidrolizada con proteasa de *A. oryzae*. Estos autores obtuvieron una inhibición máxima de la ECA ~58% con y sin sonicación, pero esta AIECA se alcanzó a los 30 min cuando se aplicó ultrasonido y a los 180 min cuándo no se aplicó.

De hecho, la aplicación de esta tecnología a (20 kHz y 40 W) por 210 min pulsado, 2 s encendido y 4 s apagado, como pre-tratamiento de la hidrólisis, aumentó la AIECA de péptidos de proteína de germen de trigo. El aumento fue de 20% en comparación con muestras sin ultrasonido (Jia *et al.*, 2010). También

Wang *et al.* (2015) reportaron que el ultrasonido (20 kHz a 750 W) durante 20 min, pulsado con 2 s encendido y 2 s apagado, como paso previo al hidrólisis de proteína de avena generó un aumento en la tasa de hidrólisis y de la AIECA en un 32.1 y 53.8%, respectivamente a comparación de las muestras sin la aplicación de ultrasonido. Adicionalmente Wu *et al.* (2018) encontraron que el ultrasonido en proteína de lactosuero, aumentó el grado de hidrólisis y la AIECA significativamente ($P < 0.05$) en comparación de las muestras donde no se aplicó. Aunque Fuglsang *et al.* (2003) observaron que no existe una relación lineal pero sí proporcional entre la AIECA *in vitro* y la proteólisis en el medio.

En el presente estudio, se observó que las bebidas de lactosuero-avena con baja cantidad de inulina (1% p/v) presentaron mejores resultados que con el nivel alto (2% p/v) de este ingrediente. De forma contraria, Ramchandran y Shah (2010) observaron que la AIECA en yogurts, fue mayor en presencia de inulina (3% p/v) que en ausencia de ésta. Balthazar *et al.* (2018) observaron que la adición de inulina en leche empleada para la formulación de helado, mejoró ($P < 0.05$) la AIECA generando una inhibición de 78.40%. Mientras que el control registró 18.55%. Contrariamente, Shakerian *et al.* (2015) reportaron que la adición de inulina (1% p/v) disminuyó el porcentaje de AIECA a comparación de los yogurts que no contenían este prebiótico (84% Vs. 98%). Estos autores creen que ese resultado se debió al aumento en la hidrólisis (por ser prebiótico), lo que pudo haber generado péptidos más pequeños con menor actividad sobre la ECA.

En un estudio se encontró que la longitud de péptidos lácteos con AIECA es de 2 a 6 aminoácidos, poseen hidrofobicidad y carga positiva (Pripp *et al.*, 2004; O'Loughlin *et al.*, 2014). Por otro lado, existe suficiente evidencia de que el

ultrasonido despliega la estructura de las proteínas y provoca la exposición de regiones y aminoácidos hidrofóbicos (Gülseren *et al.*, 2007; Jia *et al.*, 2010; Jambrak *et al.*, 2014). Asimismo, se ha mostrado que la cavitación del ultrasonido (28 kHz a 20W/L) durante 20 min, aumenta la hidrofobicidad superficial al exponer grupos hidrofóbicos internos y el contenido de grupos sulfhidrilo. Mientras que los puentes disulfuro disminuyen (Cui *et al.*, 2019). De hecho, se reportó un aumento del 43.7% en el contenido de grupos sulfhidrilo y de un 62.6% en la hidrofobicidad superficial de proteínas de lactosuero, además de una disminución y aumento significativos ($P < 0.05$) de la cantidad de α -hélice y láminas β , respectivamente (Wu *et al.*, 2018).

Cui *et al.* (2019) aplicaron ultrasonido (28 kHz y 20 W/L) durante 20 min en proteína de leche y reportaron un aumento de 22.87% en la AIECA con un valor de 67.20% en muestras sonicadas a comparación de las muestras sin tratamiento.

En un estudio reciente, Hussein *et al.* (2020) no usaron ultrasonido, pero analizaron la AIECA de concentrado de proteína de lactosuero hidrolizada con alcalasa y obtuvieron un 98.4% de inhibición, que es mayor que la AIECA máxima generada en la presente investigación con 79.63%. Cabe mencionar que en la actual investigación no se analizó el hidrolizado de la proteína concentrada, sino el extracto soluble de una bebida de lactosuero, avena e inulina.

Por otro lado, los valores de AIECA aquí presentados, son similares a los obtenidos en la investigación realizada por Mazorra-Manzano *et al.* (2020) en lactosuero fermentado con microbiota nativa a 35-42 °C por 120 h con valores del 60 al 70% de inhibición. A pesar de que se generaron valores similares de

AIECA, estos autores emplearon mucho más tiempo (120 h) a comparación del empleado en las bebidas de lactosuero-avena de este estudio (15 min), para llegar a dicha inhibición. Adicionalmente, se ha encontrado que extractos de proteína de avena (*Avena sativa*), presentaron una AIECA de $86.6 \pm 10.7\%$ a $96.5 \pm 25.8\%$, dependiendo la variedad de avena (Bleakley *et al.*, 2017).

Análisis Sensorial

Prueba de aceptabilidad. En la aceptación sensorial no tuvieron significancia estadística la apariencia ($P=0.47$), color ($P=0.87$), olor ($P=0.94$), sabor ($P=0.38$), viscosidad ($P=0.71$), regusto ($P=0.15$) y aceptación general ($P=0.15$). El único atributo sensorial en el que los panelistas detectaron diferencia ($P=0.006$) fue el dulzor (Cuadro 22). Las bebidas LSA/1/3 y LSA/2/15 fueron las más aceptadas y sólo fueron diferentes ($P<0.05$) de la bebida control. En las bebidas LSA/2/3 y LSA/1/15 no hubo diferencia ($P>0.05$) en la aceptación del dulzor entre ellas ni con las demás.

Cabe mencionar que la aceptación sensorial, se mide en escala de aceptación de un producto, pero los valores no tienen unidades.

En todos los atributos sensoriales, evaluados en las bebidas, estos valores fueron mayores a 3 por lo que se podría decir tuvieron “buena” aceptación por estar arriba de la media de la escala hedónica de 5 puntos. Entre los comentarios de los panelistas durante la evaluación sensorial se encuentran: Las bebidas tienen buen sabor; sí las compraría; les falta dulzor o sabor; buen sabor; les falta viscosidad; sabor muy dulce; mejorar el color; el sabor a avena me gusta; el sabor de todas me pareció delicioso; entre otros.

Cuadro 22. Efecto del tiempo de ultrasonido y la adición de inulina en la aceptación sensorial de bebidas funcionales de lactosuero-avena (media \pm E.E.)

Tratamiento ¹	Apariencia ²	Color ²	Olor ²	Sabor ²	Dulzor ²	Viscosidad ²	Regusto ²	Aceptación general ²
LSA/1/3	3.64 \pm 0.10 ^a	3.47 \pm 0.09 ^a	3.95 \pm 0.10 ^a	3.17 \pm 0.10 ^a	3.48 \pm 0.11 ^a	3.54 \pm 0.10 ^a	3.52 \pm 0.10 ^a	3.49 \pm 0.10 ^a
LSA/2/3	3.49 \pm 0.09 ^a	3.48 \pm 0.09 ^a	4.00 \pm 0.09 ^a	3.15 \pm 0.10 ^a	3.36 \pm 0.11 ^{ab}	3.55 \pm 0.09 ^a	3.53 \pm 0.09 ^a	3.62 \pm 0.09 ^a
LSA/1/15	3.63 \pm 0.09 ^a	3.49 \pm 0.10 ^a	3.97 \pm 0.09 ^a	3.15 \pm 0.10 ^a	3.19 \pm 0.10 ^{ab}	3.40 \pm 0.10 ^a	3.39 \pm 0.09 ^a	3.43 \pm 0.09 ^a
LSA/2/15	3.61 \pm 0.09 ^a	3.55 \pm 0.09 ^a	0.98 \pm 0.09 ^a	3.22 \pm 0.11 ^a	3.37 \pm 0.10 ^a	3.51 \pm 0.10 ^a	3.50 \pm 0.09 ^a	3.59 \pm 0.09 ^a
Control	3.72 \pm 0.09 ^a	3.59 \pm 0.09 ^a	4.06 \pm 0.09 ^a	2.94 \pm 0.10 ^a	2.97 \pm 0.11 ^b	3.43 \pm 0.10 ^a	3.24 \pm 0.09 ^a	3.31 \pm 0.09 ^a

¹ Bebidas de lactosuero-avena (LSA). LSA/1/3 = 1% p/v de inulina y 3 min de ultrasonido; LSA/2/3 = 2% p/v de inulina y 3 min de ultrasonido; LSA/1/15 = 1% p/v de inulina y 15 min de ultrasonido; LSA/2/15 = 2% p/v de inulina y 15 min de ultrasonido. Control = Bebida de lactosuero-avena pasteurizada a 65°C por 30 min sin inulina.

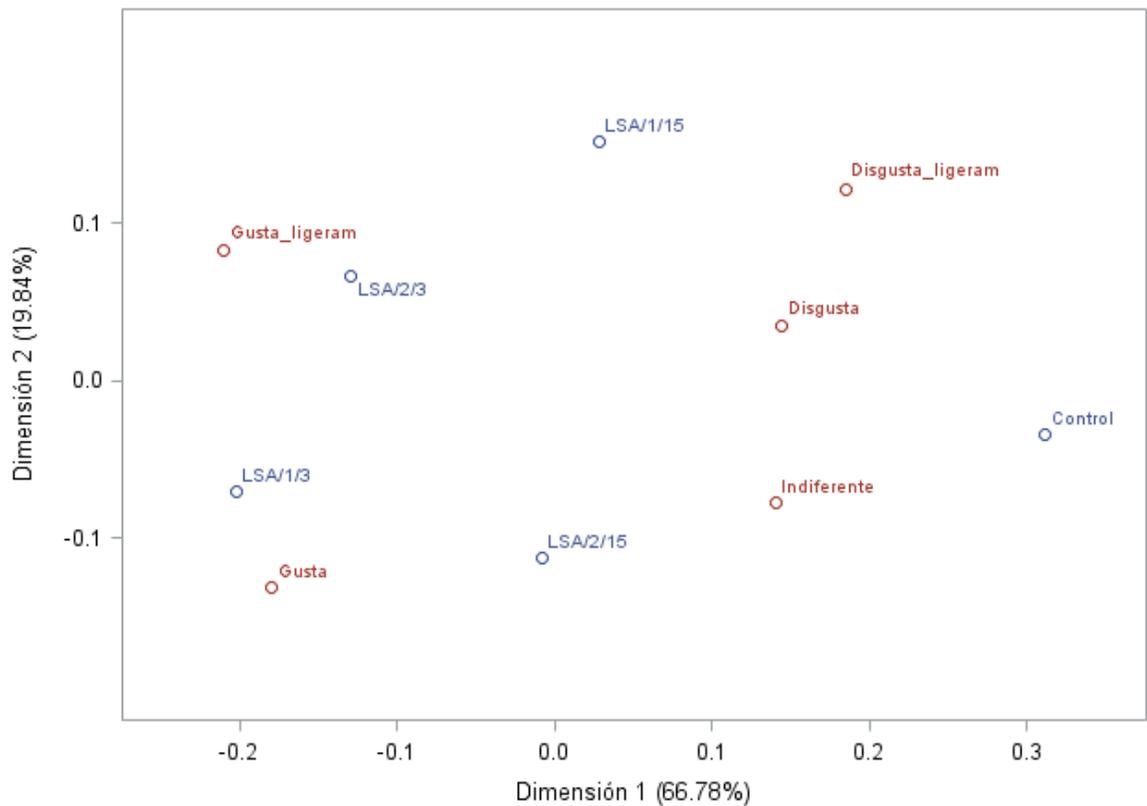
² Escala hedónica: 5 = me gusta, 4 = me gusta ligeramente, 3 = ni me gusta ni me disgusta, 2 = me disgusta ligeramente, 1 = no me gusta
Ultrasonido = 24 kHz y 23 W.

^{a, b} Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencia significativa (P<0.05).

Por otro lado, y en concordancia con los resultados anteriores, el análisis de chi cuadrada determinó que no hay evidencia suficiente para afirmar que exista asociación entre la aceptación y el tratamiento de las bebidas, en cuanto apariencia ($P= 0.79$), color ($P= 0.99$), olor ($P=0.81$), sabor ($P=0.95$), viscosidad ($P= 0.80$), regusto ($P= 0.92$) y aceptación general ($P= 0.67$). Pero sí en dulzor ($P= 0.03$). El análisis de correspondencia es una herramienta exploratoria de análisis de datos que no solo ayuda a identificar la existencia de una relación entre las variables, sino que también muestra cómo se relacionan éstas entre sí.

El análisis de correspondencia basado en los tratamientos y la aceptabilidad sensorial del dulzor de las bebidas se muestra en la Gráfica 6. Los dos ejes representaron el 86.62% de la inercia o la varianza total de la aceptación del dulzor (dimensión 1, 66.78% y dimensión 2, 18.84%). Prácticamente, la varianza total podría explicarse en la primera dimensión.

La bebida LSA/1/3 (1_3 en la gráfica) fue la que tuvo mayor correspondencia a la categoría “gusta”, seguida de la formulación LSA/2/15 (2_15 en la gráfica), pero esta también fue cercana a “indiferente”. Mientras que la bebida LSA/2/3 (2_3 en la gráfica) tuvo correspondencia con el descriptor “gusta ligeramente” y LSA/1/15 (1_15 en la gráfica) con “disgusta ligeramente”. Finalmente, la bebida control fue más correspondiente a “disgusta”, “disgusta ligeramente” e “indiferente”. Por lo que se puede decir que el dulzor de la bebida control fue menos aceptado. Por lo tanto, la asociación entre los niveles de inulina, el tiempo de ultrasonido y los atributos sensoriales contribuyó a la discriminación de los tratamientos, agrupándolos según el grado de aceptabilidad del dulzor de las bebidas por parte del panelista.



Gráfica 6. Análisis de correspondencia de la aceptación sensorial realizada por 123 panelistas no entrenados y el porcentaje (p/v) de inulina y tiempo (min) de ultrasonido (24 kHz y 23 W) en bebidas funcionales de lactosuero-avena. LSA/1/3 = 1% inulina/3 min ultrasonido; LSA/2/3 = 2% inulina/3 min ultrasonido; LSA/1/15 = 1% inulina y 15 min ultrasonido; LSA/2/15 = 2% inulina y 15 min ultrasonido.

Prueba de preferencia. Los resultados de la prueba de preferencia (Cuadro 23) mostraron que no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) en la preferencia de las bebidas con la aplicación de ultrasonido e inulina o pasteurización. Por otra parte, el análisis de correspondencia (Gráfica 7) muestra que la bebida más cercana a la categoría de mayor preferencia (P5) fue LSA/1/15. En la siguiente posición de preferencia se localizaron las bebidas LSA/2/3 y LSA/2/15, que además fueron muy similares. En las siguientes categorías de preferencia (P3 y P2) mostró más correspondencia que las demás, la formulación LSA/1/3. Finalmente, la bebida menos preferida (P1) fue el control.

Al igual que en este estudio, existen investigaciones que no han encontrado efecto del ultrasonido en las características sensoriales. Martini y Walsh (2012) aplicaron termosonicación (20 kHz y 15 W) por 15 min a 60 °C, en soluciones de lactosuero sin inulina y no encontraron cambios en los atributos sensoriales.

A pesar de que se ha reportado que el ultrasonido disminuye (Ashokkumar *et al.*, 2009; Zisu *et al.*, 2010) o aumenta (Krešić *et al.*, 2008; Martini *et al.* 2008) la viscosidad instrumental del lactosuero o lácteos, sensorialmente no se ha percibido este cambio (Martini y Walsh, 2012).

Por otro lado, hay estudios que han encontrado que la aplicación de ultrasonido de alta intensidad generara efectos negativos en el sabor del producto (Chandrapala y Zisu, 2018). Marchesini *et al.* (2012) aplicaron ultrasonido (24 kHz, 400 W, y 100% de amplitud) durante 100 s en leche. Encontraron que el sabor fue afectado negativamente dando como resultado la percepción de sabores metálicos, quemados y gomosos.

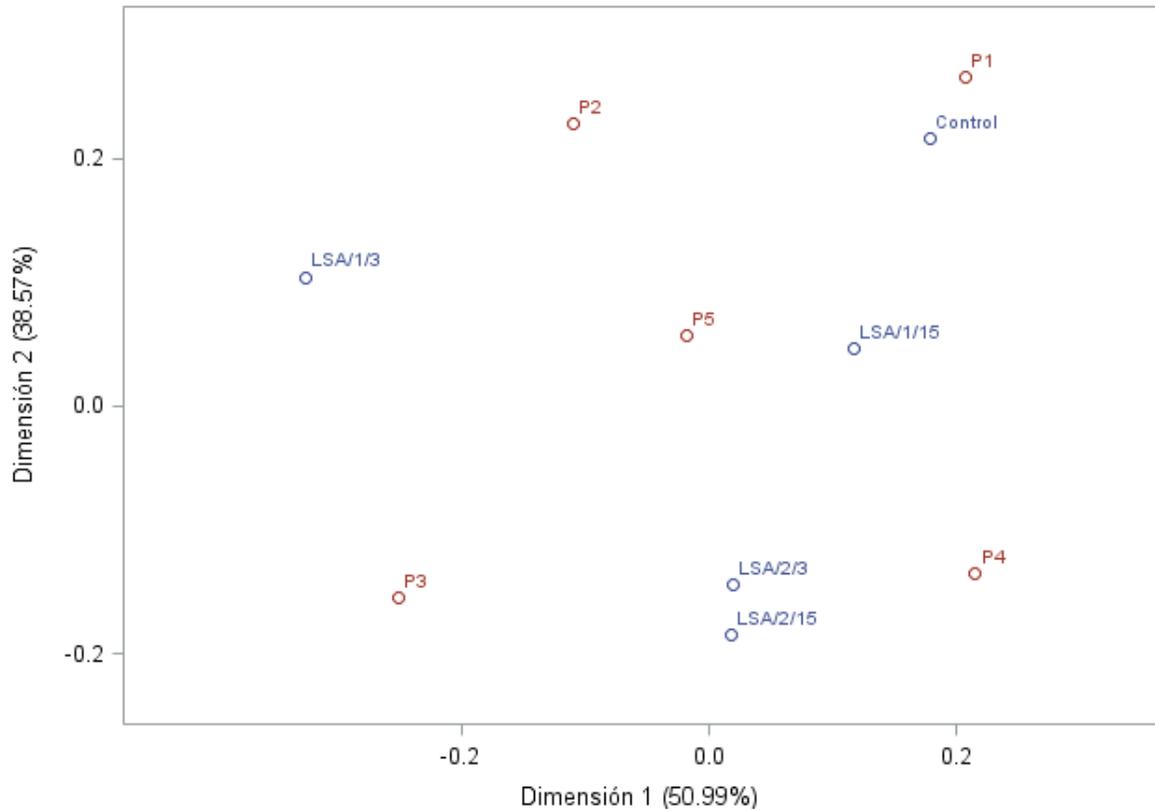
Cuadro 23. Efecto del tiempo de ultrasonido y la adición de inulina en la preferencia sensorial de bebidas funcionales de lactosuero-avena

Tratamiento ¹	Preferencia por ordenamiento ²
LSA/1/3	362 ^a
LSA/2/3	384 ^a
LSA/1/15	384 ^a
LSA/2/15	387 ^a
Control	328 ^a

¹ Bebidas de lactosuero-avena (LSA). LSA/1/3 = 1% v/v inulina y 3 min de ultrasonido; LSA/2/3 = 2% v/v inulina y 3 min de ultrasonido; LSA/1/15 = 1% v/v inulina y 15 min de ultrasonido; LSA/2/15 = 2% v/v inulina y 15 min de ultrasonido. Control = Bebida de lactosuero-avena pasteurizada a 65°C por 30 min sin inulina.

² Rangos totales de la prueba de preferencia por ordenamiento.
Ultrasonido = 24 kHz y 23 W.

^a Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencia significativa ($P < 0.05$).



Gráfica 7. Análisis de correspondencia del ordenamiento de preferencia sensorial realizada por 123 panelistas no entrenados y el porcentaje (p/v) de inulina y tiempo (min) de ultrasonido (24 kHz y 23 W) en bebidas funcionales de lactosuero-avena. LSA/1/3 = 1% inulina/3 min ultrasonido LSA/2/3 = 2% inulina/3 min ultrasonido; LSA/1/15 = 1% inulina y 15 min ultrasonido; LSA/2/15 = 2% inulina y 15 min ultrasonido. Orden de preferencia. P5= Primer lugar; P4=Segundo lugar; P3=Tercer lugar; P2=Cuarto lugar; P1=Quinto lugar.

Observaron que los compuestos volátiles causantes fueron proporcionales a la intensidad y duración del ultrasonido. Por lo que recomiendan seleccionar las condiciones de operación adecuadas para evitar este inconveniente.

Sin embargo, también se ha encontrado que el ultrasonido tiene un efecto positivo sobre propiedades sensoriales. Se ha reportado que el ultrasonido mejora la calidad sensorial de productos lácteos probióticos y prebióticos, mediante la disminución de sabores indeseables asociados a los ácidos acético y propiónico (Guimarães *et al.*, 2019). Riener *et al.* (2009) usaron termosonicación (24 kHz) a 45°C por 10 min en lactosuero y observaron que se mejoró el color y la textura. Barukčić *et al.* (2015) encontraron que el lactosuero termosonicado a 20 k Hz y 480 W por 10 min a 55 °C tuvo mejores propiedades sensoriales que el lactosuero sometido a pasteurización. En la investigación de estos autores, el grupo de panelistas entrenados percibió en el lactosuero pasteurizado un sabor a “cocido” y presencia de sedimentos.

En cuanto al uso de prebióticos, Souza *et al.* (2019) reportaron que la adición de xilooligosacáridos no tuvo impacto ($P > 0.05$) en la aceptación de apariencia y sabor de bebidas de lactosuero y fresa. Pero da Silveira *et al.* (2015), sí observaron influencia en el sabor, al formular bebidas probióticas de lactosuero con diferentes niveles de inulina y oligofruktosa. La bebida más aceptada sensorialmente, con mejor sabor y aroma, contenía la más alta concentración de inulina y oligofruktosa con 6g/100 mL. Villegas *et al.* (2007) adicionaron 6% p/p de inulina en una bebida láctea y encontraron que estas muestras fueron percibidas más cremosas y espesas que aquellas en las que no se adicionó.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De este estudio se puede concluir que, el tiempo de ultrasonido y la cantidad de inulina tienen efecto sobre el pH, acidez y propiedades funcionales de bebidas de lactosuero-avena. Asimismo, se demostró que el lactosuero y la avena son excelentes ingredientes para formular bebidas con propiedades funcionales sobresalientes y con buena aceptación sensorial por parte del consumidor. De acuerdo a los valores de pH y acidez se puede establecer que la vida de anaquel de bebidas funcionales de lactosuero-avena con ultrasonido e inulina fue de 14 días. La mejor formulación funcionalmente fue la bebida con 1% p/v de inulina y 15 min de ultrasonido. La adición de inulina y la aplicación de ultrasonido mejoró la aceptación y preferencia sensorial a comparación de la pasteurización. Se recomienda continuar realizando investigación sobre este tipo de bebidas para perfeccionar las características sensoriales, mejorar el sistema de envasado, adicionar un conservador y monitorear la vida de anaquel con un análisis microbiológico y sensorial.

LITERATURA CITADA

- Aadil, R. M., X. Zeng, Z. Han y D. Sun. 2013. Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chem.* 141: 3201-3206.
- Abid, M., S. Jabbar, T. Wu, M. M. Hashim, B. Hu, S. Lei, X. Zhang y X. Zeng. 2013. Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. *Ultrason. Sonochem.* 20: 1182–1187.
- Aghbashlo, M., M. Tabatabaei y K. Karimi. 2016. Exergy-based sustainability assessment of ethanol production via *Mucor indicus* from fructose, glucose, sucrose, and molasses. *Energy.* 98: 240-252.
- Arranz, E., A. R. Corrochano, C. Shanahan, M. Villalva, L. Jaime, S. Santoyo, M. J. Callanan, E. Murphy y L. Giblin. 2019. Antioxidant activity and characterization of whey protein-based beverages: Effect of shelf life and gastrointestinal transit on bioactivity. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 57: 102209.
- Ashokkumar, M., J. Lee, B. Zisu, R. Bhaskarcharya, M. Palmer y S. Kentish. 2009. Hot topic: Sonication increases the heat stability of whey proteins. *Int. J. Dairy Sci.* 92: 5353-5356.
- Ashokkumar, M. 2015. Applications of ultrasound in food and bioprocessing. *Ultrason. Sonochem.* 25: 17-23.
- Balthazar, C. F., H. L. A. Silva, E. A. Esmerino, R. S. Rocha, J. Moraes, M. A.V. Carmo, L. Azevedo, I. Camps, Y. K. D Abud, C. Sant'Anna, R. M. Franco, M. Q. Freitas, M. C. Silva, R. S. L. Raices, G. B. Escher, D. Granato, C. S. Ranadheera, F. Nazarro y A. G. Cruz. 2018. The addition of inulin and *Lactobacillus casei* 01 in sheep milk ice cream. *Food Chem.* 246: 464-472.
- Barukčić, I., K. L. Jakopović, z. Herceg, S. Karlović y R. Božanić. 2015. Influence of high intensity ultrasound on microbial reduction, physico-chemical characteristics and fermentation of sweet whey. *Innov Food Sci Emerg.* 27: 94-101.
- Bei, Q., Z. Wu y G. Chen. 2020. Dynamic changes in the phenolic composition and antioxidant activity of oats during simultaneous hydrolysis and fermentation. *Food Chem.* 305: 125269.
- Bierzuńska, P., D. Sokolińska, M. Rudzińska y A. Gramza-Michałowska. 2017. Evaluation of antioxidant activity of whey protein to improve cholesterol oxidation stability in fresh white cheese from buttermilk. *J. Food Nutr. Res.* 56: 101-108.

- Bleakley, S., M. Hayes, N. O'Shea, E. Gallagher y T. Lafarga. 2017. Predicted release and analysis of novel ACE-I, renin, and DPP-IV inhibitory peptides from common oat (*Avena sativa*) protein hydrolysates using *in silico* analysis. *Foods*. 6:108.
- Brandelli, A., D. Joner Daroit y A. P. Folmer Correa. 2015. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Res. Int.*73: 149-161.
- Bratt, K., K. Sunner, S. Bryngelsson, A. Fagerlund, L. Engman, R. E. Anderson y L. H. Dimberg. 2003. Avenanthramides in oats (*Avena sativa* L.) and structure-antioxidant activity relationships. *Food Chem*. 51: 594-600.
- Brindzová, L., M. Čertík, P. Rapta, M. Zalibera, A. Mikulajova, M. Takacsova. 2008. Antioxidant activity, β -glucan and lipid contents of oat varieties. *Czech. J. Food Sci*. 26: 163-173.
- Cao, Y. e Y. L. Xiong. 2017. Interaction of whey proteins with phenolics derivatives under neutral and acidic pH conditions. *J Food Sci*. 82: 409-419.
- Cassani, L., B. Tomadoni, M. R. Moreira, A. Ponce y M. V. Agüero. 2017. Optimization of inulin: Oligofructose proportion and non-thermal processing to enhance microbiological and sensory properties of fiber-enriched strawberry juice. *LWT - Food Sci. Technol*. 80: 446-455.
- 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
- Carvalho, F., A. R. Prazeres, y J. Rivas. 2013. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Sci. Total Environ*. 445: 385-396.
- Chandrapala, J. y B. Zisu. 2018. Ultrasound technology in dairy processing. En *Ultrasound technology in dairy processing*. B. G. Pollet y M. Ashokkumar, eds. Springer, Cham, Suiza.
- Chatterjee, G., J. De Neve, A. Dutta y S. Das. 2015. Formulación y estadística de una bebida de naranja preparada a base de suero y su estabilidad de almacenamiento. *Rev. Mex. Ing*. 14: 253-264.
- Chemat, F., N. Rombaut, A. Meullemiestre, M. Turk, S. Perino, A. S. Fabiano-Tixier y M. Abert-Vian. 2017. Review of green food processing techniques. preservation, transformation, and extraction. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*. 41: 357-377.
- Chen, W., H. Wang, W. Wang, X. Ma, M. Gao, T. Ding, X. Ye y D. Liu. 2019. Binding affinity and antioxidant activity of the complex of(-)-

- epigallocatechin-3-gallate and whey protein isolate: Effect of ultrasound pretreatment. *J. Food Process. Eng.* 43: e13081.
- Chen, G., Y. Liu, J. Zeng, X. Tian, Q. Bei y Z. Wu. 2020. Enhancing three phenolic fractions of oats (*Avena sativa* L.) and their antioxidant activities by solid-state fermentation with *Monascus anka* and *Bacillus subtilis*. *J. Cereal Sci.* 93: 102940.
- Cheung, I. W. Y., S. Nakayama, M. N. K. Hsu, A. G. P. Samaranayaka y E. C. Y. Li-Chan. 2009. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates from oat (*Avena sativa*) proteins by *in silico* and *in vitro* analyses. *J. Agric. Food Chem.* 57: 9234-9242.
- Cheung, L. K. Y., R. E. Aluko, M. A. Cliff y C. Y. Li-Chan. 2015. Effects of exopeptidase treatment on antihypertensive activity and taste attributes of enzymatic whey protein hydrolysates. *J. Funct. Foods.* 13: 262-275.
- Chobert, J. M., K. El-Zahar, M. Sitohy, M. Dalgalarrrondo, F. Métro, Y. Choiset y T. Haertlé. 2005. Angiotensin I-converting-enzyme (ACE)-inhibitory activity of tryptic peptides of ovine β -lactoglobulin and of milk yoghurts obtained by using diferent starters. *Le Lait.* 85: 141-152.
- Corbo, M. R., A. Bevilacqua, L. Petruzzi, F. P. Casanova y M. Sinigaglia. 2014. Functional beverages: The emerging side of functional foods. commercial trends, research, and health implications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13: 1192-1206.
- Cui, P., X. Yang, Q. Liang, S. Huang, F. Lu, J owusu, X. Ren y H. Ma. 2019. Ultrasound-assisted preparation of ACE inhibitory peptide from milk protein and establishment of its in-situ real-time infrared monitoring model. *Ultrason. Sonochem.* 62: 104859.
- Cushman, D. W. y H. S. Cheung, 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20: 1637-1648.
- Da Silveira, E. O., J. H. Lopes Neto, L. A. da 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.
- De Castro, F. P., T. M. Cunha, P. L. M. Barreto, R. D. Camboni y E. Prudêncio. 2009. Effect of oligofructose incorporation on the properties of fermented probiotic lactic beverages. *Int. J. Dairy Technol.* 62: 68-74.

- Debon, J., E. S. Prudencio y J. C. C. Petrus. 2010. Rheological and physico-chemical characterization of prebiotic microfiltered fermented milk. *J. Food Eng.* 99: 28-135.
- Donkor, O. N., A. Henriksson, T. Vasiljevic y N. P. Shah. 2005. Probiotic strains as starter cultures improve angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in soy yogurt. *J. Food Sci.* 70: M375- M381.
- Dryáková A., A. Pihlanto, P. Marnila, L. Čurda y H. J. T. Korhonen. 2010. Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *Eur. Food Res. Technol.* 230: 865-874.
- Erkaya-Kotan, T. 2020. *In vitro* angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory and antioxidant activity of probiotic yogurt incorporated with orange fibre during storage. *J Food Sci Technol.* 57: 2343-2353.
- Folmer Corrêa, A. P., D. Joner Daroit, R. Fontoura, S. M. Meister Meira, J. Segalin y A. Brandelli. 2014. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides* 61: 48-55.
- Fuglsang, A., F. P. Rattray, D. Nilsson y N. C. B. Nyborg. 2003. Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin converting enzyme *in vitro* and *in vivo*. *Anton Leeuw.* 83: 27-34.
- Gad, A. S., W. H. Emam, G. F. Mohamed y A. F. Sayd. 2013. Utilization whey in production of functional healthy beverage "whey-mango beverages". *Am. J. Food Technol.* 8: 133-148.
- Granato, D, D. S. Nunes, F. J. Barba. 2017. An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: a proposal. *Trends Food Sci. Technol.* 62: 13-22.
- Granato, D., F. J. Barba, D. B. Kovačević., J. M. Lorenzo, A. G. Cruz y P. Putnik. 2020. Functional Foods: Product development, technological trends, efficacy testing and safety. *Annu. Rev. Food Sci. T.* 11: 3.1–3.26.
- Guimarães, J. T., E. K. Silva, V. O. Alvarenga, A. L. R. Costa, R. T. Cunha, A. S. Sant'Anna, M. Q. Freitas, M. A. M. Meireles y A. G. Cruz. 2018. Physicochemical changes and microbial inactivation after high-intensity ultrasound processing of prebiotic whey beverage applying different ultrasonic power levels. *Ultrason. Sonochem.* 44: 251-260.
- Guimarães, J. T. E. K. Silva, C. s. Ranadheera, J. Morales, R. S. L. Raices, M. C. Silva, M. S. Ferreira, M. Q. Freitas, M. A. A. Meireles y A. G. Cruz. 2019. Effect of high-intensity ultrasound on the nutritional profile and volatile

- compounds of a prebiotic soursop whey beverage. *Ultrason. Sonochem.* 55: 157-164.
- Güler-Akın, M. B., I. Ferliarslan y M. S. Akin. 2016. Apricot probiotic beverageing yoghurt supplied with inulin and oat fiber. *Adv. Microbiol.* 6: 999-1009.
- Gülseren, Í. D. Güzey, B. D. Bruce y J. Weiss. 2007. Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrason. Sonochem.* 14: 173-183.
- Herrera, P. A. L. 2013. Evaluación de la avena germinada y avena malteada como sustrato para bacterias probióticas en una bebida. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih. México.
- Holsinger, V. H., L. P. Posati y E. D. De Vilbiss. 1974. Whey beverages: A review. *J. Dairy Sci.* 57: 849-859.
- Hussein, F. A., S. Y. Chay, M. Zarei, S. M. Auwal, A. A. Hamid, W. Z. Wan Ibadullah, y N. Saari. 2020. Whey protein concentrate as a novel source of bifunctional peptides with angiotensin- converting enzyme inhibitory and antioxidant properties: RSM study. *Foods.* 9: 64.
- Ibrahim, H. R., A. S. Ahmed y T. Miyata. 2017. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. *J. Adv. Res.* 8: 63-71.
- Jambrak, A. R., T. M. Mason, V. Lelas, L. Paniwnyk y Z. Herceg. 2014. Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. *J. Food Eng.* 121:15-23.
- Jia, J., H. Ma, W. Zaho, Z. Wang, W. Tian, L. Luo y R. He. 2010. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chem.* 119: 336-342.
- Jiang, Z., K. Yao, X. Yuan, Z. Mu, Z. Gao, J. Hou y L. Jiang. 2018. Effects of ultrasound treatment on physicochemical, functional properties and antioxidant activity of whey protein isolate in the presence of calcium lactate. *J. Sci. Food Agric.* 98: 1522-1529.
- Jiménez, A. M., M. A. Murcia, P. Parras y M. Martínez-Tomé. 2008. On the importance of adequately choosing the ingredients of yoghurt and enriched milk for their antioxidant activity. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43: 1464-1473.
- Krešić, G. V. Lelas, A. R. Jambrak, Z. Herceg, S. R. Brnčić. 2008. Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins. *J. Food Eng.* 87: 64-73.

- Kumar, M. D., A. K. Beena y M. D. Baig. 2017. Optimization of *Lactobacillus casei* and inulin levels in the preparation of synbiotic whey beverage using response surface methodology. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 6: 558-568.
- Kumar, A., A. Kaur y V. Tomer. 2020a. Process optimization for the development of a synbiotic beverage based on lactic acid fermentation of nutriceals and milk-based beverage. *LWT - Food Sci. Technol.* 131: 109774.
- Kumar, A., A. Kaur, V. Tomer, K. Gupta y K. Kaur. 2020b. Effect of rose syrup and marigold powder on the physicochemical, phytochemical, sensorial and storage properties of nutriceals and milk-based functional beverage. *J Am Coll Nutr.* 24: 1-8.
- Liu, L., L. Du, X. Zhang, W. Yang y H. Zhang. 2019. Effect of ultrasound assisted heating on structure and antioxidant activity of whey protein peptide grafted with galactose. *LWT - Food Sci. Technol.* 109: 130-136.
- Lawless, H. T. y H. Heymann. 2010. *Sensory evaluation of food.* 2a ed. Springer, Nueva York, E. U.A.
- Ma, S., C. Wang y M. Guo. 2018. Changes in structure and antioxidant activity of β -lactoglobulin by ultrasound and enzymatic treatment. *Ultrason Sonochem.* 43: 227-236.
- MacFie, H. J., N. Bratchell, K. Greenhoff y L. V. Vallis. 1989. Designs to Balance the Effect of Order of Presentation and First-order Carry-over Effects in Hall Tests. *J. Sens. Stud.* 4: 129-148.
- Madadlou, A., D. Sheehan, Z. Emam-Djomeh y M. E. Mousavi. 2011. Ultrasound-assisted generation of ACE-inhibitory peptides from casein hydrolyzed with nanoencapsulated protease. *J. Sci. Food Agric.* 91: 2112-2116.
- Madhu, A. N., N. Amrutha y S. G. Prapulla. 2012. Characterization and antioxidant property of probiotic and synbiotic yogurts. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 4: 90-97.
- Mann, B., A. Kumari, R. Kumar, R. Sharma, K. Prajapati, S. Mahboob y S. Athira. 2015. Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *J. Food Sci. Technol.* 52: 3235-3241.
- Marchesini, G., S. Balzan, F. Montemurro, L. Fasolato, I. Andrighetto, S. Segato y E. Novelli. 2012. Effect of ultrasound alone or ultrasound coupled with CO₂ on the chemical composition, cheese-making properties and sensory traits of raw milk. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 16: 391-397.

- Martini, S., A. H. Suzuki y R. W. Hartel. 2008. Effect of high intensity ultrasound on crystallization behavior of anhydrous milk fat. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85: 621–628.
- Martini, S. y M. K. Walsh. 2012. Sensory characteristics and functionality of sonicated whey. *Food Research International*, 49: 694-701.
- Mazorra-Manzano, M. A., G. R. Robles-Porchas, D. A. González Velázquez, M. J. Torres-Llanez, M. Martínez-Porchas, C. O. García-Sifuentes, A. F. González Córdova y B. Vallejo-Córdoba. 2020. Cheese whey fermentation by its native microbiota: Proteolysis and bioactive peptides release with ace-inhibitory activity. *Fermentation*. 6: 19.
- Meilgaard, M. C., G. V. Ceville y B. T. Carr. 1991. *Sensory Evaluation Techniques* (2nd ed.). CRC Press, c1991.
- Meilgaard, M. C., G. V. Ceville y B. T. Carr. 2015. *Sensory Evaluation Techniques* (5th ed.). CRC Press.
- Meyer, D., J. Vermulst, R. H. Tromp y E. H. A. de Hoog. 2011. The effect of inulin on tribology and sensory profiles of skimmed milk. *J. Texture Stud.* 42: 387-393.
- Monteiro, S. H. M. C., E. K. Silva, J. T. Guimarães, M. Q. Freitas, M. A. A. Meireles y A. G. Cruz. 2020. High-intensity ultrasound energy density: How different modes of application influence the quality parameters of a dairy beverage. *Ultrason. Sonochem.* 63: 104928.
- Nakurte, I., I. Kirhnere, J. Namniece, K. Saleniece, L. Krigere, P. Mekss, Z. Vicupe, M. Bleidere, L. Legzdina y R. Muceniece. 2013. Detection of the lunasin peptide in oats (*Avena sativa* L). *J. Cereal Sci.* 57: 319-324.
- Nielsen, M. S., T. Martinussen, B. Flambard, K. I. Sørensen 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.
- Nikmaram, P., S. M. Mousavi, H. Kiani, Z. Emamdjomeh, S. H. Razavi y Z. Mousavi. 2015. Modeling the effect of inulin, pH and storage time on the viability of selected *Lactobacillus* in a probiotic fruity yogurt beverage using the monte carlo simulation. *J. Food Qual.* 39: 362-369.
- O'Loughlin, I. B., B. Murray, A. Brodkorb, R. J. FitzGerald y P. M. Kelly. 2014. Production of whey protein isolate hydrolysate fractions with enriched ACE-inhibitory activity. *Int. Dairy J.* 38: 101-103.

- Önay-Uçar, E., N. Arda, M. Pekmez, A. M. Yılmaz, N. Böke-Sarıkahya, S. Kırmızıgül y A. S. Yalçın. 2014. Comparison of antioxidant capacity, protein profile and carbohydrate content of whey protein fractions. *Food Chem.* 150: 34-40.
- Pereira, R. y A. Vicente. 2010. Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Res. Int.* 43: 1936-1943.
- Pihlanto, A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int. Dairy J.* 16: 1306-1314.
- Pripp, A. H., T. Isaksson, L. Stepaniak y T. Sørhaug. 2004. Quantitative structure-activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. *Eur. Food Res. Technol.* 219: 579-583.
- Ramchandran, L. y N. P. Shah. 2010. Effect of exopolysaccharides and inulin on the proteolytic, angiotensin-I-converting enzyme- and α -glucosidase-inhibitory activities as well as on textural and rheological properties of low-fat yogurt during refrigerated storage. *Dairy Sci. Technol.* 89: 583-600.
- Riener, J, F. Noci, D. A. Cronin, D. J. Morgan y G. Lyng. 2009. The effect of thermosonication of milk on selected physicochemical and microstructural properties of yoghurt gels during fermentation. *Food Chem.* 114: 905-911.
- Ritsema, T. y S. Smeeckens. 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 223-230.
- Sadler, G. D y P. A. Murphy. 2010. pH and titratable acidity. *Food Anal.* 219-238.
- Sadat, L., C. Cakir-Kiefer, M. A. N'Negue, J. L. Gaillard, J-M Girardet y L. Miclo. 2011. Isolation and identification of antioxidative peptides from bovine α -lactalbumin. *Int. Dairy J.* 21: 214-221.
- Sady, M., G. Jaworska, T. Grega, E. Bernas y J. Domagala. 2013. Application of acid whey in Orange beverage production. *Food Technol. Biotechnol.* 51: 266.
- Shah, C., N. Mokalshetty y V. Mishra. 2016. Preparation, characterization and *in vitro* antioxidative potential of synbiotic fermented dairy products. *J. Food Sci. Technol.* 53: 984-1002.
- Sahan, N., K. Yasar y A. A. Hayaloglu. 2008. Physical, chemical and flavour quality of non-fat yogurt as affected by a β -glucan hydrocolloidal composite during storage. *Food Hydrocoll.* 22: 1291-1297.

- Salmerón, I., K. Thomas y S. S. Pandiella. 2015. Effect of potentially probiotic lactic acid bacteria on the physicochemical composition and acceptance of fermented cereal beverages. *J. Funct. Foods*. 15: 106-115.
- Sakhale, B. K., V. N. Pawar y R. C. Ranveer. 2012. Studies on the Development and Storage of Whey based RTS Beverage from Mango cv. *Kesar*. *J. Food Process. Technol.* 3: 1000148.
- SAS, Institute. 2006. SAS/STAT User's Guide. SAS Inst. Inc., Cary, Carolina del Norte, E. U. A.
- Schoina, V., A. Terpou, A. Papadaki, L. Bosnea, N. Kopsahelis y M. Kanellaki. 2020. Enhanced aromatic profile and functionality of cheese whey beverages by incorporation of probiotic cells immobilized on *Pistacia terebinthus* resin. *Foods*. 9: 1-16.
- Shakerian, M., S. H. Razavi, S. A. Ziai, F. Khodaiyan, M. S. Yarmand y A. Moayed. 2015. Proteolytic and ACE-inhibitory activities of probiotic yogurt containing non-viable bacteria as affected by different levels of fat, inulin and starter culture. *J. Food Sci. Technol.* 52: 2428-33.
- Sharma, P., N. Trivedi e Y. Gat. 2017. Development of functional fermented whey–oat-based product using probiotic bacteria. *3 Biotech*. 7: 272.
- Shu, G., L. Ma, L. Chen, M. Guo, Y. Guo y H. Chen. 2020. Goat milk Kefir with ACE inhibitory activity: Preparation and storage stability evaluation. *J Food Process Preserv.* 00: e14417.
- Thaipong, K., U. Boonprakoba, K. Crosbyb, L. Cisneros-Zevallosc y D. H. Byrne. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* 19: 669–675.
- Thamer, K. G. y A. L B. Penna. 2005. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. *Braz. J. Pharm. Sci.* 41: 393-400.
- Tsetsegmaa, R. y D. Tsetsegee. 2016. Evaluation of a fermented. *Proceedings of IFOST-2016*. 176-179.
- van Loo, J., P. Coussement, L. de Leenheer. H. Hoebregs, H y G. Smits. 1995. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35: 525-55.2
- Villegas, B. y E. Costell. 2007. Flow behaviour of inulin-milk beverages. Influence of inulin average chain length and of milk fat content. *Int. Dairy J.* 17: 776-781.

- Villegas, B., I. Carbonell y E. Costell. 2007. Inulin milk beverages: Sensory differences in thickness and creaminess using R-index analysis of the ranking data. *J. Sens. Stud.* 22: 377-393.
- Wakabayashi, H., K. Yamauchi y M. Takase. 2006. Lactoferrin research, technology and applications. *Int Dairy J.* 16: 1241-1251.
- Wang, B., G. G. Atungulu, R. Khir, J. Geng, H. Ma, Y. Li y B. Wu. 2015. Ultrasonic treatment effect on enzymolysis kinetics and activities of ace-inhibitory peptides from oat-isolated protein. *Food Biophys.* 10: 244-252.
- Welderufael, F.T., T. Gibson, L. Methven y P. Jauregi. 2012. Chemical characterisation and determination of sensory attributes of hydrolysates produced by enzymatic hydrolysis of whey proteins following a novel integrative process. *Food Chem.* 134: 1947-1958.
- Wu, Q., X. Zhang, J. Jia, C. Kuang y H. Yang. 2018. Effect of ultrasonic pretreatment on whey protein hydrolysis by alcalase: Thermodynamic parameters, physicochemical properties and bioactivities. *Process. Biochem.* 67: 46-54.
- Zaho, Ch. Ch. P. H. Kim y J. B. Eun. 2020. Influence of high-intensity ultrasound application on the physicochemical properties, isoflavone composition, and antioxidant activity of tofu whey. *LWT - Food Sci Technol.* 117: 108618.
- Zheng, Y., X. Wang, Y. Zhuang, Y. Li, P. Shi, H. Tian, X. Li y X. Chen. 2020. Isolation of novel ACE-inhibitory peptide from naked oat globulin hydrolysates *in silico* approach: Molecular docking, *in vivo* antihypertension and effects on renin and intracellular endothelin-1. *J. Food Sci.* 85: 1328-1337.
- Zisu, B., R. Bhaskaracharya, S. Kentish y M. Ashokkumar. 2010. Ultrasonic processing of dairy systems in large scale reactors. *Ultrason. Sonochem.* 17: 1075-1081.
- Zulueta, A., A. Maurizi, A. Frígola, M. J. Esteve, R. Coli y G. Burini. 2009. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. *Int. Dairy J.* 19: 380-385.
- Zygoura, P., T. Moyssiadi, A. Badeka, A. Kondyli, I. Savvaidis y M. G. Kontominas. 2004. Shelf life of whole pasteurized milk in Greece: effect of packaging material. *Food Chem.* 87: 1-9.

APÉNDICE A

Nombre: _____ Edad: _____ Fecha _____

¿Consume habitualmente productos lácteos fermentados (yogurt, yakult, chamyto, etc.)?

Sí _____ No _____

Pruebe las muestras de izquierda a derecha y marque con una X el lugar que indique su opinión acerca de la muestra.

	624	391	857	549
Me gusta	_____	_____	_____	_____
Me gusta ligeramente	_____	_____	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____	_____	_____
Me disgusta ligeramente	_____	_____	_____	_____
No me gusta	_____	_____	_____	_____

Comentarios:

¡MUCHAS GRACIAS!

Figura 1. Formato para la primera sesión de la evaluación sensorial de aceptación general de bebidas probióticas de lactosuero/avena (Lawless y Heymann, 2010). 624=65% v/v lactosuero/35% avena/0 min ultrasonido; 391=50% v/v lactosuero/50% avena/10 min ultrasonido; 857=65% v/v lactosuero/35% avena/10 min ultrasonido; 549=35% v/v lactosuero/65% avena/3 min ultrasonido.

Nombre: _____ Edad: _____ Fecha _____

¿Consume habitualmente productos lácteos fermentados (yogurt, yakult, chamyto, etc.)?

Sí____ No____

Pruebe las muestras de izquierda a derecha y marque con una X el lugar que indique su opinión acerca de la muestra.

	487	212	954
Me gusta	_____	_____	_____
Me gusta ligeramente	_____	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____	_____
Me disgusta ligeramente	_____	_____	_____
No me gusta	_____	_____	_____

Comentarios:

¡MUCHAS GRACIAS!

Figura 2. Formato para la segunda sesión de la evaluación sensorial de aceptación general de bebidas probióticas de lactosuero/avena (Lawless y Heymann, 2010). 487=65% v/v lactosuero/35% avena/3 min ultrasonido; 212=35% v/v lactosuero/65% avena/0 min ultrasonido; 954=35% v/v lactosuero/65% avena/10 min ultrasonido.

Nombre: _____ Edad: _____ Fecha _____

¿Consume habitualmente productos lácteos fermentados (yogurt, yakult, chamyto, etc.)?

Sí _____ No _____

Pruebe las muestras de izquierda a derecha y marque con una X el lugar que indique su opinión acerca de la muestra.

	646	429
Me gusta	_____	_____
Me gusta ligeramente	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____
Me disgusta ligeramente	_____	_____
No me gusta	_____	_____

Comentarios:

¡MUCHAS GRACIAS!

Figura 3. Formato para la tercera sesión de la evaluación sensorial de aceptación general de bebidas probióticas de lactosuero/avena (Lawless y Heymann, 2010). 646=50% v/v lactosuero/50% avena/0 min ultrasonido; 429=50% v/v lactosuero/50% avena/3 min ultrasonido.

APÉNDICE B

Nombre: _____ Edad: _____ Fecha: _____

Pruebe las bebidas y marque con una X en el lugar que indique su opinión acerca del:

COLOR

	946	283	715
Me gusta mucho	_____	_____	_____
Me gusta ligeramente	_____	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____	_____
Me disgusta ligeramente	_____	_____	_____
Me disgusta mucho	_____	_____	_____

OLOR

	946	283	715
Me gusta mucho	_____	_____	_____
Me gusta ligeramente	_____	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____	_____
Me disgusta ligeramente	_____	_____	_____
Me disgusta mucho	_____	_____	_____

SABOR

	946	283	715
Me gusta mucho	_____	_____	_____
Me gusta ligeramente	_____	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____	_____
Me disgusta ligeramente	_____	_____	_____
Me disgusta mucho	_____	_____	_____

VISCOSIDAD

	946	283	715
Me gusta mucho	_____	_____	_____
Me gusta ligeramente	_____	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____	_____
Me disgusta ligeramente	_____	_____	_____
Me disgusta mucho	_____	_____	_____

ACEPTABILIDAD GENERAL

	946	283	715
Me gusta mucho	_____	_____	_____
Me gusta ligeramente	_____	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____	_____
Me disgusta ligeramente	_____	_____	_____
Me disgusta mucho	_____	_____	_____

Comentarios: _____

¡Muchas gracias!

Figura 4. Formato de la evaluación sensorial de aceptación de bebidas funcionales de lactosuero-avena (Lawless y Heymann, 2010). Porcentajes (v/v) de saborizante natural vainilla: 946 (361) = 1%; 283 (534) = 1.5%; 715 (829) = 2%.

APÉNDICE C

Nombre: _____ Edad: _____ Fecha: _____

Pruebe las bebidas y marque con una X en el lugar que indique su opinión acerca de:

APARIENCIA	519	335	662	875	082
Me gusta mucho	_____	_____	_____	_____	_____
Me gusta ligeramente	_____	_____	_____	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____	_____	_____	_____
Me disgusta ligeramente	_____	_____	_____	_____	_____
Me disgusta mucho	_____	_____	_____	_____	_____
COLOR	519	335	662	875	082
Me gusta mucho	_____	_____	_____	_____	_____
Me gusta ligeramente	_____	_____	_____	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____	_____	_____	_____
Me disgusta ligeramente	_____	_____	_____	_____	_____
Me disgusta mucho	_____	_____	_____	_____	_____
OLOR	519	335	662	875	082
Me gusta mucho	_____	_____	_____	_____	_____
Me gusta ligeramente	_____	_____	_____	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____	_____	_____	_____
Me disgusta ligeramente	_____	_____	_____	_____	_____
Me disgusta mucho	_____	_____	_____	_____	_____
SABOR	519	335	662	875	082
Me gusta mucho	_____	_____	_____	_____	_____
Me gusta ligeramente	_____	_____	_____	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____	_____	_____	_____
Me disgusta ligeramente	_____	_____	_____	_____	_____
Me disgusta mucho	_____	_____	_____	_____	_____

DULZOR	519	335	662	875	082
Me gusta mucho	_____	_____	_____	_____	_____
Me gusta ligeramente	_____	_____	_____	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____	_____	_____	_____
Me disgusta ligeramente	_____	_____	_____	_____	_____
Me disgusta mucho	_____	_____	_____	_____	_____
VISCOSIDAD	519	335	662	875	082
Me gusta mucho	_____	_____	_____	_____	_____
Me gusta ligeramente	_____	_____	_____	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____	_____	_____	_____
Me disgusta ligeramente	_____	_____	_____	_____	_____
Me disgusta mucho	_____	_____	_____	_____	_____
REGUSTO	519	335	662	875	082
Me gusta mucho	_____	_____	_____	_____	_____
Me gusta ligeramente	_____	_____	_____	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____	_____	_____	_____
Me disgusta ligeramente	_____	_____	_____	_____	_____
Me disgusta mucho	_____	_____	_____	_____	_____
ACEPTACIÓN GENERAL	519	335	662	875	082
Me gusta mucho	_____	_____	_____	_____	_____
Me gusta ligeramente	_____	_____	_____	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____	_____	_____	_____
Me disgusta ligeramente	_____	_____	_____	_____	_____
Me disgusta mucho	_____	_____	_____	_____	_____
¿LO COMPRARÍA?	519	335	662	875	082
SÍ	_____	_____	_____	_____	_____
No	_____	_____	_____	_____	_____

Comentarios: _____

¡Muchas gracias!

Figura 5. Formato de la evaluación sensorial de aceptación de bebidas funcionales de lactosuero-avena con inulina y ultrasonido o pasteurización (Lawless y Heymann, 2010). Porcentaje (p/v) de inulina/tiempo (min) de ultrasonido: 519 (117, 379) = 1/3; 335 (287, 524) = 2/3; 662 (991, 705) = 1/15. Control 082 (139, 647) = pasteurización 65°C por 30 min sin inulina.

APÉNDICE D

Tipo de muestra: Bebida láctea

Nombre: _____ Edad: _____ Fecha: _____

Instrucciones:

Pruebe las muestras y ordénelas de la menos a la más favorita según sea su preferencia. Indique los códigos de las muestras en las líneas.

Menos favorita _____

Más favorita _____

Comentarios: _____

¡Muchas gracias!

Figura 6. Formato de la prueba de preferencia sensorial con escala hedónica de cinco puntos para la evaluación de bebidas de lactosuero-avena con inulina y ultrasonido o pasteurización.