



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE UNA BEBIDA FUNCIONAL A BASE DE LACTOSUERO
DULCE Y EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS
BIOACTIVOS A TRAVÉS DE UN PROCESO DE FERMENTACIÓN CON
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

EMMA NATHALY FABIAN ELIZALDE

CDMX, 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESOR: PATRICIA SEVERIANO PEREZ
VOCAL: PROFESOR: ALEIDA MINA CETINA
SECRETARIO: PROFESOR: JUAN CARLOS RAMIREZ OREJEL
1ER. SUPLENTE: PROFESOR: BRENDA SALAZAR SANCHEZ
2° SUPLENTE: PROFESOR: ANA KARINA ELIAS PATIÑO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM). Laboratorio II del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica (DNAyB-FMVZ).

ASESOR DEL TEMA:

Juan Carlos Ramirez Orejel

SUPERVISOR TÉCNICO:

SUSTENTANTE (S):

Emma Nathaly Fabian Elizalde

Índice

Contenido

Introducción.....	5
Hipótesis.....	7
Objetivos.....	8
1.0 Marco teórico.....	9
1.1 Consumo de bebidas lácteas en México	9
1.2 Bebidas de Lactosuero	10
1.3 Productos lácteos fermentados y sus beneficios.....	13
1.4 Probióticos y prebióticos en bebidas	15
1.5 Fuente de péptidos bioactivos	17
1.6 Generación de lactosuero como un subproducto en la elaboración de queso	19
1.7 Proteínas presentes en el lactosuero.....	22
1.8 Uso del lactosuero en la industria de alimentos	22
2.0 Metodología.....	24
2.1 Obtención y estandarización del lactosuero	25
2.2 Pasteurización	25
2.3 Inoculación e incubación de la base láctea.....	25
2.4 Determinación de viabilidad de BAL	26
2.5 Evaluación de hidrolisis de proteínas	26
2.6 Formulación	27
2.7 Análisis Químico Proximal AQP.....	27
2.8 Análisis microbiológico de la formulación final	28
2.9 Evaluación sensorial.....	28
3.0 Discusión de resultados.....	31
3.1 Obtención y Estandarización del Lactosuero	31
3.2 Inoculación e incubación de la base láctea.....	32
3.3 Determinación de la viabilidad del BAL	35
3.4 Evaluación de hidrolisis de proteínas	35
3.5 Formulación	37
3.6 Etiquetado	38
3.7 Análisis microbiológico de la formulación final	40
3.8 Evaluación sensorial.....	40

Conclusiones 48
Referencias:..... 49

Introducción

A pesar del constante cambio y los múltiples factores que definen los hábitos alimenticios de la sociedad, la leche y sus derivados siguen considerándose alimentos altamente nutritivos ya que son ricos en proteínas, lípidos, vitaminas y microminerales como Ca^{2+} , Fe, Zn esenciales para la dieta del ser humano, además se ha asociado de forma inversa con enfermedades de gran prevalencia como la obesidad, la DM₂, la hipertensión arterial (HTA) o el SM, por lo que es importante que sigan formando parte de la canasta básica (Jeantet, R. 2007).

La Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural destacó que la participación de la producción de lácteos nacional pecuaria es de 54.8 % y el consumo per-cápita de leche es de 124.3 litros, que ha ido en constante aumento (SADER, 2022).

El queso es uno de los derivados más importantes de la leche se demostró que el consumo de queso aporta el doble de energía, 18 veces más lípidos, un 50% más de calcio y más del doble de sodio comparado con la leche y yogurt (Salas, J. 2017). Sin embargo, la producción de queso demanda gran cantidad de leche, para obtener un kilogramo de queso se necesitan aproximadamente 10 L de leche lo que genera como subproducto 9 litros de lactosuero, cuyos principales usos son alimentación animal, suero en polvo y concentrado de proteína (Montalvo, M. 2017).

La obtención del lactosuero se puede dar de dos formas por acidificación y coagulación de la caseína por efecto de un ácido o una enzima produciendo la “cuajada”, que separa esta proteína de la fracción líquida en la que prevalecen compuestos hidrosolubles. En comparación con la “cuajada”, el lactosuero contiene una mayor concentración de lactosa, principal sustrato en la fermentación ácido-láctica. El lactosuero es considerado un desecho, representa un desperdicio de nutrimentos ya que contiene cerca del 55 % del total de los componentes de la leche entera; como lactosa, proteínas, materia grasa y sales minerales (Parra, 2009).

La producción mundial de suero de queso es alrededor de 200 millones de toneladas por año (estimado con base en la producción total de queso), de la cual Europa produce cerca del 50%, Estados Unidos de Norteamérica 3% y México 0.6% (González O., 2018), este es un producto potencialmente contaminante, ya que por su composición química genera 3.5 kg de

DBO por cada 100 L de lactosuero (Parras, 2009) y considerando la escala de clasificación de calidad de agua superficial con base en la DBO₅ en SEMARNAT (2015) señala como fuertemente contaminada el agua con una con DBO₅ > 30 mg/L (corresponde a las categorías contaminada = descargas de aguas residuales crudas, con concentraciones de 30 a 120 mg/L y, fuertemente contaminada = fuerte impacto de descargas de aguas residuales crudas, con concentraciones superiores a los 120 mg/L).

Una industria quesera media que produzca diariamente 40,000 L de suero sin depurar genera una contaminación diaria similar a una población de 1,250,000 habitantes. Por ello, es importante que las industrias lácteas utilicen el lactosuero con el fin de no contaminar el ambiente (Valencia, 2019).

En el presente trabajo se propuso aprovechar el lactosuero dulce de bovino, para generar un producto lácteo fermentado, adicionando un concentrado de proteínas, inulina y probióticos (*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*) para complementar las características nutrimentales del lactosuero y se saborizó con pulpa de mango ataulfo para disminuir las notas saladas por el gran contenido de minerales. Aunado a esto, se planteó que las bacterias ácido-lácticas podrán realizar una hidrólisis de las proteínas para generar péptidos bioactivos y ofrecer una bebida funcional que permita mejorar la salud y la calidad de vida.

Por último, se realizó una prueba afectiva para conocer la aceptación del producto por parte de los consumidores.

¹ Demanda Bioquímica de Oxígeno: Es una estimación de la cantidad de oxígeno que requiere una población microbiana heterogénea para oxidar la materia orgánica de una muestra de agua en un periodo de 5 días. NMX-AA-028-SCFI-2001

² Lactosuero líquido resultado del desuerado en la producción de queso panela.

³ WPC: Wey Protein Concentrate 80 % de proteína

Hipótesis

General

- Si se desarrolla una bebida láctea sabor mango a base de lactosuero dulce de bovino, enriquecida con seroproteínas de bacterias ácido lácticas e inulina como prebiótico entonces se obtendrá una bebida fermentada funcional con péptidos bioactivos que sea aceptada por los consumidores.

Particulares

- Si se adicionan proteínas de suero a él lactosuero se podrá elaborar una bebida funcional rica en proteínas que posiblemente durante la fermentación haya producción de péptidos activos

- Si se adiciona una mezcla de prebióticos y probióticos a la bebida a base de lactosuero entonces estas bacterias fermentaran la lactosa produciendo ácido láctico, aumentando la cantidad de bacterias benéficas en la microbiota intestinal.

- Si se desarrolla una bebida fermentada a base de lactosuero saborizada con mango ataulfo entonces tendrá una mayor aceptación por el consumidor.

Objetivos

General

- Desarrollar una bebida láctea funcional sabor mango a base de lactosuero dulce de bovino enriquecido con seroproteínas, prebióticos y probióticos para disminuir la contaminación que este provoca al ambiente.

Particulares

- Evaluar el efecto proteolítico de los probióticos durante el proceso de fermentación para generar péptidos bioactivos que permitan obtener una bebida láctea funcional.

- Adicionar a la bebida láctea la mezcla de probióticos como *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius ssp thermophilus* y prebiótico (Inulina) para crear una bebida que aumente la cantidad de bacterias benéficas en la microbiota.

- Desarrollar una bebida fermentada funcional a base de lactosuero dulce de bovino, saborizado con mango ataulfo y evaluar el grado de aceptación por parte de los consumidores.

1.0 Marco teórico

1.1 Consumo de bebidas lácteas en México

A lo largo de la historia, la industria láctea se ha transformado a partir de los cambios alimenticios que surgen en la sociedad. En la primera parte del siglo XX se favoreció un rápido crecimiento de las granjas lecheras, impulsado por las demandas de productos lácteos a nivel mundial, se dio lugar a una expansión en la producción de queso y caseína (Smithers, 2008), el aumento en la compra de miles de hogares que llevaban a casa leche y queso como parte de una dieta cotidiana, aceleró los requerimientos productivos, desequilibrando las condiciones de asimilación natural de los residuos resultantes en los espacios propios de la industria láctea. México no fue la excepción, a pesar de que en la época prehispánica no se contaba con este alimento, fue muy bien recibido tras la llegada de Europea.

De acuerdo con datos del SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2020) en la estimación mundial de producción de leche, México ocupa el octavo lugar a nivel mundial con 12, 275,864 de leche producida durante el 2019, a finales de este año se observó un ascenso a en la producción de leche comparado con el año anterior obteniendo 267,600 litros más que en 2018 y se estimó un aumento del 2.1% durante el año 2020 (Figura 1.1).

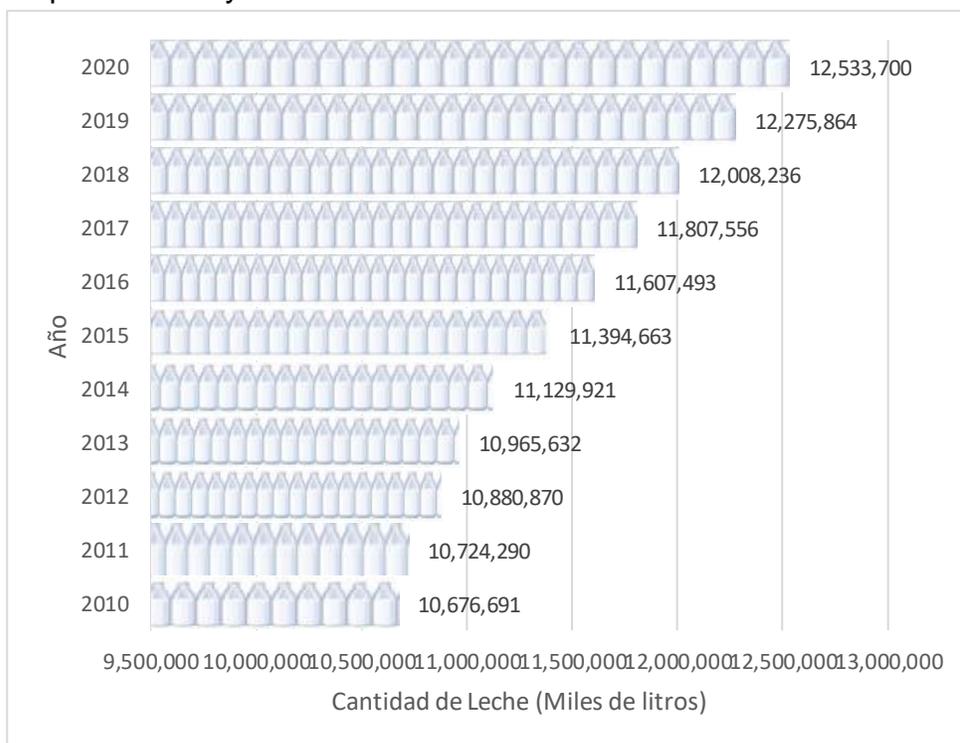


Figura 1.1. Producción de leche del año 2010 al 2020, SIAP Mayo 2020

Además de consumir la leche de forma directa, existen diferentes derivados, como el yogur, crema, mantequilla y quesos, cada uno con diferentes variantes como yogur griego, leche condensada, leche descremada, y en el caso de los quesos manchego, amarillo, doble crema entre otros Figura 1.2 , nos enfocaremos en la producción de queso ya que durante este proceso se obtiene como producto secundario el lactosuero, el cual la mayoría de la industria lo desecha sin ser tratado adecuadamente, y provocando un alto riesgo de contaminación de subsuelo y agua.



Figura 1.2. Producción de diferentes tipos de queso en México, SIAP Mayo 2020

1.2 Bebidas de Lactosuero

En el mercado se encuentran muchas bebidas a base de leche, como es el yogurt en diferentes presentaciones y diferentes sabores, batidos, licuados entre otros que se desarrollan a lo largo del mundo.

El yogurt se caracteriza por ser un alimento versátil fácil de consumir, por sus sabores, texturas y por sus propiedades nutricionales se pueden encontrar proteínas de buena calidad, vitaminas, minerales y bacterias que equilibran la microbiota intestinal, ayudan a la absorción de nutrimentos y facilitan la digestión de la lactosa (NOM-181-SCFI/SAGARPA-2018). Se encuentran en diferentes presentaciones griego, natural, batido, bebible, con trozos de fruta,

con cereales, sin grasa, sin azúcar, sin lactosa, con probióticos, malteada de yogurt, en helado entre otros.

En la Tabla 1.1 se muestra la definición de yogurt de acuerdo a la NOM-181-SCFI/SAGARPA-2018

Tabla 1.1. Definición de Yogurt. NOM-181-SCFI/SAGARPA-2018

Clasificación	Definición
Yogurt natural	Es aquel que no contiene edulcorantes, azúcares añadidos, frutas, vegetales, cereales, saborizantes o aromatizantes, y pueden contener aditivos permitidos conforme a la legislación nacional vigente.
Yogurt natural con endulzantes	Es el yogurt natural que sólo se mezcla con azúcares o edulcorantes con el fin de endulzarlo, y que puede contener aditivos permitidos conforme a la legislación nacional vigente.
Yogurt saborizado	Es el yogurt al que se le adiciona cualquier tipo de edulcorantes, azúcares añadidos, saborizantes o aromatizantes, y que puede contener aditivos permitidos conforme a la legislación nacional vigente.
Yogur con fruta u otros alimentos	Es el yogurt al que se le adicionan edulcorantes, azúcares, aromatizantes, saborizantes, frutas o vegetales (en forma de puré, pulpa o jugo), miel, chocolate, cacao, café, cereales, nueces, frutos secos y especias y que puede contener aditivos permitidos conforme a la legislación nacional vigente.

El consumo de yogurt durante los últimos años ha tenido un descenso de producción debido a la baja demanda que se desarrolló durante los años 2019 a 2021.

En 2021, en México 607,253 se consumieron mil toneladas de yogurt, cuando en 2011 se consumieron casi 785,097 mil toneladas, con un decrecimiento total de 2.5% en estos años. Teniendo preferencia el consumo de crema, leche en polvo, quesos y mantequilla, también se puede observar que el consumo de yogurt es inestable al tener su máximo consumo en el año 2012 con 803,419 toneladas y el consumo mínimo en el año 2021 con 607,253 toneladas (Figura 1.3).

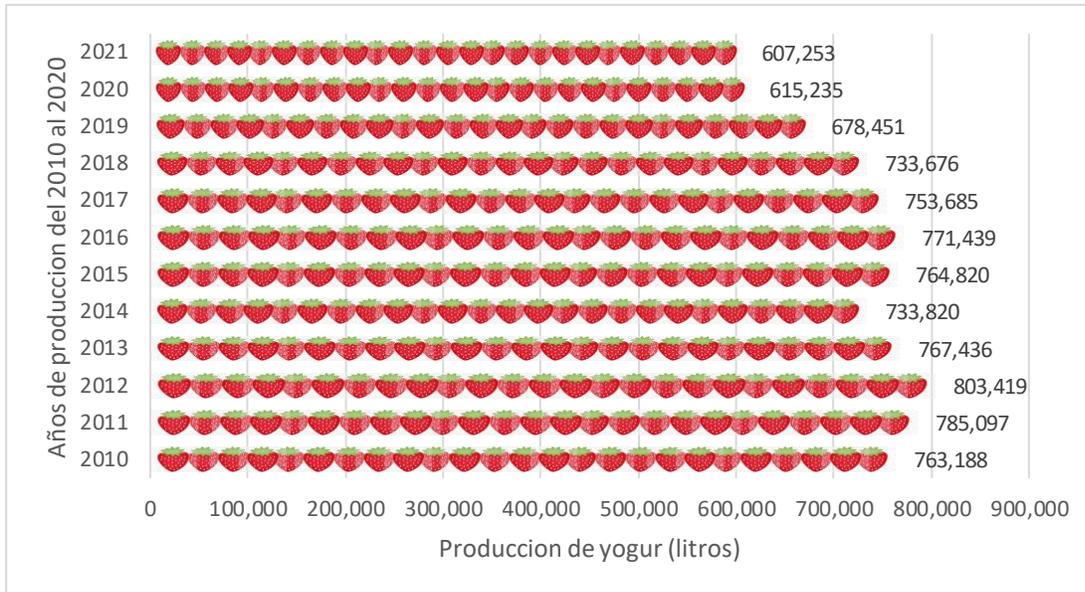


Figura 1.3. Consumo de yogurt del año 2011 a 2021, (CANILEC, 2020).

Es por eso que la innovación en un producto que pueda competir con el yogurt podría incrementar el consumo de bebidas fermentadas frutales, en la Figura 1.4 se observa que el consumo de yogurt y leches fermentadas en México del año 2011 al 2021 fue del 1% sin embargo, el consumo de lactosueros tiene un 6 % mostrando que el consumo de este tipo de bebidas está siendo aceptada y consumida con mayor proporción que las bebidas comunes.

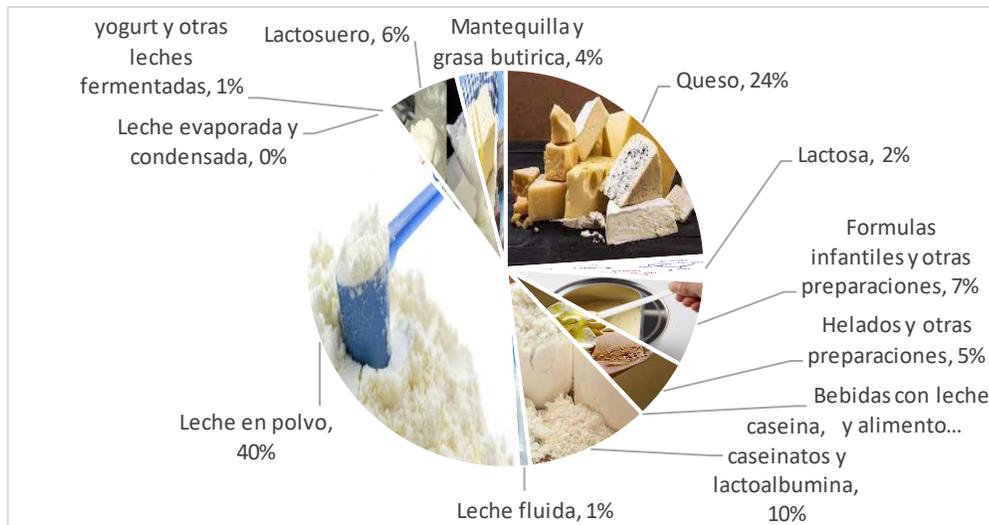


Figura 1.4. Consumo de productos a base de leche en México de 2011 a 2021, (CANILEC 2020).

1.3 Productos lácteos fermentados y sus beneficios

La fermentación es un proceso que transforma sustratos en compuestos secundarios con la ayuda de microorganismos como bacterias, hongos y levaduras. Este proceso se da ya que existen especies microbianas que pueden obtener su energía en ausencia de O₂ a través de la vía catabólica de la fermentación. La única diferencia con respecto a la respiración está en el aceptor final de electrones (Angelidaki et al. 2011; Dunford 2012; Madigan et al. 2015).

La fermentación tiene muchas ventajas en los alimentos como mejorar su calidad aumentando sus características como sabor, el gusto y la palatabilidad (Azokpota 2015, citado de Sankaranarayanan, 2020); la producción de metabolitos como diacetilo, acetoína y acetaldehído, aportan el aroma y sabor característicos de todos los productos lácteos fermentados, también prolongan la vida útil, conservar el aroma y el perfil nutricional (Giraffa 2004; Katz 2012 citado de Sankaranarayanan, 2020); e inhibir el crecimiento de microorganismos no deseados como se muestra en la Figura 1.5.

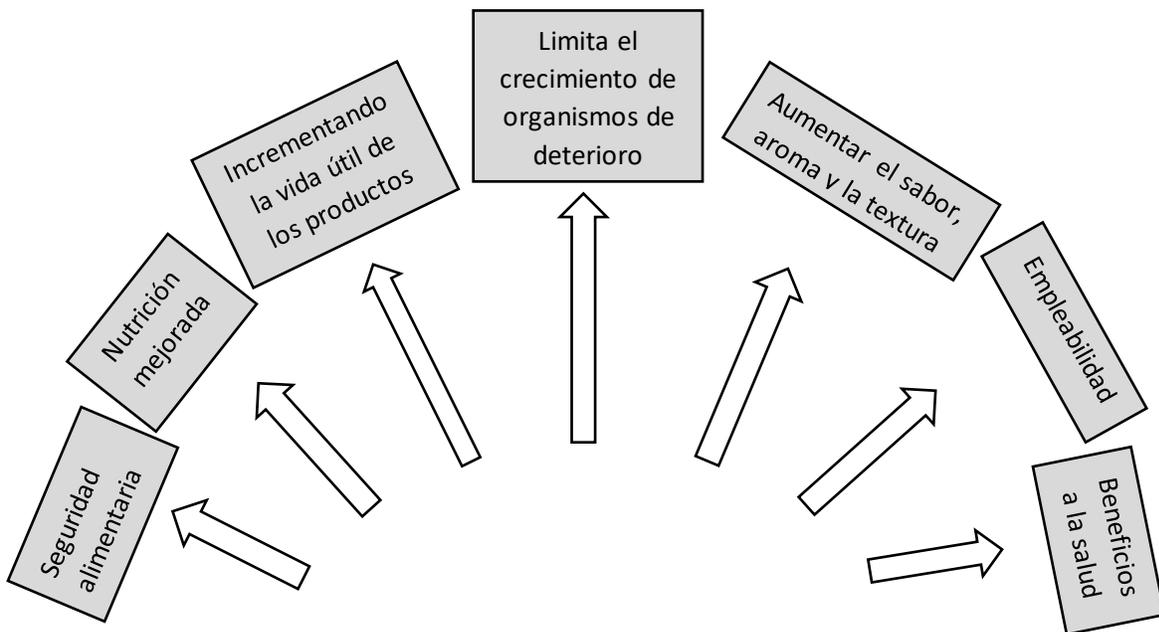


Figura 1.5. Beneficios de los alimentos fermentados, Sankaranarayanan 2020

Durante el proceso de fermentación, la producción de varios ácidos orgánicos dióxido de carbono, péptidos antimicrobianos y bacteriocinas suprime el crecimiento de microorganismos y el proceso actúa como un conservante natural. Los géneros básicos que

comprenden las BAL son *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, aunque recientes revisiones taxonómicas han propuesto la inclusión de otros géneros, como *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*. *Lactobacillus*, *Carnobacteria* y alguna especie de *Weissella* (Drider D, 2016) definatoria su principal función es la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares. (Drider D, 2016). Existe una amplia diversidad de productos lácteos fermentados, que se pueden clasificar en dos grupos, quesos y leches fermentadas (Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Bebidas fermentadas a base de leche de distintos animales, Sankaranarayanan 2020

Fuente	Nombre	Bacteria utilizada	Origen
Leche de vaca	Queso	<i>Lc. lactis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Leuconostoc spp. Peni.</i> <i>Roqueforti</i>	Universal
Leche de búfalo	Dahi	<i>lactis</i> , <i>Strep. cremoris</i> , <i>Candida</i> <i>s</i>	La India
Leche de cabra	kéfir	<i>L. brevis</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>S.cerevisiae</i>	Rusia
Leche cualquier especie	Yogur	<i>L. Strep. thermophilus</i> , <i>Lb.</i> <i>acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium sp</i>	América, Australia, Europa
Leche de vaca	Rob	<i>L. acidophilus</i> , <i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> ; <i>S.cerevisiae</i> , <i>Candida kefy</i>	Sudan
Leche de cabra	Pastel de leche	<i>Lactobacillus sp.</i> <i>Lactococcus sp</i>	China

A lo largo del desarrollo de los productos lácteos fermentados ha aumentado el conocimiento y el interés por entender los efectos de su consumo en la salud humana, principalmente los debidos a la acción de las BAL probióticas, o a otros factores relacionados con estos microorganismos, como la hidrólisis de lactosa y proteínas.

Entre los padecimientos más comunes que han podido tratarse y prevenirse mediante el uso de BAL probióticas están la diarrea infantil asociada con antibióticos, diferentes investigaciones demuestran que las bifidobacterias y *Streptococcus thermophilus* en leches fermentadas disminuyen considerablemente el riesgo de diarreas en infantes (Olagnero et. al., 2007)

La hidrólisis de las proteínas de la leche por medio de bacterias ácido lácticas, tiene como función la producción de fragmentos de proteínas (péptidos) que contribuyen al sabor (particularmente en quesos madurados), los cuales pueden tener ciertas actividades farmacológicas (es decir, pueden ayudar a resolver problemas de salud como disminuir la presión arterial, prevenir la formación de trombosis, brindar un efecto ansiolítico y relajante, así como modular el sistema inmune, entre otras) (Drider D, 2016).

1.4 Probióticos y prebióticos en bebidas

El uso de prebióticos y probióticos han tenido gran impacto en el desarrollo de alimentos al proporcionar beneficios al consumidor, mejorando la actividad de la microbiota intestinal.

Los probióticos se descubrieron tiempo atrás y se les nombro así desde el año 1965, donde se definió como; microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos, al paso de los años se ha mejorado esta definición por ejemplo el comité de expertos de la FAO/OMS define los probióticos como microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del consumidor y en el caso de los prebióticos se define como ingrediente fermentable selectivo que permite cambios específicos, además confiere beneficios sobre la composición y/o actividad de la microbiota intestinal (Gibson, G. R., et al., 2004, tomada Drider D, 2016).

A diferencia de los probióticos, la mayoría de los prebióticos son utilizados como ingredientes de alimentos. Entre los prebióticos más conocidos se encuentra la inulina, fructanos que consiste en una mezcla de oligómeros y polímeros mayores formados por uniones β -(2-1) fructosil fructosa (Valdovinos et al., 2016) y probióticos bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque otros microorganismos tales como *Enterococcus*, *Streptococcus*, *E. coli* e incluso levaduras como *Saccharomyces boulardii* respectivamente (Drider D, 2016).

Las bacterias utilizadas en la elaboración de bebida fermentada a base de lactosuero son *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius ssp thermophilus*.

Los Lactobacillus los describe Drider D, 2016 como bacterias Grampositivas, no esporuladas, de morfología bacilar o cocobacilos. Son fermentativos, microaerófilos y organotróficos, requiriendo medios ricos en nutrientes para su crecimiento, rango de temperatura de crecimiento de 2 a 53°C, y pueden crecer en intervalos de pH de 3 a 8, aunque estas características varían dependiendo de la especie. Sus rangos óptimos de crecimiento son de 30 a 40°C y a pH 5.5 a 6.2.

Algunos ejemplos de los beneficios a la salud que se han descubierto en la fermentación por Lactobacillus son:

- ✓ Disminución de la intolerancia a la lactosa, ya que la β -galactosidasa que aportan contribuye a la hidrólisis de este azúcar en el intestino delgado.
- ✓ Mejora de los procesos diarreicos, y en cierto modo prevención de determinados tipos de diarrea, poseen la capacidad de desplazar a patógenos del tracto digestivo mediante fenómenos de exclusión competitiva tales como competencia por los sitios de unión a mucosas, competencia por los nutrientes, o producción de sustancias antimicrobianas como ácidos orgánicos y bacteriocinas. También contribuyen a la eliminación de patógenos de forma indirecta, estimulando el sistema inmunitario asociado a mucosas (Drider D, 2016).
- ✓ Modulación del sistema inmunitario, estimulando las defensas frente a patógenos y disminuyendo la respuesta a alérgenos.
- ✓ Prevención de determinados tipos de cáncer, por disminución de la síntesis de enzimas procancerígenas en heces y degradación o adsorción de sustancias cancerígenas
- ✓ Mejora de procesos inflamatorios intestinales.

La inulina es un carbohidrato no digerible que está presente en muchos vegetales, frutas y cereales. En la actualidad, a nivel industrial se extrae de la raíz de la achicoria (*Cichorium intybus*) y se utiliza como ingrediente en alimentos funcionales, sus derivados (oligofructosa, fructooligosacáridos) son generalmente llamados fructanos, están constituidos por cadenas lineales de fructosa.

Su propiedad más estudiada es como prebiótico, tiene la capacidad selectiva de estimular el crecimiento de un grupo de bacterias en el colon (bifidobacterias y lactobacilos), con la

consecuente disminución de otras especies que pueden ser perjudiciales (*E. coli* y bacterias de la especie *Clostridium spp*).

Entre otras propiedades beneficiosas a la salud de la inulina, da la capacidad de reforzar las funciones inmunológicas (ante cáncer o tumores), el aumento de la biodisponibilidad de minerales, la mejora del metabolismo de las grasas y de la respuesta glicémica (Madrigal L. 2017).

De manera general se puede decir que los prebióticos y probióticos guardan cierta relación, la cual se asocia a que los primeros ejercen su mecanismo de acción afectando a las bacterias intestinales, aumentando el número de bacterias anaerobias beneficiosas y disminuyendo la población de microorganismos patógenos, mientras que los probióticos afectan la microbiota intestinal estimulando los mecanismos inmunitarios de la mucosa y los no inmunitarios a través de una competencia con patógenos potenciales

(Drider D, 2016).

1.5 Fuente de péptidos bioactivos

Se define como alimentos funcionales a los comestibles que proporcionan un beneficio específico de salud para quien lo consume, además de su valor nutrimental (Smithers, 2008). Son alimentos en los que algunos de sus componentes afectan funciones del organismo de manera específica y positiva, lo que va más allá de su valor nutritivo tradicional (Olagnero, y otros, 2007).

Los péptidos bioactivos dan a los alimentos la característica de ser funcionales en el caso de la leche se ha comprobado que contienen aminoácidos que pueden generar péptidos bioactivos. Dentro de la secuencia de la proteína intacta esta cadena de aminoácidos es inactivos y pueden ser liberados por acción de enzimas proteolíticas nativas de la leche, enzimas de bacterias ácido-lácticas o durante la digestión gastrointestinal.

La leche contiene elementos nutritivos, da protección inmunológica y suministra sustancias biológicas activas tanto a neonatos como a adultos. En general, las principales fracciones

proteínicas de la leche de vaca incluyen α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, caseínas, inmunoglobulinas, lactoferrina, y proteínas séricas menores tales como: transferrina y albúmina sérica. Se ha encontrado que los péptidos bioactivos obtenidos de las proteínas de la leche presentan funciones antimicrobianas, inmunomoduladores, antitrombóticas y de transporte de minerales (Olivares et al., 2011).

Las proteínas son fuente esencial de aminoácidos, recientemente se ha reconocido que las proteínas alimentarias ejercen muchas otras funcionalidades in vivo por medio de péptidos biológicamente activos. Dichos péptidos son inactivos dentro de la secuencia de la proteína madre y pueden ser liberados por las enzimas digestivas durante el tránsito gastrointestinal o por la fermentación parecen tener una actividad fisiológica específica in vivo. (Deeth H 2019).

Las BAL son conocidas por poseer una variedad de enzimas proteolíticas capaces de utilizar las proteínas como una fuente de nitrógeno para garantizar su crecimiento durante la fermentación, no solo los quesos son fuentes de péptidos bioactivos (Figura 1.6), lo es también el suero derivado; donde se han encontrado secuencias de péptidos con actividad antihipertensiva utilizando enzimas digestivas o microbianas o una combinación de ambas (Llanez et. al., 2005) además, se ha demostrado que las proteínas del suero son superiores a otras proteínas alimentarias para la supresión del desarrollo de tumores.

Se ha demostrado que bacterias ácido-lácticas como *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, tienen actividad proteolítica durante el proceso de fermentación de la leche, y por lo tanto fraccionan las proteínas a péptidos y aminoácidos libres; algunos de son péptidos bioactivos (González L et al., 2011).

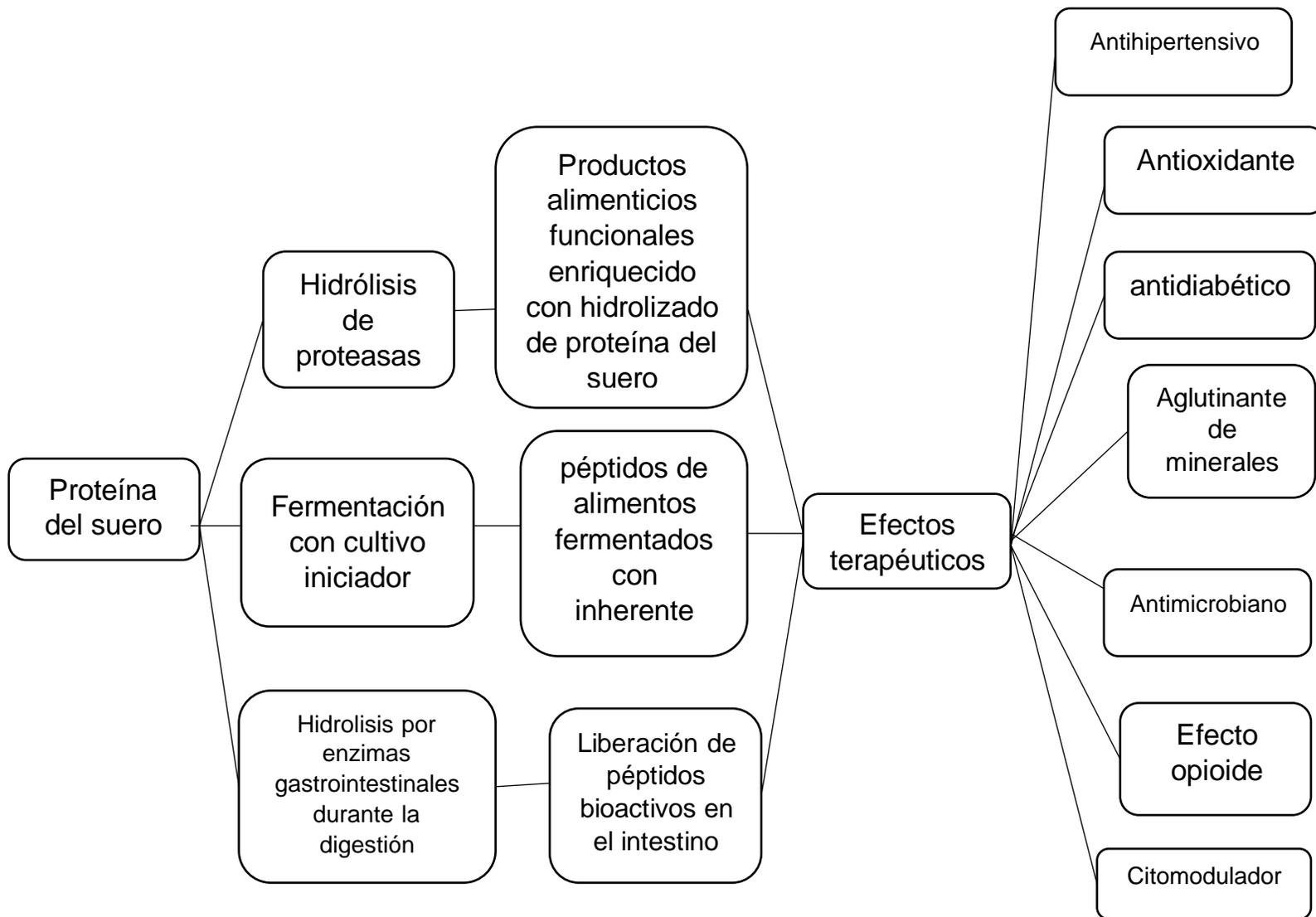


Figura 1.6. Producción de péptidos bioactivos y sus efectos, Deeth H ,2019.

1.6 Generación de lactosuero como un subproducto en la elaboración de queso

La leche es esencialmente una emulsión de grasa y proteína en agua, junto con azúcar disuelta (carbohidratos), minerales y vitaminas. Estos constituyentes están presentes en la leche de todos los mamíferos, aunque sus proporciones difieren de una especie a otra y dentro de las especies. Sin embargo, existen muchos otros micronutrientes muy importantes, como vitaminas, aminoácidos esenciales y minerales traza. El queso es una de las formas de transformación de la leche, que permite conservar su valor nutritivo y mejorar sus características organolépticas y aumentar su vida útil. Es uno de los mejores alimentos, es rico en proteínas, nutrientes esenciales para la vida (Duran F. 2022) (Figura 1.7).

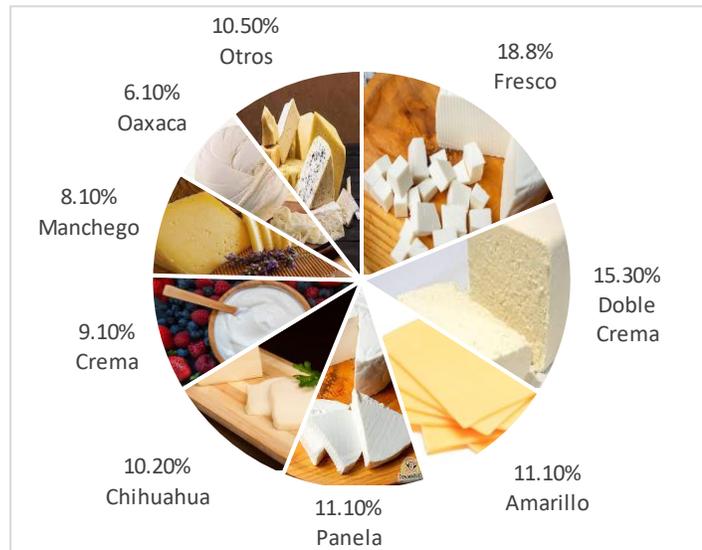


Figura 1.7 Producción de diferentes tipos de queso en México, SIAP Mayo 2020

En la NOM-243-SSA1-2010 Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba donde se define lo siguiente conceptos:

- ✓ **Leche:** Secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas o de cualquier otra especie animal, excluido el calostro.
- ✓ **Queso:** Productos elaborados de la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida de la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior, por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado.
- ✓ **Suero de leche:** Líquido obtenido de la coagulación de la caseína de la leche, mediante la acción de enzimas coagulantes de origen animal, vegetal o microbiano, por la adición de ácidos orgánicos o minerales de grado alimentario; acidificación por intercambio iónico hasta alcanzar el punto isoeléctrico de la caseína.

La cuajada o coagulación de la leche se da mediante la acidificación del medio o por la adición del cuajo. La actividad enzimática del cuajo principalmente quimosina provoca la desestabilización de las micelas de caseína, que se aglomeran y forman un gel, en el que quedan atrapadas el resto de los componentes de la leche, este gel resultante se conoce como cuajada (Gil 2017). Si se realiza por acidificación de la leche, se obtiene la cuajada ácida, si se adiciona una enzima el resultado es una cuajada dulce en la actualidad se emplean enzimas proteolíticas de origen microbiano o fúngico en la industria. Durante el proceso de elaboración de la cuajada, se somete a procesos de agitación mecánica y calentamiento gradual esta combinación da lugar a las sinéresis o desuerado, es decir, la separación del lactosuero de la de la cuajada de caseína.

La cuajada ácida se genera por la sensibilidad a la adición de ácidos o al desarrollo de bacterias acidificantes, pues los iones H^+ que proceden de la disociación del ácido neutralizan las cargas eléctricas negativas de las micelas esto se da a un pH de 4.6. La cuajada dulce o enzimática se da por enzimas proteolíticas como la quimosina, que son capaces de hidrolizar la k caseína, esta ruptura se da en los aminoácidos 105 fenilalanina y 106 metionina, la pérdida de este fragmento hidrofílico impide mantener la estabilidad de la micela. El lactosuero que se extrae contiene la mayor parte de lactosa, las proteínas no coaguladas y parte variable de minerales y vitaminas (Gil 2017). Se ha observado que a partir de 10 L de leche se producen aproximadamente 9 L de suero y 1 kg de queso. Por lo que es de vital importancia de aprovechar el lactosuero y no desecharlo provocando contaminación.

La composición del lactosuero y la leche entera (Tabla 1.3) son diferentes principalmente por la concentración de lípidos y proteínas, se observa que ambos macrocomponentes se encuentran en mayor concentración en la leche entera, sin embargo, se sabe que las proteínas de mayor calidad permanecen en el suero lácteo. Por otro lado, la concentración de carbohidratos (lactosa) presenta una mínima diferencia. La composición química del lactosuero lo hacen un potencial contaminante cuando se elimina inadecuadamente.

Tabla 1.3 Composición química (g/100 mL) de la leche entera de bovino y los dos tipos de lactosuero,

	Leche entera de bovino	Lactosuero	
		Dulce	Ácido
Sólidos totales	11.94	6.78 ²	5.35 ²
Lactosa	4.79	4.6 ¹	4.5 ¹
Proteína	3.10	1.2 ¹	0.6 ¹
Lípidos	3.41	0.6 ¹	0.5 ¹
Cenizas	0.64 ³	0.60 ²	0.85 ²

1.7 Proteínas presentes en el lactosuero

Las principales proteínas presentes en el suero de la leche son α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina, que representan aproximadamente el 80% de la proteína de suero total y se componen de una alta proporción de aminoácidos esenciales como la leucina, lisina e isoleucina. El resto de las proteínas está representado por la seroalbúmina bovina, inmunoglobulinas, peptonas, caseínas solubles, lactoferrina y lactoperoxidasa, en las que también se presentan altas proporciones de aminoácidos esenciales como la treonina y la valina.

Las proteínas del lactosuero son globulares y solubles a un intervalo amplio de Ph, son proteínas sensibles al calor de forma que, cuando se somete la leche a tratamientos térmicos, parte de las proteínas del suero se desnaturalizan (Gil, A. 2017).

Por la composición química de las proteínas mayoritarias del lactosuero, se considera a éste como una mejor fuente de aminoácidos esenciales en comparación con la proteína de huevo, carne y soya; principalmente por ser una fuente rica y equilibrada de los aminoácidos azufrados, sumado a esto, el lactosuero contiene una gran proporción de aminoácidos de cadena ramificada, considerados importantes en la salud muscular y como reguladores metabólicos (Smithers, G. 2015)

1.8 Uso del lactosuero en la industria de alimentos

El uso del lactosuero en la industria alimentaria, como fuente de proteínas de buena calidad tiende a aumentar conforme avanza el conocimiento de su composición y sus características fisicoquímicas. A través del tiempo se han mejorado las técnicas de purificación y

concentración de la proteína del lactosuero lo que además promueve el aumento de su valor comercial y de aplicación en alimentos de buena calidad (Figura 1.8) (Smithers, G. 2008).

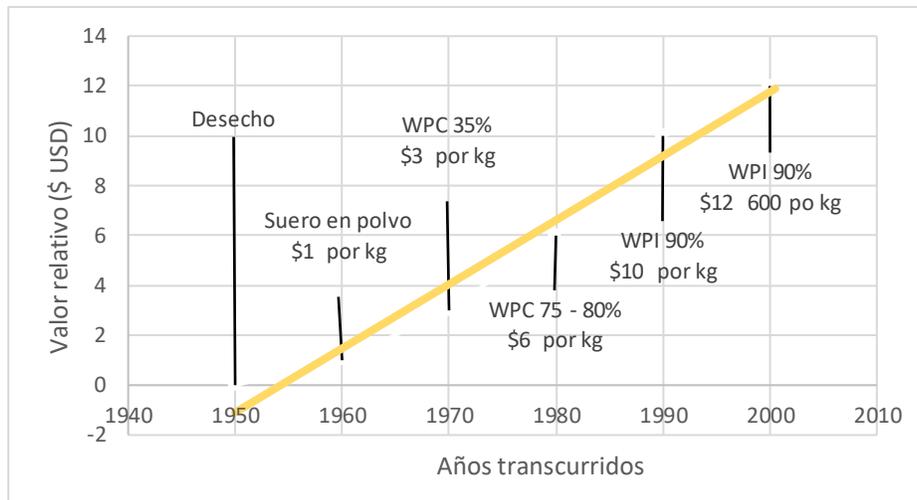


Figura 1.8 Desarrollo y sofisticación del mercado y tecnología en el uso del lactosuero de 1965 a 2000. Smithers, 2008.

La forma más común de aprovechar el lactosuero líquido es generada de los concentrados de suero de leche, que se obtienen por ultrafiltración y en la actualidad se comercializan con un mínimo de 80 % de proteína, estos concentrados WPC (Whey Protein Concentrate). Actualmente se ha favorecido su uso debido a su alta solubilidad, capacidad emulgente, espesante y espumante, sumado a su capacidad de formar geles y retener agua, estas características pueden ser aprovechadas para utilizarlos como ingredientes en otros productos alimenticios como quesos procesados y análogos, cremas y en embutidos cárnicos (Badui et al, 2006; Fennema, 1995).

Las características químicas de las proteínas del lactosuero tienen un papel importante en la formación de estructuras de productos lácteos como el queso y el yogurt, así como en la estabilización de los glóbulos de grasa en los productos homogeneizados (Zimmermann et. al. 2010) La capacidad de las proteínas de suero para formar microestructuras mejora la textura de productos bajos en grasa y en la formación de micropartículas gracias a estas interacciones se ha ampliado la base de aplicaciones de alimentos para productos de proteína de suero más allá de las áreas tradicionales que dependen de la gelificación, la aireación y la emulsificación (Smithers, 2015).

2.0 Metodología

En la figura 2.1 se muestra la metodología que se siguió para la elaboración de la bebida láctea fermentada.

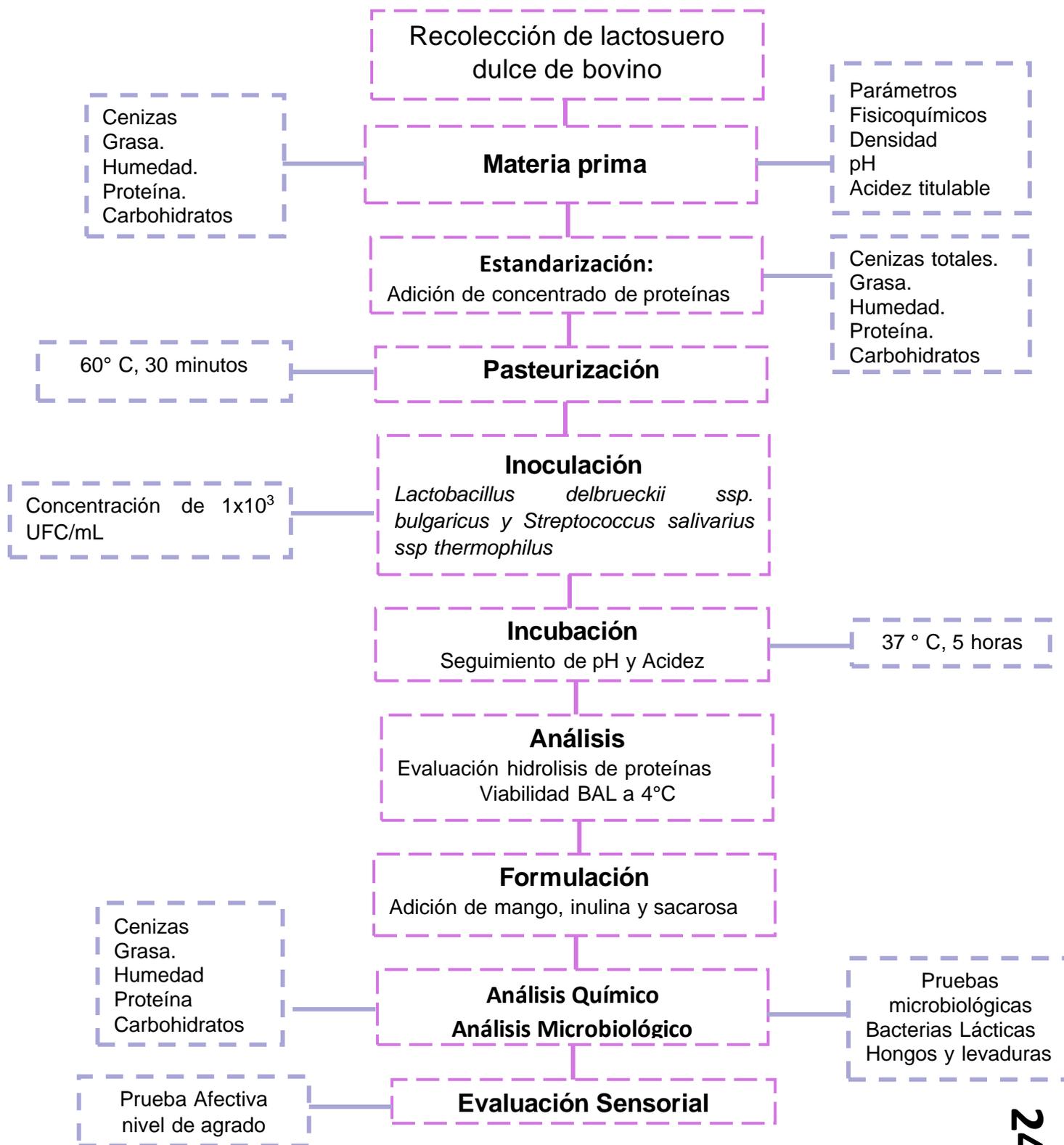


Figura 2.1. Diagrama de flujo general de la elaboración de bebida de lactosuero

2.1 Obtención y estandarización del lactosuero

El lactosuero empleado fue recolectado del Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM). Este se trasladó al Laboratorio II del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica (DNAyB-FMVZ).

Los parámetros fisicoquímicos que se le midieron fueron el pH, este procedimiento se realizó con un potenciómetro (Conductronic pH 120), la acidez titulable se midió por una titulación volumétrica y se almacenó a 4 °C, durante un período no mayor a siete días.

Se realizó un Análisis Químico Proximal al lactosuero y después de la estandarización.

- ✓ **Cenizas totales.** Método gravimétrico (AOAC 945.46)
- ✓ **Grasa.** Método de Gerber (Nielsen, 2013)
- ✓ **Humedad.** Método gravimétrico (AOAC 950.46)
- ✓ **Proteína.** Kjeldahl (AOAC 920.105)
- ✓ **Sólidos totales** (AOAC 925.105 1990)
- ✓ La concentración de hidratos de carbono totales se estimó por diferencia

Se estandarizó al 3% la concentración de proteína y 12% de sólidos totales en la bebida de lactosuero para igualar la cantidad de sólidos con respecto a la leche

2.2 Pasteurización

Las condiciones de pasteurización fueron 60° C por 30 minutos. Terminando el proceso de pasteurización se almaceno la formula láctea a 4°C.

2.3 Inoculación e incubación de la base láctea

La inoculación se realizó bajo condiciones de asepsia con bacterias liofilizadas BAL Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus y Streptococcus salivarius ssp thermophilus

(BIOPROX®) a una concentración de 1×10^3 g, la temperatura se ajustó a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ y se mantuvo durante 5 horas.

2.4 Determinación de viabilidad de BAL

La determinación de viabilidad de las bacterias se determinó siguiendo la metodología AOAC 920.105 monitoreando el pH (Conductronic pH 120) y la acidez titulable por medio de una titulación volumétrica (usando NaOH 0.1 N como patrón primario y fenolftaleína como indicador, % ácido láctico), durante 5 horas directamente de la muestra, se midió cada 40 minutos.

2.5 Evaluación de hidrolisis de proteínas

El perfil peptídico de la muestra se determinó por el método de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE de acuerdo con Laemmli (1970).

- ✓ **Solubilización de proteínas lácteas:** se utilizó una disolución amortiguadora de solubilidad Bs (buffer de solubilidad), constituida por borato de sodio (30 mM) y EDTA (50 mM; pH 8.3), como la disolución amortiguadora de muestra Bm (buffer de muestra) constituida por urea (6 M), EDTA (67 mM), ácido 3 morfolino propanosulfónico (MOPS, 42 mM), Tris-Base (167 mM) y DTT (17 mM; pH 8.5). Esta mezcla se mantuvo a 800 r.p.m., a 40°C , durante 30 min (Thermomixer Comfort, Eppendorf).
- ✓ **Recuperación de la fracción soluble:** Se centrifugó a 18 000 g a 4°C , durante 30 min (centrífuga Modelo. 5430 R, Eppendorf) y se recuperó la fracción soluble a la que se determinó el perfil electroforético (SDS-PAGE).
- ✓ **Ensayos de electroforesis de acuerdo con Laemmli (1970).** Se emplearon geles de poliacrilamida para la concentración (4 % T, 2.6 % C) y separación (15 % T, 2.6 % C) de las proteínas lácteas bajo condiciones reductoras y no reductoras. Se aplicó una diferencia de potencial de 100 V (PowerPac™ HV Power Supply, Bio-Rad; Mini-PROTEAN™ Tetra Cell, Bio-Rad). Las proteínas se fijaron y tiñeron con una disolución de azul de Coomassie G-250 al 0.05 %, el exceso de colorante se removió del gel con la disolución de ácido acético:metanol:agua (1:5:4) y se conservó en la disolución

constituida por los mismos disolventes (7:5:88). El análisis y la adquisición de las imágenes se realizó con el fotodocumentador Gel Doc™ XR+ Imaging System controlado por el software Image Lab™ (ver 3.0; Bio-Rad).

- a) Para la preparación de las disoluciones y muestras se utilizó reactivos de alta pureza, material desechable y agua desionizada (18.2 MΩ; sistema Simplicity UV, Millipore, USA).

Material de referencia certificado de leche fluida liofilizada (DMR-411b, CENAM), α-LA (14.1 kDa; Sigma-Aldrich) y concentrado de proteínas de suero (WPC, Lacprodan® 80, Latin Foods International S.A. de C.V.) se utilizó como referencia la separación electroforética, así como la mezcla de proteínas puras de bajo peso molecular (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range, BioRad) para la estimación de los pesos moleculares.

2.6 Formulación

Una vez generada la base láctea fermentada, se adicionó pulpa de mango ataulfo, inulina de agave y sacarosa. Las proporciones se presentan en la Tabla 2.1

Tabla 2.1. Formulación de bebida de lactosuero fermentado con pulpa de mango e inulina

Ingredientes	Proporción
Fermento natural de la formula láctea	100 mL
Pulpa fresca de mango ataulfo	40 g
Sacarosa	2 g
Inulina (BIO-AGAVE Ingredion®)	10 g

2.7 Análisis Químico Proximal AQP

Para determinar la composición del producto final, se realizó un Análisis Químico Proximal.

- ✓ **Cenizas totales.** Método gravimétrico (AOAC 945.46, 2000)
- ✓ **Grasa.** Método de Gerber (Nielsen, 2013)
- ✓ **Humedad.** Método gravimétrico (AOAC 950.46, 2005)
- ✓ **Proteína.** Kjeldahl (AOAC 920.105, 2012)
- ✓ **Sólidos totales** (AOAC 925.105 1990)
- ✓ La concentración de hidratos de carbono totales se estimó por diferencia

2.8 Análisis microbiológico de la formulación final

Para el análisis microbiológico se utilizaron las siguientes técnicas para observar, bacterias lácticas, hongos y levaduras (Tabla 2.2.)

Tabla 2.2. Metodologías utilizadas para el análisis microbiano en la bebida final

Microorganismos	Método	Procedimiento
Bacterias lácticas	Extensión en placa con Agar Man Rugosa y Sharpe (MRS)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Siembra: Se inoculó por duplicado de 1 mL de muestra sobre agar solidificado, extender con varilla de vidrio estéril. ✓ Incubación: En atmósfera aeróbica a 35-37 ° C por 3 días. ✓ Resultado: Se deben observar colonias pequeñas, lisas y de color blanco-amarillo, seleccionar placas que contengan entre 25 y 250 colonias.
Hongos y levaduras	Vertido en placa con Agar Papa Dextrosa (NOM 111-SSA1- 1994)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Siembra: Se inoculó por duplicado de 1 mL de muestra. Verter de 15 a 20 mL de agar papa dextrosa acidificado, fundido y mantenido a 45 ± 1 °C en un baño de agua -Incubación: Temperatura ambiente por 3 – 5 días. ✓ Resultado: Se deben contar las colonias de cada placa después de 3, 4 y 5 días de incubación. Después de 5 días, seleccionar aquellas placas que contengan entre 10 y 150 colonias. Si alguna parte de la caja muestra crecimiento extendido de mohos o si es difícil contar colonias bien aisladas, considerar los conteos de 4 días de incubación y aún de 3 días.

2.9 Evaluación sensorial

Para conocer la aceptación del producto se realizó una prueba afectiva a una población heterogénea de 100 alumnos de edades entre 19 a 24 años, se les compartió un vaso con

el producto final (bebida fermentada de lactosuero adicionada con pulpa de mango, inulina y sacarosa) a partir de una muestra de 25 mL, la evaluación únicamente se realizó con la bebida láctea fermentada.

Durante la degustación se les solicito evaluar el producto, usando un cuestionario de pruebas afectivas con una escala hedónica de 9 puntos, que iba del 1 (me disgusta muchísimo) pasando por el 5 (ni me gusta ni me disgusta) hasta el 9 (me gusta muchísimo). Como se muestra en el siguiente cuestionario.

Prueba afectiva para bebida a base de lactosuero

Aceptan participar en la evaluación de bebida láctea fermentada Si ___ No___
Género*: M F Edad*: _____años *OBLIGATORIO

INSTRUCCIONES: Frente a usted se presenta una muestra de yogurt bebible, pruébela y califique de acuerdo con la escala que tanto le gusta cada atributo.

SABOR

- (1) Me disgusta muchísimo
- (2) Me disgusta mucho
- (3) Me disgusta
- (4) Me disgusta un poco
- (5) Ni me gusta ni me disgusta
- (6) Me gusta un poco
- (7) Me gusta
- (8) Me gusta mucho
- (9) Me gusta muchísimo

GUSTO DULCE

- 1) Me disgusta muchísimo
- (2) Me disgusta mucho
- (3) Me disgusta
- (4) Me disgusta un poco
- (5) Ni me gusta ni me disgusta
- (6) Me gusta un poco
- (7) Me gusta
- (8) Me gusta mucho
- (9) Me gusta muchísimo

CONSISTENCIA

- 1) Me disgusta muchísimo
- (2) Me disgusta mucho
- (3) Me disgusta
- (4) Me disgusta un poco
- (5) Ni me gusta ni me disgusta
- (6) Me gusta un poco
- (7) Me gusta
- (8) Me gusta mucho
- (9) Me gusta muchísimo

AROMA

- 1) Me disgusta muchísimo
- (2) Me disgusta mucho
- (3) Me disgusta
- (4) Me disgusta un poco
- (5) Ni me gusta ni me disgusta
- (6) Me gusta un poco
- (7) Me gusta
- (8) Me gusta mucho
- (9) Me gusta muchísimo

ACIDEZ

- 1) Me disgusta muchísimo
- (2) Me disgusta mucho
- (3) Me disgusta
- (4) Me disgusta un poco
- (5) Ni me gusta ni me disgusta
- (6) Me gusta un poco
- (7) Me gusta
- (8) Me gusta mucho
- (9) Me gusta muchísimo

GUSTO EN GENERAL

- 1) Me disgusta muchísimo
- (2) Me disgusta mucho
- (3) Me disgusta
- (4) Me disgusta un poco
- (5) Ni me gusta ni me disgusta
- (6) Me gusta un poco
- (7) Me gusta
- (8) Me gusta mucho
- (9) Me gusta muchísimo

Señale la frecuencia con la que consume yogurt bebible

1 vez al mes

2 veces al mes

1 vez por semana

2 o más veces por semana

1. ¿Compraría este producto? Sí No

¿Por qué? _____

2. ¿Qué le cambiaría al producto?

¡GRACIAS!

3.0 Discusión de resultados

3.1 Obtención y Estandarización del Lactosuero

En las Tablas 3.1 y 3.2 se observan los valores obtenidos del análisis químico proximal de la leche entera, lactosuero y la base láctea en base húmeda y base seca.

Tabla 3.1 Composición fisicoquímica. Estandarización de proteína de base láctea (base húmeda)

Componentes (g/100 mL)	Leche entera (control)	Lactosuero	Base láctea
Humedad	87.84	94.01	87.41
Sólidos totales	12.16	5.99	12.59
Lípidos	3.51	0.63	0.95
Proteínas	3.24	0.90	5.64
Cenizas	0.70	0.57	0.83
Carbohidratos totales ¹	4.71	3.89	5.17

¹ Estimados por diferencia

Los datos representan los promedios de triplicados con un coeficiente de variación <5%.

Tabla 3.2 Composición fisicoquímica. Estandarización de proteína de base láctea (base seca)

Componentes (g/100 mL)	Leche entera (control)	Lactosuero	Base láctea
Sólidos totales	100 ^a	100	100 ^b
Lípidos	28.86 ^c	10.51 ^b	7.54 ^a
Proteínas	26.64 ^b	15.02 ^a	44.79 ^c
Cenizas	5.75 ^a	9.51 ^c	6.59 ^b
Carbohidratos totales ¹	38.73 ^a	64.94 ^c	41.06 ^b

¹ Estimados por diferencia

Los datos representan los promedios de triplicados con un coeficiente de variación <5%.

Entre columnas, las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes con $\alpha = 0.05$ de acuerdo con la prueba de Tukey.

Al comparar los valores entre la leche entera y el lactosuero se observa que la cantidad de macronutrientes se encuentran en menor cantidad en el lactosuero, esta diferencia se debe a que el 80 % de las proteínas presentes en la leche entera son caseínas y estas se van al queso en conjunto con los lípidos (Walstra *et. al* , 2006 citado por Ramirez & Velez 2012), mientras que los componentes hidrosolubles como la lactosa se quedan en el lactosuero (Ramirez & Velez, 2012), por ende la cantidad de solidos totales también es menor en el lactosuero.

Para igualar los valores de solidos totales en el lactosuero se añadió 6% de WPC.

12.16 % Solidos totales Leche entera – 5.99 % Solidos totales Lactosuero = 6.17 % solidos totales que faltan

$$\frac{79.7 \text{ g proteina}}{100 \% \text{ WPC}} \times 6.17\% \text{ WPC} = 4.91 \text{ g proteina}$$

En la Tabla 3.1 se muestran los valores obtenidos de la composición química después de agregar WPC en la base Láctea, igualando la cantidad de sólidos totales,

Se observa que la adición extra de WPC en la base láctea, tiene un efecto de enriquecimiento principal en la proteína ya que es el principal componente del WPC, los carbohidratos también aumentaron, esto tiene ventajas, debido a que la lactosa es una de las principales fuentes de carbono para las BAL (Ray & Bhunia, 2010), durante la fermentación, las cenizas tuvieron un aumento considerable, logrando que la cantidad de solidos totales aumentaran y se acercaran al valor de la leche entera que es el control, a pesar de que en el caso de los lípidos se observara una disminución comparada con la leche y la base láctea (Tabla 3.1).

3.2 Inoculación e incubación de la base láctea

En las Figuras 3.1 y 3.2 se presenta el seguimiento de la fermentación la leche entera (control) y la base láctea. Se observa el incremento de acidez y la disminución de pH respectivamente.

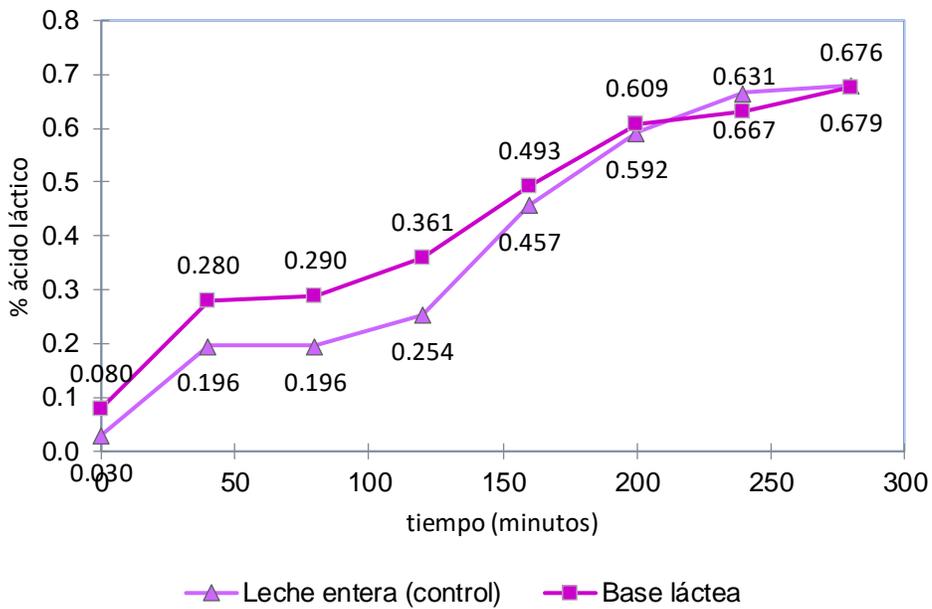


Figura 3.1 Seguimiento de la concentración de ácido láctico durante el tiempo de incubación en leche entera y base láctea

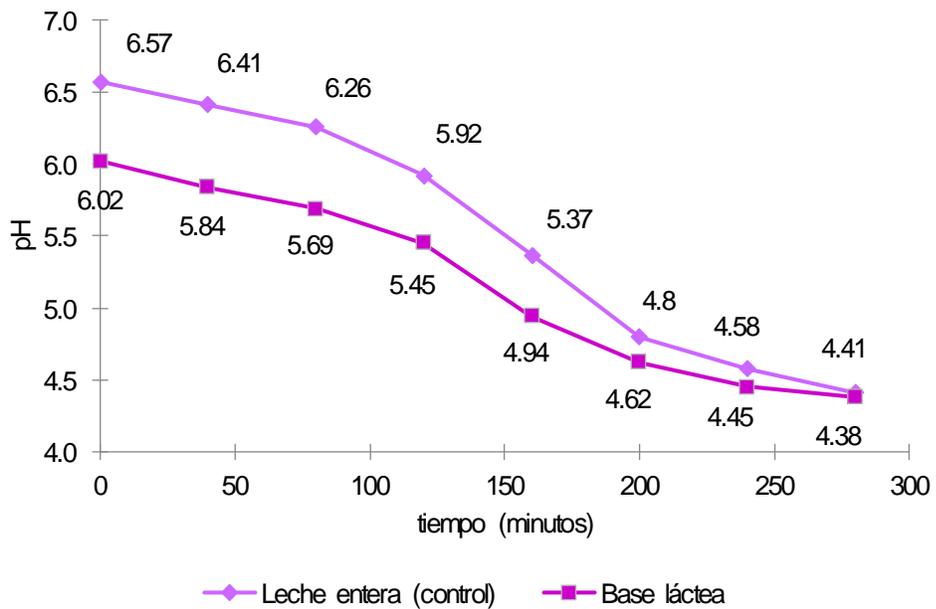


Figura 3.2 Seguimiento del pH durante el tiempo de incubación en leche entera y base láctea

La fermentación se llevó a cabo en aproximadamente 4 horas, hasta alcanzar una acidez titulable de no mayor de 0.5% y un pH máximo de 4.4, se usaron los valores de acuerdo con lo indicado en la NOM-243-SSA1-2010.

Se realizó el análisis estadístico por medio de ANOVA para determinar si entre la leche entera (control) y la base láctea existía diferencia significativa en la evolución del aumento de acidez y la disminución de pH, con los datos obtenidos se observó que no existe diferencia significativa entre ambas muestras, lo que indica que la base láctea es adecuada para el desarrollo de un producto lácteo fermentado.

En la Tabla 3.3 y 3.4 se muestran los resultados de la composición química de los productos obtenidos después de la fermentación.

Tabla 3.3 Composición química (g/100 mL de leche entera (control) y base láctea después de la fermentación base húmeda

Componentes (g/100 mL)	Leche entera	Base láctea
Humedad	87.84	87.41
Sólidos totales	12.16	12.59
Lípidos	3.20	0.65
Proteínas	3.20	5.53
Cenizas	0.68	0.68
Carbohidratos ¹	5.08	5.73

¹Determinados por diferencia

Los datos representan los promedios de triplicados con un coeficiente de variación < 5 %

Tabla 3.4 Composición química (g/100 mL) de leche entera (control) y base láctea después de la fermentación base seca

Componentes (g/100 mL)	Leche entera	Base láctea
Sólidos totales	100	100
Lípidos	26.31 ^b	5.34 ^a
Proteínas	26.31 ^a	43.92 ^b
Cenizas	5.59 ^a	5.40 ^a
Carbohidratos ¹	41.77 ^a	45.51 ^b

¹Determinados por diferencia

Los datos representan los promedios de triplicados con un coeficiente de variación < 5 %.

Los resultados obtenidos entre la leche entera y la base láctea posterior a la fermentación, nos indica que no existe cambio significativo comparando con las muestras sin fermentar, el macronutriente en el que se observa un aumento considerable son los carbohidratos, sin embargo al ser calculados por diferencia no podemos constatar que únicamente sean carbohidratos, ya que existen más compuestos en la bebida láctea fermentada, por lo que se

debe realizar una cuantificación carbohidratos por un método analítico para tener certeza que el aumento que se observa sea solo de carbohidratos.

3.3 Determinación de la viabilidad del BAL

Para que la bebida elaborada se considere funcional se debe tener certeza de que las bacterias ácido lácticas continúen con vida para actuar como probióticos y deben estar presentes durante la vida útil del producto, manteniéndose estables y viables. El mínimo de bacterias probióticas en leches fermentadas debe estar en un rango de 10^5 a 10^6 UFC por mL (Huertas, 2012).

Para verificar el comportamiento de las bacterias en la bebida elaborada tras la incubación, la muestra fermentada se enfrió y conservó a 4 °C por 30 días, después de este período de tiempo, se realizó un ensayo verificar la cantidad de bacterias lácticas viables.

El resultado del conteo de bacterias termófilas aerobias en placa en agar MRS a 50 °C fue de 20×10^7 UFC / mL en la base láctea y 22×10^7 en la leche entera. Con este valor se confirma que al final de la fermentación las bacterias ácido-lácticas continúan vivas y se cumple con la cantidad de bacterias viables requerido para los productos con *Lactobacillus spp.*

3.4 Evaluación de hidrolisis de proteínas

Uno de los objetivos para la elaboración esta bebida fue la obtención de péptidos bioactivos este proceso se da durante la fermentación con los microorganismos de los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus*, estos producen hidrólisis de proteína al ser bacterias proteolíticas, por lo tanto, se consideró probable que la formula láctea desarrollara la hidrólisis de proteínas y posteriormente la formación de péptidos potencialmente bioactivos.

Para saber si después de la fermentación se desarrollaron dichos péptidos se realizó un perfil electroforético (Figura 3.3).

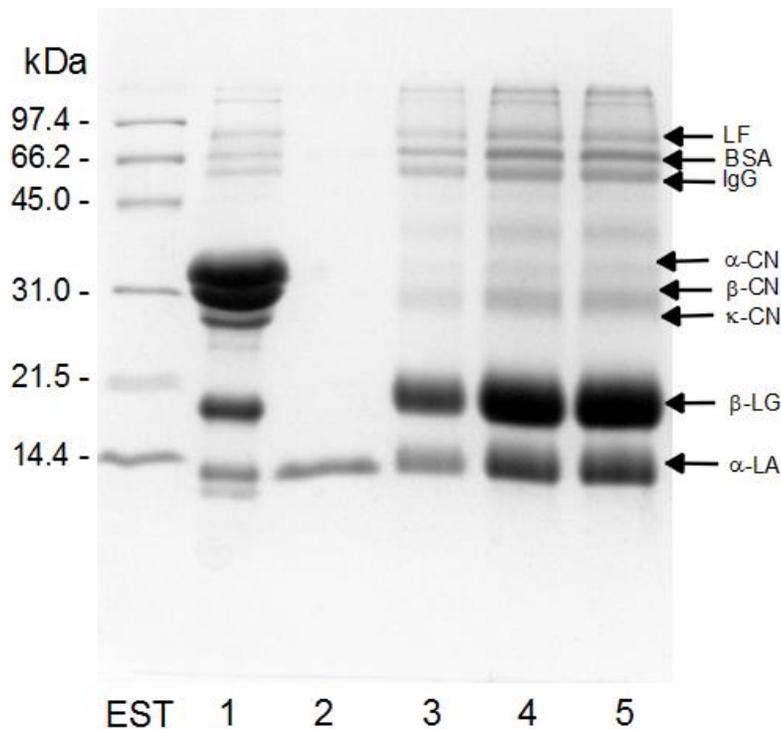


Figura 3.3 Perfiles electroforéticos en (SDS-PAGE, 15 % T) de muestras de diferentes matrices lácteas: EST, Estándar de peso molecular; 1, material de referencia del CENAM; 2, α -lactoalbúmina; 3, WPC; 4, fórmula, 5, fermentación. Tinción con azul de *Coomassie* G-250. *Gel DocTM XR+ Imaging System* (Bio-Rad).

En este perfil se observan las 5 muestras analizadas: estándar de peso molecular, material de referencia del CENAM, α -lactoalbúmina, bebida enriquecida con WPC, bebida después de la fermentación respectivamente.

El perfil permite observar que no hay diferencia entre la muestra 4 y la muestra 5, esto indica que durante la fermentación no hubo producción de péptidos bioactivos ya que las líneas que se observan son idénticas antes y después de la fermentación, contrario a lo que se esperaba, posiblemente este resultado se debe a que el tiempo de fermentación fue limitado. En el trabajo de investigación por Olivera (2011), y lo descrito por Conti *et al.* (2012), se muestran ejemplos de hidrólisis de la proteína sérica bovina y de la α -caseína, principalmente, cuando la fermentación ha superado las 24 horas, por lo que el tiempo de fermentación se recomienda sea mayor a 24 horas.

3.5 Formulación

Para generar la bebida fermentada final se adicionaron por cada 100 mL de base láctea fermentada, 40 g de pulpa de mango ataulfo con el fin de dar sabor naturalmente, 10 g de inulina polisacárido con efecto prebiótico y mejorador de textura, además de 2 g de sacarosa para aportar ligero gusto dulce considerando que la pulpa de mango también aporta dulzor (Tabla 3.5).

Para conocer la composición química que define las características nutrimentales del alimento se realizó otro análisis químico proximal, los resultados se registraron en la Tabla 3.5 en la que se observan las concentraciones de cada componente.

Tabla 3.5 Composición química de la bebida de lactosuero fermentado con pulpa de mango e inulina¹, base húmeda.

Componente	g/100 mL
Humedad	77.48
Sólidos totales	22.52
Lípidos	0.63
Proteínas	5.53
Cenizas	0.53
Carbohidratos totales ¹	15.83
Ca (mg/100 mL)	21.44
Na (mg/100 mL)	33.15

¹Estimados por diferencia. Los datos representan los promedios de triplicados con un coeficiente de variación < 5 %

Se observa la cantidad de carbohidratos continúa siendo mayoritario, al ser calculados por diferencia se tendría que hacer la cuantificación de carbohidratos por un método analítico para tener certeza de que únicamente son carbohidratos o que otros compuestos podrían estar afectando esta cantidad, la cantidad de lípidos prevaleció baja, así como la alta concentración de proteínas.

Se determinó la concentración de sodio (Na) y calcio (Ca) ya que el contenido afecta la presión arterial y el contenido mineral óseo, respectivamente (Nielsen *et. al.* 2013). Además, es necesario reportar su contenido de acuerdo con el nuevo etiquetado de alimentos.

3.6 Etiquetado

Para que el producto desarrollado se distribuya a nivel nacional, se debe considerar poner al alcance del consumidor, la información clara sobre la composición química del alimento; esto como uno de los puntos de mayor importancia.

Los resultados que se presentan en la Tabla 3.5 se usaron para generar la etiqueta con información nutrimental del producto, siguiendo las especificaciones para etiquetado de alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasadas de la NOM-051-SCFI/SSA1-2010.(Tabla 3.6)

Tabla 3.6 Etiqueta de declaración nutrimental, conforme a la NOM-051-SCFI/SSA1-2019

Declaración nutrimental	
Tamaño de la porción 100 mL	
Contenido energético	90.6 kcal (379 kJ)
Proteínas	5.5 g
Grasas totales	0.6 g
Grasas saturadas	
Grasas trans	
Hidratos de carbono	15.8 g
Azúcares	15.3 g
Azúcares añadidos	2.0 g
Fibra dietética	0.46 g
Sodio	33.15 mg
Calcio	21.44 mg



Figura 3.4 Sello de advertencia Exceso calorías Y Exceso de Azucares según NOM-051-SCFI/SSA1-2019.

A pesar de su bajo contenido de lípidos, el producto de lactosuero fermentado brinda un alto aporte energético, en comparación con los dos productos comerciales referidos, esto se debe a la alta concentración de carbohidratos y proteínas que presenta el producto desarrollado, por tratarse de proteínas de alto valor biológico no se considera desfavorable esta característica, sin embargo será necesario evaluar y determinar a que sector específico de la población deba dirigirse.

Otra característica a favor del producto desarrollado es la baja concentración de sodio (Na), ya que la presión arterial puede afectarse por el consumo excesivo de este elemento mineral.

La modificación de la NOM-051-SCFI/SSA1-2019 indica que se deben incluir en el etiquetado los sellos de advertencia cuando alguno de los componentes de el producto se encuentran en exceso basandose en la Tabla 3.6, es así que en el caso de la bebida láctea fermentada se deben incluir dos sellos:

- ✓ Exceso de calorías: El contenido energético de la base láctea fermentada es de 90.6 kcal en 100 mL y la norma indica que los alimentos líquidos en 100 mL de producto, que tengan igual o más de 70 kcal totales deben tener como sello de advertencia EXCESO DE CALORIAS, por lo tanto, se debe incluir en la etiqueta. (Figura 3.4)
- ✓ Exceso de azúcares: La NOM-051-SCFI/SSA1-2019 indica que en alimentos líquidos en 100 mL de producto no debe haber 10% o mayor del 10 % de energía total proveniente de azúcares libres, en el caso de la bebida láctea fermentada tiene 67.5 % por lo tanto debe incluir este sello de advertencia (Figura 3.4)
- ✓ Exceso de sodio: La base láctea fermentada no debe incluir en su etiquetado la advertencia de exceso de sodio, ya que la norma indica que se debe colocar cuando el Líquidos en 100 mL de producto contenga mayor o igual a 300 mg de sodio o tenga 1 mg de sodio por cada kcal, en el caso de la bebida láctea fermentada únicamente tiene 33.15 mg de sodio y 0.365 mg de sodio por kcal por lo que no es necesario colocar esta advertencia.

En el caso de exceso de grasas saturadas y grasas trans con la información que se tiene no se puede saber si incluiría estos sellos ya que se necesita realizarle un análisis de perfil de lípidos a la base láctea fermentada.

3.7 Análisis microbiológico de la formulación final

Como se señala en la NOM-111-SSA1-1994 *Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos*, la concentración de hongos y levaduras es un indicador de prácticas sanitarias inadecuadas durante la producción y el almacenamiento de los productos, y evidencia del uso de materia prima inadecuada.

Los resultados de los análisis microbiológicos fueron los siguiente:

Hongos en placa de agar papa dextrosa incubada por 120 horas a 25 ° C, se estimó una concentración < 10 UFC / mL de muestra.

Levaduras en placa de agar papa dextrosa incubada por 120 horas a 25 ° C se estimó una cuenta de 10 UFC / mL de muestra.

Este análisis fue necesario ya que a la base láctea se le añadió pulpa de mango para endulzar, lo que pudo ocasionar la proliferación de microorganismos no deseados en la base láctea.

3.8 Evaluación sensorial

La prueba con consumidores se realizó con un grupo de 100 personas encuestadas, de los cuales el 63.4 % eran mujeres, y el 36.6 % hombres; la edad promedio osciló entre 23 ± 5 años.

La población encuestada tuvo respuestas variadas, según el atributo que calificaban. En la Figura 3.5 se muestran las medias obtenidas de cada atributo en la evaluación de la bebida láctea fermentada.

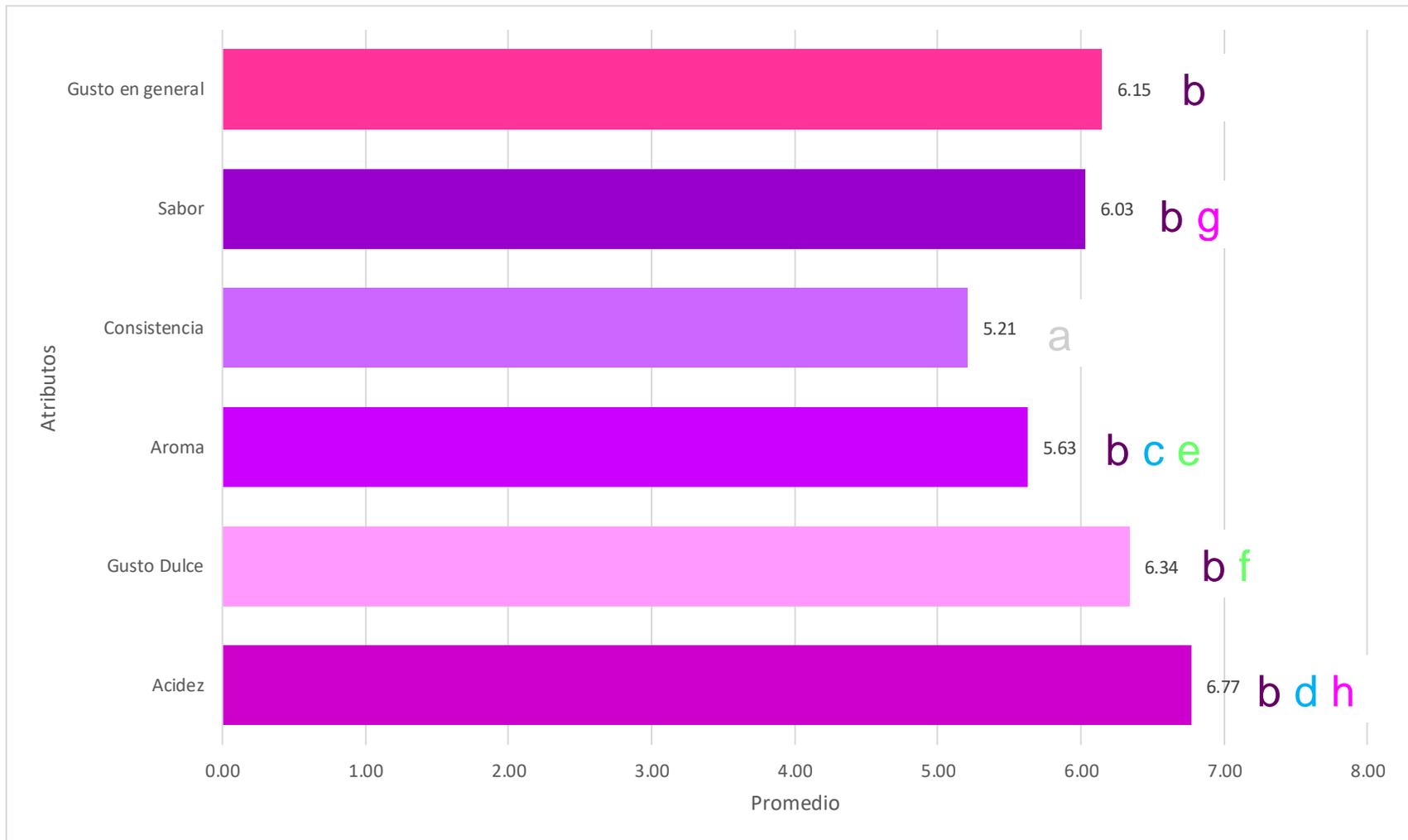


Figura 3.5 Medias del nivel de agrado para atributos específicos de la bebida láctea fermentada, indicando las diferencias significativas con letras.

En la tabla 3.7, se muestra el análisis estadístico para conocer si existe diferencia significativa entre atributos.

Tabla 3.7: Análisis de Varianza por atributo en la bebida láctea fermentada

Origen de la variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad	Valor critico F
Entre grupos	149.01	5	29.80	10.81	5.77x10 ⁻¹⁰	2.23
Dentro atributos	1637.71	594	2.76			
Total	1786.72	599				

Con las medias obtenidas de la evaluación de la bebida láctea fermentada se puede resaltar que los atributos mejor calificados fueron el gusto dulce y acidez, teniendo un valor de media de 6.77 y 6.34 respectivamente, sin embargo hubo dos atributos que no obtuvieron la misma aceptación que fue la consistencia y el aroma, con valores de 5.63 y 5.21, para conocer si existe diferencia significativa entre los atributos evaluados tomando en cuenta esta diferencia, se realizó un análisis de ANOVA con las medias obtenidas, al tener un valor de F calculada mayor a la F de tabla indica que existe una diferencia significativa entre los atributos evaluados, por lo que se realizó un análisis por el método de Tukey, para conocer entre que atributos existe esta diferencia como se muestra en la Tabla 3.8.

Valor de HDS: 0.67

Tabla 3.8 Diferencia de medias de cada atributo para saber si existe diferencia significativa entre atributos

	Acidez	Gusto Dulce	Aroma	Consistencia	Sabor	Gusto General
Acidez		0.43	1.14	1.56	0.74	0.62
Gusto Dulce			0.71	1.13	0.31	0.19
Aroma				0.42	0.40	0.52
Consistencia					0.82	0.94
Sabor						0.12

En la Tabla 3.8 se muestran la diferencia entre medias de cada atributo, donde se observa en el caso de la acidez, siendo el atributo con mayor aceptación, presentando diferencia con el aroma, la consistencia y el sabor, siendo la consistencia el atributo con menor aceptación.

El siguiente atributo es el gusto dulce el cual tiene diferencia con dos atributos que son el aroma y la consistencia, el gusto dulce tuvo un valor de media alto siendo el segundo atributo mejor calificado.

El aroma es penúltimo atributo con media inferior, por lo tanto, al ser comparado con los demás atributos tiene una gran diferencia de medias respecto a los atributos mejor calificados siendo aroma y gusto dulce.

El sabor y el gusto en general son atributos que únicamente tuvieron diferencia significativa con la consistencia, con valores de media de 6.15 y 6.05 indicando me gusta un poco, pero sin ser de los atributos mejor evaluados.

Como se observa en Figura 3.5 el atributo con menor aceptación fue la consistencia y después el ANOVA y la prueba Tukey, confirmándose que la consistencia es el único atributo que muestra diferencia con los atributos restantes, además se confirma que la acidez es un atributo sobresaliente en la bebida láctea fermentada. Por lo que para tener una mayor aceptación de la bebida láctea fermentada se tendría que mejorar la consistencia y el aroma.

En el Figura 3.6 se muestran la frecuencia de consumo de yogurt bebible por los consumidores.

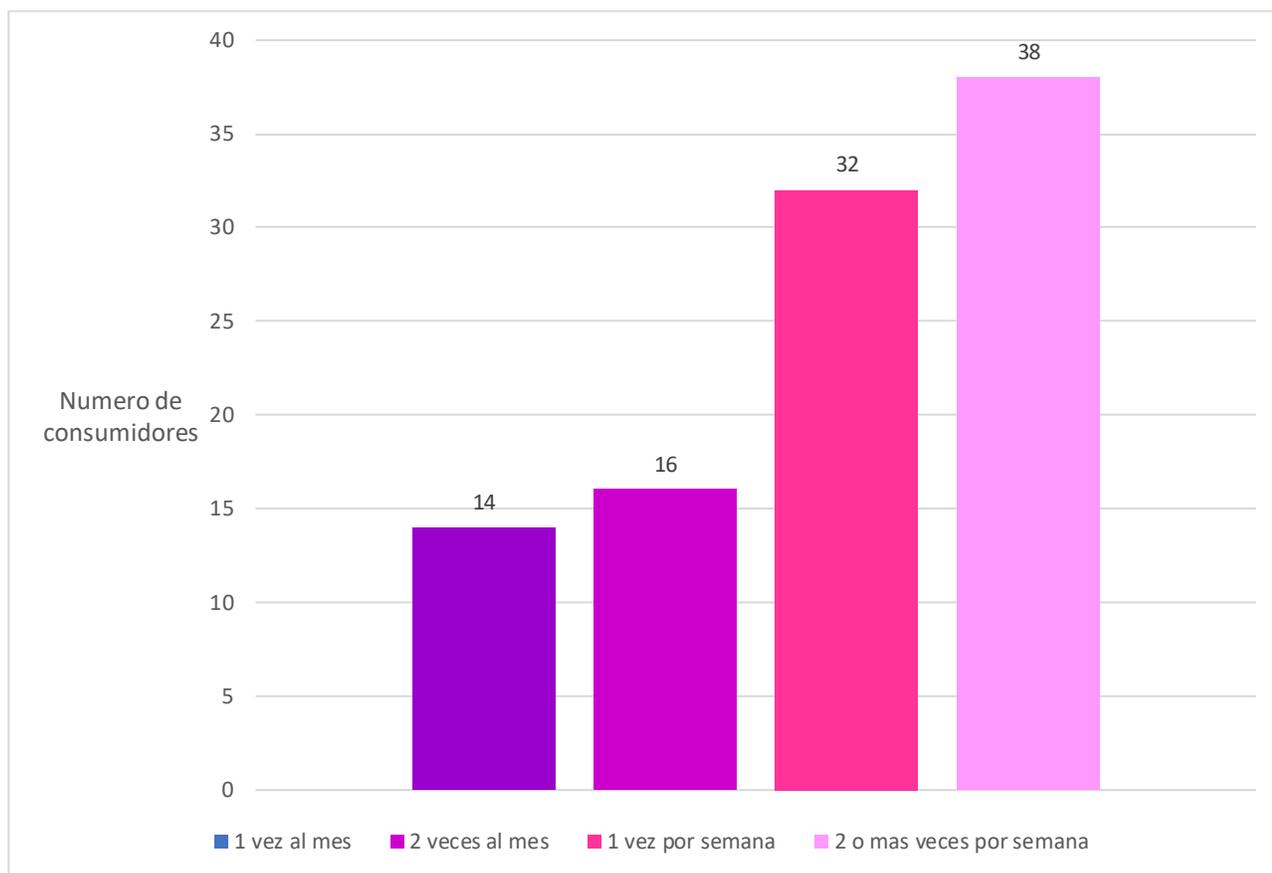


Figura 3.6 Frecuencia de consumo de yogurt bebible.

En la Figura 3.7 se observa que las respuestas del grupo evaluado se consideraron confiables, por el hecho de que el 70% de la población encuestada, menciono que consume por lo menos 1 o 2 veces a la semana un yogurt bebible, y el resto una o dos veces a la semana, lo cual indica que están familiarizados con el consumo de este tipo de bebidas y pueden caracterizar correctamente los atributos que se encuentran en la encuesta.

Para conocer si comprarían la bebida y que le cambiarían para mejorar la bebida láctea fermentada se realizaron dos preguntas y a continuación en las figuras 3.7 y 3.8 se muestran las respuestas obtenidas.

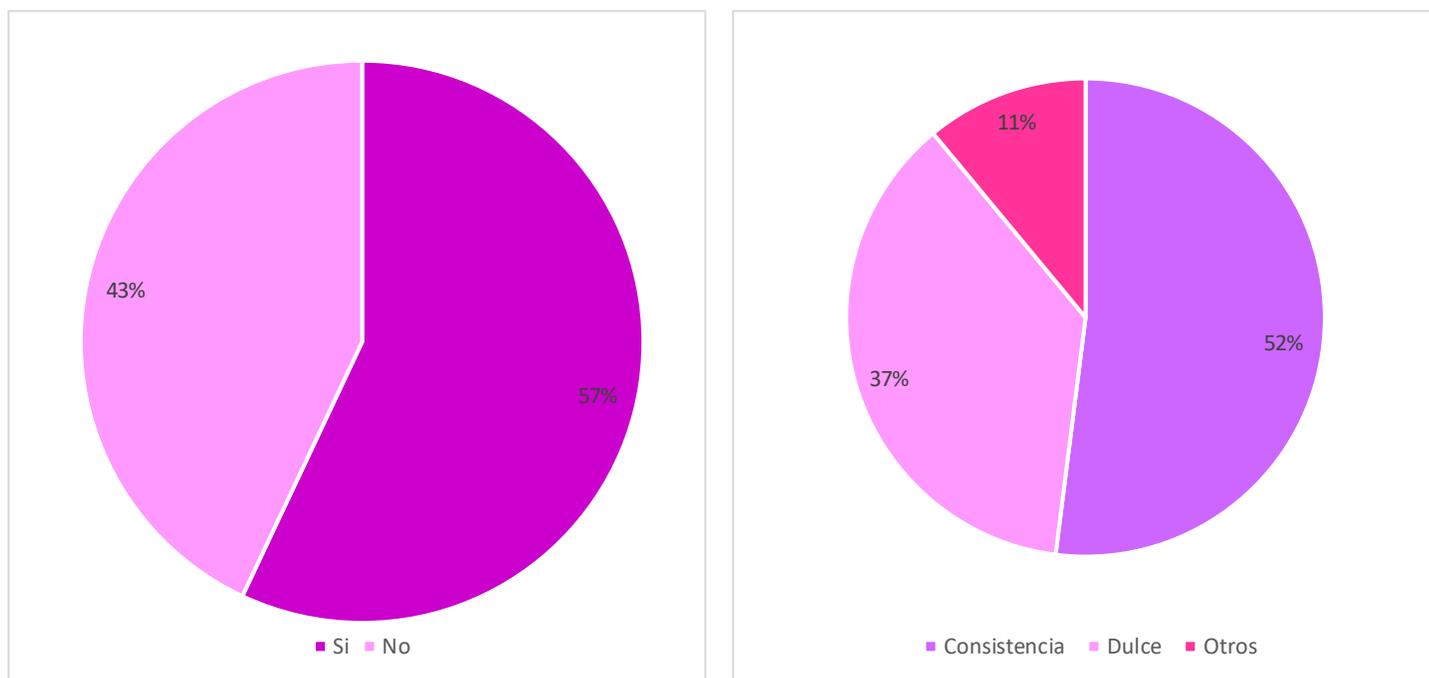


Figura 3.7 Respuesta en porcentaje a las preguntas ¿compraría este producto? (izquierda). **Figura 3.8** ¿qué le cambiaría al producto? (derecha).

Dentro de la evaluación, se determinó la posibilidad de comprar, los resultados obtenidos se encuentran en la Figura 3.7, donde se observa que el 57 % declaró que compraría el producto, sin embargo, el 43 % no lo compraría. Y aunque el valor obtenido es arriba de la media no es suficiente para garantizar que las personas comprarían el producto.

Otra información relevante obtenida de la prueba afectiva surgió de los comentarios en la pregunta ¿qué le cambiaría al producto? (Figura 3.8) Donde se observó que más del 50 % no estaba satisfecho con la consistencia, el 37 % le cambiaría el sabor dulce y el 11% otro aspecto de la bebida.

Debe considerarse que las bebidas de tipo zumo tienen generalmente baja viscosidad y cuerpo delgado, débil, la viscosidad de los productos lácteos fermentados y de los yogures es baja al usar un concentrado de proteína de suero de leche líquido sin caseína (Schmidt *et al.*, 1984).

Comparando los resultados obtenidos el trabajo que antecede a este proyecto se puede realizar una comparación para conocer la aceptación general de este tipo de productos por los consumidores.

En el trabajo de Montalvo M (2017), se evaluaron los atributos siguientes: Gusto general, color, olor, sabor, dulzor, acidez y textura, se elaboró para dos tipos de lactosuero caprino y bovino. Los atributos evaluados en este trabajo son los mismo únicamente el color no se evaluó.

Al comparar la respuesta obtenida por los consumidores, se observa en la tabla 3.9 los datos sobresalientes de los dos estudios:

Tabla 3.9: Comparación de atributos de la bebida desarrollada por Montalvo M., (2017) y la bebida láctea fermentada sabor mango.

	Efecto del uso de conservadores en la estabilidad y vida de anaquel de una bebida a base de lactosuero dulce de bovino y caprino con pulpa de mango. Montalvo M. (2017)	Bebida láctea fermentada endulzada con mango. (2023)
Atributo que más gusto	Sabor	Acidez
Atributo que menos gusto	Acidez	Consistencia
¿Qué le cambiarías?	Nada	Consistencia

En la Tabla 3.9 se analiza que el sabor fue el atributo que más gusto en el trabajo publicado por Montalvo M. (2017), en el caso de la bebida láctea fermentada el sabor no fue el atributo mejor evaluado sin embargo la percepción del consumidor fue me gusta poco

En el caso del atributo que menos gusto se observa algo interesante ya que el atributo que menos gusto en el trabajo de Montalvo M. (2017) fue el que mas gusto en la bebida láctea fermentada, un factor importante es que la bebida formulada en la tesis antecesora no llevo un proceso fermentativo teniendo valores de pH de 4 a 5 y % de acidez de 0.2 a un poco mas a 1%, a diferencia de la bebida láctea fermentada que su valor de pH fueron de 4 a 6.5 y %

de acidez de 0.1 a 0.6%, al tener una concentración mayor de ácido láctico pudo tener un efecto al momento de ser evaluado por los consumidores y no ser agradable.

En cuanto a que atributo cambiarían, la bebida de Montalvo M. concluyó que no cambiarían ningún atributo de la bebida, en el caso de la bebida láctea fermentada la consistencia fue uno de los atributo con menor aceptación por lo que se recomienda su reformulación agregando un hidrocoloide.

No obstante, al observar los resultados del trabajo de Montalvo M 2017 se observa que todos los atributos obtuvieron valores de 6 en la escala hedónica, lo que indica que gusta bastante la bebida láctea, en el caso de la bebida láctea fermentada a diferencia del primer trabajo se obtuvo valores promediados entre 5 y 6 indicando ni me gusta, ni me disgusta y me gusta poco, respectivamente, indicando una aceptación intermedia por los consumidores por lo que se tendrá que realizar una reformulación para mejorar la consistencia y obtener una mejor aceptación de este atributo.

Conclusiones

- ✓ Se logró utilizar el lactosuero dulce de bovino para generar una bebida láctea fermentada, enriquecida con probiótico y prebióticos para disminuir la contaminación que provoca al ambiente
- ✓ Se desarrolló una bebida rica en proteínas con la adición de WPC para la elaboración de la bebida láctea fermentada, obteniendo una bebida rica en macronutrientes como proteínas 5.53%, carbohidratos 15.83% y micronutrientes Ca 21.44 mg/100 mL y Na 33.15 mg/100mL.
- ✓ Se incluyeron probióticos y prebióticos para favorecer el equilibrio de la microbiota intestinal, sin embargo, no se logró la hidrólisis de las proteínas durante la fermentación por lo que se sugiere aumentar el tiempo de fermentación o cambiar los probióticos que tengan la característica de hidrolizar las proteínas con facilidad.
- ✓ Se logró realizó una bebida láctea fermentada endulzada con mango ataulfo con aceptación en el sabor predominando respuesta en me gusta un poco, pero se debe mejorar el aroma de la bebida láctea fermentada para obtener mejores resultados

Referencias:

- ✓ AOAC (1990). Official Methods of Analysis. USA: Official Analysis Chemists International.
- ✓ Badui D. S. (2020). *Química de los Alimentos* (Sexta ed.). Ciudad de México: PEARSON Educación.
- ✓ Deeth H. (2019) *Whey Protein from milk to medicine*, Elsevier, academic Press, Paginas:
- ✓ Drider D. (2016), *Bacterias ácido-lácticas, fundamentos y aplicación*, Alfaomega grupo editor S.A. de C.V. México, México DF.
- ✓ Duran F, (2022), *Manual de lácteos y derivados, lácteos y derivados en la industria*, Grupo latino editores S.a.s, Capitulo 3,
- ✓ *Protocolos Experimentales para la Asignatura de Laboratorio de Tecnología de Alimentos* (2014). Facultad de Química UNAM Ciudad de México.
- ✓ FAO (2016). *Food and Agriculture Organization*. Recuperado el 20 de agosto de 2016, de Producción y productos lácteos: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/leche-y-productos-lacteos/es/#.WKUBofnhDIU>
- ✓ Gil A. (2017), *Tratado de nutrición, composición y calidad de los alimentos*, 3ra edición, Editorial panamericana,
- ✓ Gonzalez, L., Guzmán, J. J., Guerrero, A. C., Serrano, G. R., Ruiz, L. G., & Garibay, M. G. (2011). Liberación de péptidos bioactivospor bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales. (A. M. A.C., Ed.) *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(2), 179-188.
- ✓ González, O. (2018), *Potencial de aprovechamiento del suero de queso en México*, Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, Veracruz, Veracruz. Página:101
- ✓ Jeantet, R. (2007), *Ciencia de los alimentos, bioquímica, microbiología, procesos y productos*
- ✓ Madrigal L., (2007), *La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales*, Universidad Simón Bolívar, órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de nutrición, Caracas, Venezuela.
- ✓ Montalvo M. (2017), *Efecto del uso de conservadores en la estabilidad y vida de anaquel de una bebida a base de lactosuero dulce de bovino y caprino con pulpa de mango* Página: 3

- ✓ Nielsen, S. (2013). *Análisis de los Alimentos* (Tercera ed.). Zaragoza: ACRIBIA S.A
- ✓ Olivera Jorge (2011). *Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche*. Tesis de Licenciatura Universidad de la República. Uruguay
- ✓ Parra, R. (2008), Lactosuero: Importancia en la industria de alimentos, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Página:4967,4969
- ✓ Parra, R. A. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. Revista Facultad Nacional de Agronomía.
- ✓ Periago M., 2021, Higiene inspección y control alimentario, Higiene inspección y control de calidad de la leche, Universidad de Murcia.
- ✓ Ramirez C., & Velez, J. V. (2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. (A. y. Departamento de Ingeniería Química, Ed.) *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 132.
- ✓ Ray, B., & Bhunia, A. (2010). Fundamentos de microbiología de los alimentos (Cuarta ed.). Ciudad de México: Mc Graw Hill.
- ✓ Rodríguez G. (2010), Gómez A., Castro R., González R., Santos E., Congreso Nacional de ciencia y tecnología de alimentos, universidad de Guanajuato, Paginas:
- ✓ Salas, J. (2018), Importancia de los alimentos lácteos en la salud cardiovascular ¿Enteros o desnatados?, Nutrición Hospitalaria, ARÁN. Página: 1486
- ✓ Secretaría de Economía (2001). *NMX-AA-028-2001 Análisis de Agua Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno en Aguas Naturales Residuales y Residuales Tratadas- Método de Prueba*. Dirección General de Normas.
- ✓ Secretaría de Economía. *Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010*, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-Información comercial y sanitaria, publicada el 5 de abril de 2010.
- ✓ Secretaría de Salud (2010). *NOM-243-SSA1-2010*, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación .
- ✓ Secretaría de Salud (s.f.). *Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994 Método para la cuenta de Mohos y Levaduras en alimentos*.
- ✓ Secretaría de Salud (s.f.). *Norma Oficial Mexicana NOM-185-SSA1- 2002*. Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias. no la encuentre en el texto

- ✓ Smithers G., (2015), Whey-ing up the options e Yesterday, today and tomorrow, International Dairy Journal, Elsevier,
- ✓ Valencia, E. (2009), La industria de la leche y la contaminación del agua, Instituto Tecnológico de Puebla; Página: 30
- ✓ Zimmermann Stein, K., & Ruíz Espinoza, H. (2010). Estructura y funcionalidad de proteínas lácteas: Efecto de modificaciones inducidas por medios físicos, químicos y enzimáticos. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos, 24-37.