



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

*“Aislamiento y caracterización de  
proteínas de lactosuero para la  
elaboración de una bebida carbonatada  
con contenido proteico”*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**INGENIERO EN ALIMENTOS**

**P R E S E N T A :**

**DIEGO GONZALO GONZÁLEZ RUIZ**

**DIRECTORA:**

**Dra. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2017



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Aislamiento y caracterización de proteínas de lactosuero para la elaboración de una bebida carbonatada con contenido proteico.**

Que presenta el pasante **Diego Gonzalo González Ruiz**

Con número de cuenta: 411000569 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de Marzo de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dra. Susana Patricia Miranda Castro	
<b>VOCAL</b>	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
<b>SECRETARIO</b>	I.A. María Guadalupe López Franco	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Dra. María Eugenia Ramírez Ortiz	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M. en C. Selene Pascual Bustamante	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga\*

---

**Hay tres pautas básicas: tomarse en serio las cosas que uno hace, dedicarse en cuerpo y alma a lograr el objetivo que uno se ha impuesto, y convencerse de que lo importante en la vida es terminar lo que se empieza.**

*Josef Aizam*

**Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo**

*Albert Einstein*

**“La humildad es una virtud tan poco apreciada en nuestro mundo precisamente porque facilita la vida”**

*Orhan Pamuk*

---

---

## DEDICATORIAS

### *A MI MAMA:*

*Simplemente por ser la mujer más importante en mi vida. Por haberme educado forjándome un gran sentido de la responsabilidad, por estar siempre a mi lado en los mejores y peores momentos, porque nunca me dejó ni me dejará solo, porque siempre me animó y me apoyó a seguir adelante y cumplir mis metas. Por eso y por muchas cosas más, TE AMO MA!*

### *A MI PAPA:*

*Por ser el hombre más noble que he conocido, por siempre preocuparse por mí, por su apoyo incondicional, porque sin ese apoyo hubiera sido sumamente difícil haber llegado a estas instancias, porque a pesar de las dificultades, siempre buscó la forma de ayudarme y salir adelante. TE AMO PA!*

### *A MI HERMANO:*

*Por ser un hermano maravilloso, que siempre me apoyo moral y económicamente para poder seguir estudiando, porque gracias a ese apoyo, estoy inmensamente agradecido de que seas mi hermano. Estoy seguro de que tendrás mucho éxito, y siempre estaré para apoyarte. TE AMO CARNAL!*

### *A DIOS:*

*Por haber cuidado a mi familia que es lo más sagrado que tengo. Por darnos la fuerza para trabajar y salir adelante, porque gracias a esa fuerza, hoy podemos estar de pie y decir que valió la pena continuar a pesar de los momentos difíciles que vivimos.*

---

## AGRADECIMIENTOS

*A la Doctora Susana Patricia Miranda Castro por brindarme su asesoría y su extenso conocimiento durante toda la etapa del proyecto, por haberme guiado, estar siempre al pendiente, pero sobre todo, por haber confiado en mí. Soy afortunado por haber sido su alumno, la aprecio mucho, de todo corazón, muchas gracias!*

*A la I.A. Daniela Hernández Regino por haber estado conmigo gran parte de la etapa del proyecto, por siempre brindarme su ayuda y su apoyo, por su gran constancia y dedicación. Estoy seguro que serás una gran docente y tendrás mucho éxito. Muchas gracias por todo!*

*A todas las personas que con su apoyo contribuyeron directamente en el trabajo. A Marce y al laboratorista Juan, muchas gracias.*

*A la planta procesadora de quesos “El Edén” por brindarnos la materia prima con la cual se realizó la parte central de este proyecto.*

*A mis sinodales y miembros del jurado, la M. en C. Tais Nopal Guerreo, la I.A. María Guadalupe López Franco, la Dra. María Eugenia Ramírez Ortiz, y la M. en C. Selene Pascual Bustamante por contribuir con su conocimiento para el mejoramiento de esta tesis.*

*A mis profesores y profesoras que me impartieron su conocimiento durante toda la carrera, además de ayudarme a forjar carácter para seguir cosechando logros importantes.*

*A mis amigos por haberlos conocido, por permitirme formar parte de sus vidas y haber compartido tantos momentos gratos e inolvidables dentro de nuestra etapa universitaria, también por apoyarme y estar conmigo en momentos difíciles, sin lugar a dudas, la mejor etapa de mi vida a lado de ustedes. Mis manos: Lalito, Puga, Chore, Oso, Barragán, Felipe. Mis manas: Moni, Vale, Fer, Liz, Clau, Jime y Carreón. Los quiero mucho, son parte muy importante en mi vida!*

*Pero sobre todo agradecido con la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, mi casa y mi alma máter. Por haberme formado como profesionista dentro de sus instalaciones. Pasaran los años y me seguiré sintiendo orgulloso de haber salido de tan grandiosa institución.*



*El presente proyecto forma parte del **Taller Multidisciplinario de Ingeniería en Alimentos de Biotecnología**, el cual brindo recursos para su realización.*

*Se realizó en el Laboratorio de Biotecnología en el Edificio de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1.*

## **RESUMEN**

En la industria de los alimentos, existen subproductos que poseen grandes propiedades biológicas, nutricionales y funcionales. El lactosuero es uno de los más importantes debido a sus proteínas de alto valor biológico y a la cantidad de aminoácidos esenciales que posee. Se deriva después de la coagulación de las caseínas en la elaboración de quesos. Para fabricar 1Kg de queso se necesitan 10 L de leche, donde solo el 10% de la leche se retiene en el queso y el 90% es eliminado como lactosuero. Increíblemente, gran parte de las industrias lácteas lo desechan, ocasionando serios problemas de contaminación y una tremenda falta de aprovechamiento a dichas propiedades.

En este trabajo, se aislaron las proteínas del lactosuero mediante un proceso térmico en condiciones ácidas, empleando centrifugación y filtración al vacío como operaciones unitarias de separación, posteriormente, se caracterizaron mediante Micro-Kjeldah, cromatografía en papel y electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Las proteínas aisladas y caracterizadas, se emplearon como un ingrediente en la elaboración de una bebida carbonatada sabor chocolate, a la cual se le realizaron análisis microbiológicos y químicos proximales, además de una evaluación sensorial.

En promedio se obtuvieron 8.12 gramos de proteína por litro de lactosuero, con un porcentaje proteico del 90.83%, obteniéndose el respectivo aislado de proteínas de lactosuero (WPI). La  $\beta$ -Lactoglobulina, la  $\alpha$ -Lactoalbumina y la Lactoferrina lograron estar presentes en el WPI, al igual que algunos aminoácidos esenciales como la Lisina, Treonina, Metionina, Valina, Triptófano y Leucina. El valor nutritivo de las proteínas aisladas de lactosuero se mantuvo, pero a una baja solubilidad, producto de su desnaturalización. Con una aceptable calidad sanitaria, un aporte del 2.95% de proteínas, la bebida carbonatada sabor chocolate resulto obtener una buena aceptación sensorial.

**Palabras clave:** Lactosuero, proteínas, aislamiento, caracterización, bebida.

# ÍNDICE TEMÁTICO

	<i>Página</i>
<i>Resumen</i> .....	<i>i</i>
<i>Índice temático</i> .....	<i>ii</i>
<i>Lista de figuras</i> .....	<i>v</i>
<i>Lista de tablas</i> .....	<i>vii</i>
<i>Simbología y Abreviaturas</i> .....	<i>ix</i>
<i>Unidades</i> .....	<i>x</i>
<i>Introducción</i> .....	<b>1</b>
<b><i>CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES</i></b> .....	<b>3</b>
<b>1.1 . Lactosuero o suero de leche</b> .....	<b>3</b>
1.1.1. Obtención del lactosuero.....	<b>3</b>
1.1.2. Tipos de lactosuero y su composición química.....	<b>5</b>
1.1.2.1. Lactosuero dulce.....	<b>6</b>
1.1.2.2. Lactosuero ácido.....	<b>6</b>
1.1.3. Proteínas presentes en el lactosuero.....	<b>8</b>
1.1.3.1. $\beta$ -lactoglobulina.....	<b>8</b>
1.1.3.2. $\alpha$ -lactoalbúmina.....	<b>9</b>
1.1.3.3. Lactoferrina.....	<b>10</b>
1.1.3.4. Inmunoglobulinas (Ig).....	<b>11</b>
1.1.3.5. Glicomacropéptidos.....	<b>12</b>
1.1.4. Composición de aminoácidos.....	<b>13</b>
1.1.5. Valor biológico.....	<b>14</b>
1.1.6. Digestibilidad.....	<b>16</b>
1.1.7. Solubilidad.....	<b>17</b>
1.1.8. Propiedades nutricionales y funciones biológicas.....	<b>18</b>
1.1.9. Propiedades funcionales.....	<b>19</b>

1.1.10. Procesos de recuperación de proteínas del lactosuero.....	20
1.1.10.1. Concentración.....	20
1.1.10.2. Aislamiento.....	21
1.1.10.3. Hidrólisis enzimática.....	22
1.1.11. Producción nacional e internacional.....	23
1.1.12. Impacto ambiental del lactosuero.....	23
1.1.13. Aplicaciones.....	24
<b>1.2 Bebidas carbonatadas .....</b>	<b>25</b>
1.2.1. Proceso de elaboración .....	25
1.2.1.1. Elaboración de jarabes (simple y concentrado).....	25
1.2.1.2. Inyección de CO <sub>2</sub> .....	26
1.2.2. Bebidas carbonatadas a base de lactosuero.....	26
<b>1.3 Importancia de las proteínas en la nutrición humana .....</b>	<b>27</b>
1.3.1. Ingesta diaria recomendada de aminoácidos esenciales.....	27
1.3.2. Ingesta diaria recomendada de proteínas.....	28
<b><i>CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....</i></b>	<b>29</b>
<b>2.1. Objetivo general.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2. Objetivos particulares.....</b>	<b>29</b>
<b>2.3. Cuadro metodológico.....</b>	<b>30</b>
<b>2.4. Materiales y Equipos.....</b>	<b>31</b>
<b>2.5. Obtención del Lactosuero.....</b>	<b>32</b>
<b>2.6. Determinación del porcentaje proteico del lactosuero.....</b>	<b>33</b>
<b>2.7. Aislamiento de las proteínas del lactosuero.....</b>	<b>35</b>
<b>2.8. Caracterización de las proteínas aisladas del lactosuero.....</b>	<b>38</b>
2.8.1. Método Micro-Kjeldah.....	38
2.8.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	39
2.8.3. Cromatografía en papel.....	42
<b>2.9. Proceso de elaboración de la bebida carbonatada con contenido proteico.....</b>	<b>44</b>
<b>2.10. Calidad sanitaria de la bebida.....</b>	<b>47</b>

<b>2.11. Análisis Químico Proximal de la bebida .....</b>	<b>49</b>
<b>2.12. Evaluación sensorial de la bebida .....</b>	<b>53</b>
<b><i>CAPITULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</i></b>	<b>54</b>
<b>3.1. Obtención del Lactosuero.....</b>	<b>54</b>
<b>3.2. Porcentaje proteico del lactosuero.....</b>	<b>54</b>
<b>3.3. Aislamiento de las proteínas del lactosuero.....</b>	<b>55</b>
<b>3.4. Caracterización.....</b>	<b>56</b>
3.4.1. Porcentaje proteico de las proteínas aisladas de lactosuero por Micro-Kjeldah.....	<b>56</b>
3.4.2. Proteínas presentes en el aislado de proteínas de lactosuero.....	<b>57</b>
3.4.3. Aminoácidos presentes en el aislado de proteínas de lactosuero.....	<b>60</b>
<b>3.5. Elaboración de la bebida carbonatada con contenido proteico.....</b>	<b>62</b>
<b>3.6. Calidad sanitaria de la bebida.....</b>	<b>62</b>
<b>3.7. Composición Química de la bebida.....</b>	<b>64</b>
<b>3.8. Aceptación sensorial de la bebida .....</b>	<b>65</b>
<b>3.9. Presentación comercial de la bebida carbonatada con contenido proteico.....</b>	<b>67</b>
<i>Conclusiones.....</i>	<b>68</b>
<i>Recomendaciones.....</i>	<b>70</b>
<i>Bibliografía.....</i>	<b>71</b>
<i>Apéndices.....</i>	<b>79</b>

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Diagrama ilustrativo que representa la retención y eliminación del volumen de leche en la elaboración de quesos.....</i>	<i>3</i>
<i>Figura 2. Diagrama de flujo de la elaboración de queso Oaxaca.....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 3. Estructura terciaria de la <math>\beta</math>- Lactoglobulina.....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 4. Estructura tridimensional de la <math>\alpha</math>- Lactoalbúmina.....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 5. Estructura tridimensional de la Lactoferrina.....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 6. Hidrolisis de la <math>\kappa</math>-caseína y actividad coagulante de la leche.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 7. Efecto de la concentración de sales en la solubilidad de las proteínas, salting in y salting out.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 8. Esquema representativo de la hidrólisis enzimática de una proteína nativa a péptidos de menor peso molecular.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 9. Ubicación satelital de la planta procesadora de quesos “El Eden”.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 10. Recolección del lactosuero dulce.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 11. Digestión de nitrógeno del lactosuero mediante el método Micro-Kjeldahl.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 12. Diagrama de proceso de la recuperación y aislamiento de proteínas de lactosuero.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 13. Aislamiento de proteínas del lactosuero.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 15. Cromatografía en papel.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 16. Diagrama de proceso de la bebida carbonatada sabor chocolate.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 17. Elaboración de la bebida carbonatada sabor chocolate.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 18. Incubación de placas 3M<sup>TM</sup> Petrifilm<sup>TM</sup> .....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 19. Análisis Químico Proximal de la bebida carbonatada.....</i>	<i>52</i>

<b>Figura 20.</b> <i>Evaluación sensorial de la bebida carbonatada con contenido proteico.....</i>	<b>53</b>
<b>Figura 21.</b> <i>Patrón electroforético del gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....</i>	<b>57</b>
<b>Figura 22.</b> <i>Comparación de los patrones electroforéticos del gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....</i>	<b>58</b>
<b>Figura 23.</b> <i>Medios de cultivo (3M™ Petrifilm™).....</i>	<b>63</b>
<b>Figura 24.</b> <i>Gráfica circular del porcentaje de preferencia de las bebidas carbonatadas: 164 y 364.....</i>	<b>65</b>
<b>Figura 25.</b> <i>Propuesta de etiqueta de la bebida carbonatada con proteínas aisladas de lactosuero sabor chocolate “Carbo-Prot”.....</i>	<b>67</b>

## LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1. Especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas del lactosuero líquido pasteurizado.....</i>	<i>5</i>
<i>Tabla 2. Composición del lactosuero dulce y ácido.....</i>	<i>7</i>
<i>Tabla 3. Contenido de vitaminas en el lactosuero.....</i>	<i>7</i>
<i>Tabla 4. Composición de aminoácidos esenciales del lactosuero y del huevo (g/100g de proteína).....</i>	<i>14</i>
<i>Tabla 5. Valor biológico de algunas fuentes alimenticias comunes de proteína.....</i>	<i>16</i>
<i>Tabla 6. Algunas aplicaciones y beneficios de las proteínas de lactosuero en alimentos....</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 7. Requerimientos estimados diarios de aminoácidos esenciales.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 8. Cantidad diaria de proteínas recomendada para cubrir las necesidades de la población con la dieta mixta de México y Latinoamericana.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabla 9. Descripción de equipos utilizados.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 10. Mezcla catalizadora en la digestión de proteínas por el método de Micro-Kjeldahl.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 11. Formulaciones de las bebidas carbonatadas sabor chocolate.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabla 12. Especificaciones microbiológicas. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado: pasteurizados y deshidratados.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabla 13. Porcentaje proteico del lactosuero líquido por el método Micro-Kjeldahl.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabla 14. pH y cantidad de proteína obtenida por repetición.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabla 15. Porcentaje del nitrógeno total y de proteína de las muestras de proteína aislada de lactosuero.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 16. Valores Rf de los aminoácidos revelados de las proteínas aisladas de lactosuero en la cromatografía en papel.....</i>	<i>60</i>

<i>Tabla 17. Comparación de valores Rf de los aminoácidos (Cisteína, Fenilalanina, Isoleucina, Metionina, Leucina, Lisina, Treonina, Triptófano, Valina) con los Rf de los aminoácidos revelados de las proteínas aisladas de lactosuero.....</i>	<b>61</b>
<i>Tabla 18. Comparación de los resultados de la evaluación microbiológica (3M<sup>TM</sup> Petrifilm<sup>TM</sup>) de la bebida carbonatada con los límites máximos de la NOM-243-SSAI-2010.....</i>	<b>63</b>
<i>Tabla 19. Composición química de la bebida carbonatada.....</i>	<b>64</b>
<i>Tabla 20. Nivel de agrado, sabor de las bebidas 164 y 364.....</i>	<b>66</b>

## ***SIMBOLOGÍA Y ABREVIATURAS***

<b>ADN</b>	Acido Desoxirribonucleico
<b>DBO</b>	Demanda Biológica de Oxigeno
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations
<b>HPLC</b>	High Performance liquid Chromatography
<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>pH</b>	Potencial de Hidrogeno
<b>pI</b>	Punto Isoeléctrico
<b>RTCA</b>	Reglamento Técnico Centroamericano
<b>S.A de C.V.</b>	Sociedad Anónima de Capital Variable
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide
<b>UHT</b>	Ultra High Temperature
<b>WPC</b>	Whey Protein Concentrate
<b>WPI</b>	Whey Protein Isolate

## ***UNIDADES***

<b>%</b>	Porcentaje
<b>% p/v</b>	Porcentaje de concentración peso/volumen
<b>°C</b>	Grado Celsius
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µl</b>	Micro litro
<b>cm</b>	Centímetro
<b>g</b>	Gramo
<b>g/mL</b>	Gramo por mililitro
<b>g/L</b>	Gramo por Litro
<b>g/Kg*día</b>	Gramo por Kilogramo al día
<b>h</b>	Hora
<b>K cal</b>	Kilocaloría
<b>K Da</b>	Kilodalton
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>L</b>	Litro
<b>M</b>	Molaridad
<b>min</b>	Minuto
<b>mg</b>	Miligramo
<b>mg/Kg*día</b>	Miligramo por kilogramo al día
<b>mg/ml</b>	Miligramo por mililitro
<b>min</b>	Minutos
<b>ml</b>	Mililitro

<b>N</b>	Normalidad
<b>NMP/ g o ml</b>	Número más probable por gramo o mililitro
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>seg</b>	Segundo
<b>T</b>	Temperatura
<b>t</b>	Tiempo
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>UFC/ml o g</b>	Unidades formadoras de colonia por mililitro o gramo
<b>V</b>	Volts

## **INTRODUCCIÓN**

Los productos lácteos que mayormente se producen en México y a nivel mundial son los quesos. Aproximadamente 90% del total de la leche utilizada en la industria quesera es eliminada como lactosuero, el cual retiene cerca de 55% del total de nutrientes de la leche como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales (Aider *et al.*, 2009). El lactosuero es un líquido translucido de color verdoso que se obtiene mayoritariamente después de la precipitación de la caseína en la elaboración de quesos, presenta un sabor ligeramente ácido (Badui, 2013). Se estima que alrededor de 110 a 115 millones de toneladas de lactosuero son producidas a nivel mundial a través de la elaboración de quesos, de este valor, el 45% se desechan en ríos, lagos y otros centros de aguas residuales, o en el suelo, lo que representa una pérdida significativa de nutrientes ocasionando serios problemas de contaminación (Londoño, 2006).

Las proteínas y la lactosa se transforman en contaminantes cuando el lactosuero es arrojado al ambiente sin ningún tipo de tratamiento, ya que la carga de materia orgánica que contienen permite la reproducción de microorganismos produciendo cambios significativos en la DBO (Demanda Biológica de Oxígeno) del agua contaminada. La descarga continua de suero en estos ecosistemas altera sus propiedades fisicoquímicas, en el caso de los suelos, disminuye el rendimiento de las cosechas. Una industria quesera media que produzca diariamente 40,000 litros 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 brindándoles una aplicación benéfica al ser humano con el fin de no contaminar el ambiente (Valencia *et al.*, 2009).

El porcentaje del lactosuero que se recupera es tratado y transformado en varios productos alimenticios, de los cuales cerca del 45% es usado directamente en forma líquida, 30% en polvo, 15% como lactosa y subproductos, y el resto como concentrados de proteína de lactosuero (Panesar *et al.*, 2007).

El lactosuero representa una rica y variada mezcla de proteínas que poseen amplio rango de propiedades químicas, físicas y funcionales (Baro *et al.*, 2001). Concretamente, suponen alrededor del 20% de las proteínas de la leche de bovino, siendo su principal componente la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) con cerca de 10% y  $\alpha$ -lactoalbúmina con 4% de toda la proteína láctea (Onwulata, 2008). Debido a su alto contenido de aminoácidos esenciales, el valor biológico de las proteínas del lactosuero es alto comparado con el de otras proteínas, incluso superior que las proteínas del huevo (Azcona, 2013). En la actualidad, mediante la Biotecnología alimentaria es posible aislar las proteínas del lactosuero para conferirles diversas aplicaciones en la elaboración de una amplia gama de alimentos y bebidas (Foegeding y Luck, 2002).

En el presente trabajo se aislaron y caracterizaron las proteínas del lactosuero producido en la fabricación de queso panela (suero dulce), de tal manera que sean empleadas como un ingrediente en la elaboración de una bebida carbonatada sabor chocolate. Con ello se generan dos vertientes significativas: se contribuye a disminuir la contaminación ambiental, y a su vez, se obtiene un producto que pueda ayudar a mejorar la nutrición del consumidor, aportándole proteínas de alto valor biológico con una rica y variada fuente de aminoácidos esenciales.

## **Capítulo 1 Antecedentes**

### **1.1. Lactosuero o suero de leche**

El lactosuero es un líquido translúcido de color amarillo verdoso que se obtiene mayoritariamente después de la precipitación de la caseína en elaboración de quesos, presenta un sabor ligeramente ácido (Badui, 2013). Aproximadamente el 10% de la leche utilizada en la industria quesera es aprovechada en la elaboración de estos productos lácteos, el 90% restante se elimina en forma de lactosuero, el cual retiene cerca de 55% del total de nutrientes de la leche como la lactosa, lípidos, vitaminas, sales minerales y proteínas de alta calidad biológica (Parra, 2009).

La definición de lactosuero que se muestra en la **NOM-243-SSA1-2010** y la **NOM-155-SCFI-2012** es la siguiente: “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”.



**Figura 1. Diagrama ilustrativo que representa la retención y eliminación del volumen de leche en la elaboración de quesos.**

#### **1.1.1. Obtención del Lactosuero**

La leche es la materia prima con la cual se elabora el queso. La producción de quesos demanda gran cantidad de leche. Para obtener un kilogramo de queso, se necesitan aproximadamente 10 litros de leche y se generan 9 litros de lactosuero

como subproducto. Solamente un 10% del total de la leche utilizada se retiene en el queso donde predominan las caseínas, precipitándose en la cercanía de su punto isoelectrico (pH=4.6) mediante la adición de quimosina o ácidos orgánicos (Jelen 2003).

La **NOM-243-SSA1** define al queso como un producto elaborado de la cuajada de la leche estandarizada y pasteurizada de especies animales, obtenida de la coagulación de la caseína con cuajo (renina), gérmenes lácticos, enzimas, ácidos orgánicos comestibles con o sin tratamiento ulterior.

En el mundo hay una extensa variedad de quesos, resulta muy difícil poder contabilizarlo. En México, tienen más demanda los quesos frescos (alto contenido de humedad), por ejemplo; los quesos Panela y Oaxaca. En figura 2 se muestra el diagrama de flujo en la elaboración de queso Oaxaca.

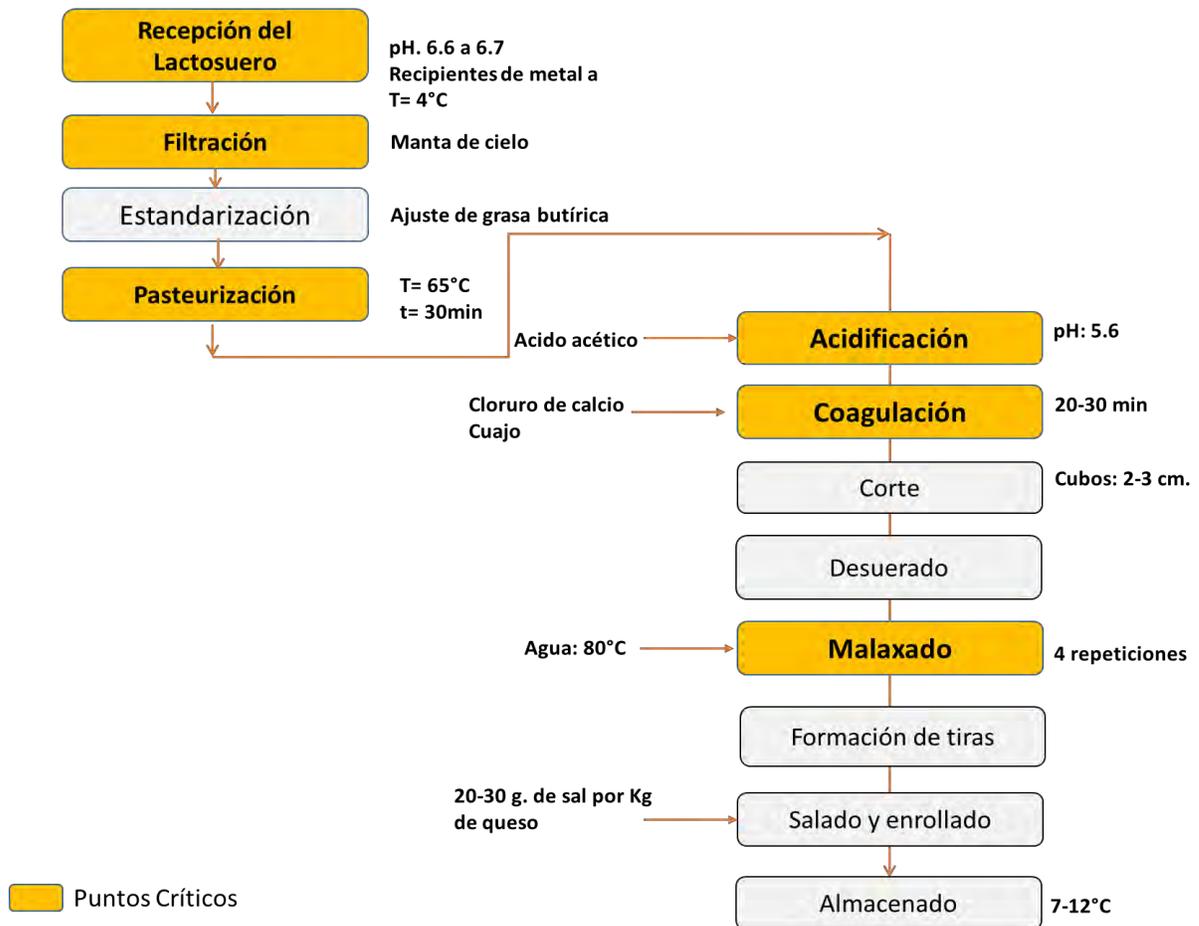


Figura 2. Diagrama de flujo de la elaboración de queso Oaxaca, adaptado de (Huerta, 2005).

Debido a sus propiedades nutricionales y funcionales, el lactosuero se ha convertido en una materia prima conveniente para obtener diferentes productos a nivel biotecnológico, por ende, es importante enfatizar en algunos parámetros fisicoquímicos los cuales permiten corroborar si el lactosuero no ha sido adulterado, lo que permite obtener un adecuado proceso de transformación. En la tabla 1, se muestran algunos de los parámetros más importantes del lactosuero de acuerdo con la **NMX-F-721-COFOCALEC-2012**.

**Tabla 1. Especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas del lactosuero líquido pasteurizado.**

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
<i>pH</i>	5.8-6.7
<i>Acidez expresada como ácido láctico (%)</i>	0.07- 0.12
<i>Densidad (g/mL)</i>	1.023 – 1.026
<i>Punto crioscópico °C (°H)</i>	-0.580°C
<i>Índice de refracción</i>	1.438 a 20°C
<i>Inhibidores</i>	Negativo
<i>Bacterias mesofílicas aerobias (UFC/mL)</i>	10 000 máx.
<i>Organismos coliformes</i>	100 máx.

**PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012.**

### **1.1.2. Tipos de Lactosuero y su composición química**

La composición química y nutricional del lactosuero puede variar considerablemente dependiendo de las características de la leche utilizada para la elaboración del queso, el tipo de queso producido y el proceso tecnológico empleado en la elaboración del queso. A partir de estas diferencias se encuentran los tipos de lactosuero. Los dos tipos más comunes de suero de leche son el dulce y el ácido según el pH que representen (Poveda, 2013).

### **1.1.2.1. Lactosuero dulce**

El lactosuero dulce se obtiene de la elaboración del queso mediante el uso de enzimas proteolíticas (quimosina o renina), las cuales actúan sobre las caseínas de la leche y las fragmentan, haciendo que éstas se desestabilicen y precipiten bajo condiciones específicas de temperatura, aproximadamente entre 15-50 °C, con un pH levemente ácido (pH 6,0-6,5) (Hernández y Vélez, 2014).

Estas enzimas se obtienen del cuarto estómago de los rumiantes y se sobre producen mediante la tecnología del ADN recombinante, constan de una sola cadena polipeptídica (monomérica). Hidrolizan el enlace fenilalanina-metionina de la  $\kappa$ -caseína originando reacciones bioquímicas que provocan la formación de una red proteica insoluble construida por uniones intermoleculares de tipo electrostático e hidrofóbico, la cual se le denomina cuajo (Jovanovic *et al.*, 2005). Los quesos Cheddar y panela se elaboran mediante este procedimiento.

### **1.1.2.2. Lactosuero ácido**

El suero ácido se genera mediante la precipitación ácida de la caseína, la cual se logra disminuyendo el pH de la leche a un valor de 4.5 o 4.6. A este pH se alcanza el punto isoeléctrico de la mayoría de las caseínas presentes; en este punto, la carga eléctrica neta de la proteína es igual a cero, lo cual produce que la micela de caseína se desestabilice y precipite, dejando en solución solamente las proteínas de tipo séricas. El lactosuero ácido presenta mayor contenido de minerales que el lactosuero dulce, esto puede ser desfavorable en algunos procesos alimenticios (Jovanovic *et al.*, 2005).

En términos promedio, el suero de leche contiene más de la mitad de los sólidos presentes en la leche original, incluyendo alrededor del 20% de las proteínas. Los nutrientes más abundantes del lactosuero son la lactosa (4,5-5% p/v), proteínas solubles (0,6-0,8% p/v), lípidos (0,4-0,5% p/v) y sales minerales (8-10% de extracto seco) (Londoño, 2006).

Presenta una cantidad rica de minerales donde sobresale el potasio, seguido del calcio, fósforo, sodio y magnesio. También cuenta con vitaminas del grupo B (tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina y ácido ascórbico) (Londoño *et al.*, 2008).

En las tablas 2 y 3 se muestran la composición química y el contenido de vitaminas del lactosuero respectivamente.

**Tabla 2. Composición del lactosuero dulce y ácido.**

<b>Componente (g/L)</b>	<b>Suero de leche dulce</b>	<b>Suero de leche ácido</b>
<b>Sólidos totales</b>	63.0-70.0	63.0-70.0
<b>Lactosa</b>	46.0-52.0	44.0-46.0
<b>Grasa</b>	0.0-5.0	0.0-5.0
<b>Proteína</b>	6.0-10.0	6.0-8.0
<b>Calcio</b>	0.4-0.6	1.2-1.6
<b>Fósforo</b>	0.4-0.7	0.5-0.8
<b>Potasio</b>	1.4-1.6	1.4-1.6
<b>Cloruros</b>	2.0-2.2	2.0-2.2

(Panesar, 2007) (Callejas 2012).

**Tabla 3. Contenido de vitaminas en el lactosuero.**

<b>Vitaminas</b>	<b>Concentración (mg/ml)</b>	<b>Necesidades diarias (mg)</b>
Tiamina	<b>0.38</b>	<b>1.5</b>
Riboflavina	<b>1.2</b>	<b>1.5</b>
Ácido nicotínico	<b>0.85</b>	<b>10-20</b>
Ácido pantoténico	<b>3.4</b>	<b>10</b>
Piridoxina	<b>0.42</b>	<b>1.5</b>
Cobalamina	<b>0.03</b>	<b>2</b>
Ácido ascórbico	<b>2.2</b>	<b>10-75</b>

(Linden y Lorient, 1996).

### **1.1.3. Proteínas presentes en el Lactosuero**

Las proteínas del lactosuero representan aproximadamente el 18-20% de las proteínas totales de la leche con respecto a las caseínas que ocupan el 80%, no constituyen la fracción más abundante en la leche, sin embargo, sí es la más interesante desde el punto de vista económico y nutricional (Parra, 2009).

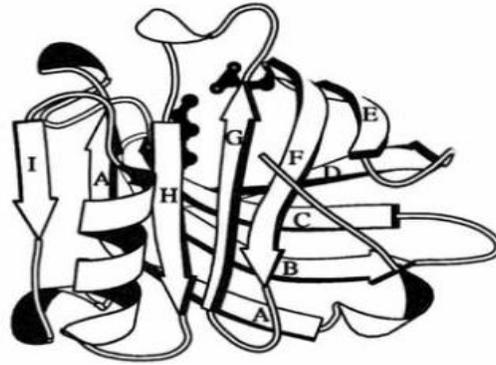
Esta fracción contiene cuatro proteínas principales:  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG),  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -La), lactoferrina e Inmunoglobulina (Ig) (Jovanovic *et al.*, 2005).

#### **1.1.3.1. $\beta$ -Lactoglobulina**

La  $\beta$ -lactoglobulina es la proteína que se encuentra en una mayor proporción en el lactosuero, representa aproximadamente el 60% de las proteínas totales del suero de leche bovino, alcanza concentraciones de 2 a 4 mg/ml. Está compuesta por 162 aminoácidos residuales; 84 de éstos son aminoácidos esenciales y es rica en aminoácidos azufrados (Jovanovic *et al.*, 2005). Su punto isoeléctrico esta entre 5.3-5.5 y su peso molecular es de 18.4 kDa (Hambling *et al.*, 1992).

Es una proteína globular compacta de estructura desordenada con distribución uniforme de residuos no polares, polares e ionizados. El centro de la proteína es hidrofóbico, por lo que es capaz de fijar moléculas hidrófobas como colesterol y retinol (Hambling *et al.*, 1992).

Se ha asociado la  $\beta$ -LG con actividades antivirales, anticarcinogénicas e hipocolesterolémicas. Se sabe que la  $\beta$ -LG liga minerales, ya que posee regiones con una gran cantidad de aminoácidos cargados, los cuales permiten fijarlos y acarrearlos durante su paso a través de la pared intestinal. Además de la función de unirse con los minerales. Su alto contenido de aminoácidos azufrados favorece la síntesis de glutatión lo cual tiene un efecto positivo sobre el sistema inmunológico (Figuroa *et al.*, 2013). En la figura 3, se presenta un modelo estructural de la  $\beta$ -Lactoglobulina.



**Figura 3. Estructura terciaria de la  $\beta$ - Lactoglobulina (Kraulis, 1991).**

### **1.1.3.2. $\alpha$ -Lactoalbúmina**

Las  $\alpha$ -lactoalbúminas son de las principales proteínas que se encuentran en la leche humana y bovina, comprenden aproximadamente del 20 al 25% de las proteínas de suero de leche (Walzem *et al.*, 2002). En la leche de vaca, la concentración de la  $\alpha$ -LA es de 1-1.5 g/L, lo cual representa el 3.4% de la proteína láctea total. Está constituida por 123 aminoácidos y cuatro enlaces disulfuro, los cuales le confieren su estructura tridimensional. Esta proteína se caracteriza por su bajo peso molecular (14.2 kDa), su punto isoeléctrico (4.2-4.5) y su elevado contenido de triptófano (alrededor del 7.2%) (Peso Echarri *et al.*, 2012).

Está constituida por una sola cadena polipeptídica la cual contienen una gran variedad de aminoácidos esenciales, incluyendo un suministro fácilmente disponible de aminoácidos de cadena ramificada (Walzem *et al.*, 2002).

La proteína  $\alpha$ -La purificada se utiliza muchas veces en fórmulas infantiles para lactantes (Marshall, 2004). También presenta una gran afinidad por el calcio y otros minerales como zinc, manganeso, cadmio, cobre y aluminio (Parra, 2009).

La concentración de albúmina de leche aumenta durante la mastitis y durante la involución mamaria. La  $\alpha$ -LA es una metaloproteína, fija el calcio en un espacio que contiene cuatro residuos de aspartato. Esta es la proteína del suero más termoestable (Figuerola *et al.*, 2013).

Por su escasa estructura secundaria (30% de  $\alpha$ -hélice y 9% de lámina- $\beta$ ), la molécula tiene una gran flexibilidad (Alexandrescu, *et al* 1993). Sin embargo, la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  unidos a su estructura y los puentes disulfuro la mantienen en una compacta estructura helicoidal con una zona interior hidrófoba (Cayot y Lorient, 1997).

La estabilidad en su conformación está relacionada con las propiedades del puente de  $\text{Ca}^{2+}$ . A  $\text{pH} < 4$ , el calcio está libre y la  $\alpha$ -LA se vuelve flexible y puede proteolizarse fácilmente. (Schlimme y Buchheim, 2002). En la figura 4 se muestra el modelo estructural de la  $\alpha$ -Lactoalbúmina.

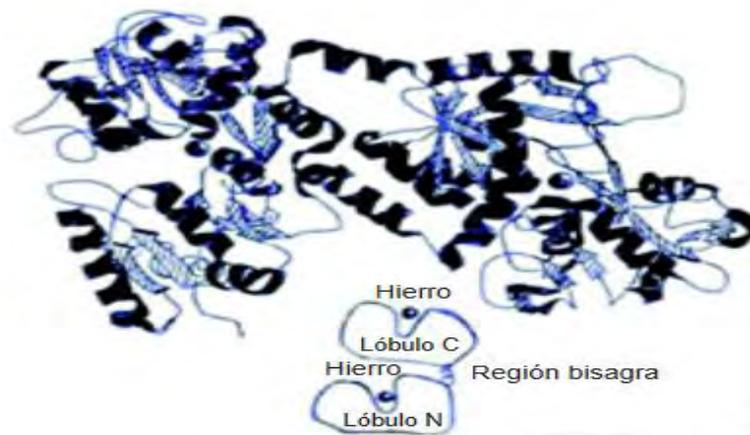


**Figura 4. Estructura tridimensional de la  $\alpha$ -Lactoalbúmina (Bravo, 2012).**

### **1.1.3.3. Lactoferrina**

La Lactoferrina (LF) es un agente antioxidante no enzimático, encontrado en la fracción de suero de la leche, así como en el calostro. La Lactoferrina de suero de leche se compone de, aproximadamente, 700 aminoácidos residuales y de una cadena de polipéptidos individuales con dos sitios de unión para iones férricos (Ver figura 5). Es una glicoproteína con un peso molecular de 80 kDa que pertenece a la familia de las proteínas transportadoras de hierro, también denominadas como transferrinas. Esta glicoproteína presenta una carga neta positiva con un punto isoeléctrico entre 8 y 8.5. La concentración de Lactoferrina en la leche bovina y calostro es de aproximadamente 0.2 mg/mL y 1.5 mg/mL, respectivamente. Las fuentes dietéticas principales de Lactoferrina son la leche, el yogur, el queso y otros productos lácteos (Walzem *et al.*, 2002).

La habilidad de la Lactoferrina de inhibir el crecimiento microbiano en condiciones *in vitro* fue una de las primeras funciones descritas para esta proteína, y esto se le atribuye a que posee la propiedad de secuestrar el hierro del medio, requerido para el metabolismo microbiano. Por otra parte, se ha demostrado que la Lactoferrina puede favorecer la respuesta inmune del organismo ya que promueve la proliferación de linfocitos y la diferenciación celular, lo cual ayuda a la reparación de los tejidos dañados, además se ha reportado que puede ayudar al tratamiento de algunos tipos de cáncer e incluso se ha llegado a proponer varios mecanismos por los cuales podría ejercer esa actividad. Por otro lado, también se ha demostrado que el efecto bactericida de esta proteína contra *Helicobacter pylori* puede ayudar a prevenir el cáncer de estómago (Figuroa *et al.*, 2013).



**Figura 5. Estructura tridimensional de la Lactoferrina (Rodríguez *et al.*, 2005)**

#### **1.1.3.4. Inmunoglobulinas (Ig)**

Las inmunoglobulinas (Ig) son glicoproteínas que actúan como anticuerpos. Existen cinco clases de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. IgG, constituyen aproximadamente el 75% de los anticuerpos en un adulto; se transfiere de la madre al niño en el útero a través de la sangre y en la lactancia materna, sirve como una primera línea de defensas inmune para el neonato, conocida como “inmunidad pasiva”. La fracción del suero de leche una cantidad significativa de inmunoglobulinas, aproximadamente del 10 al 15% del total de las proteínas del suero de leche (Marshall, 2004).

Estructuralmente las Ig son glucoproteínas formadas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas idénticas con un peso molecular de 55 a 77 kDa y dos cadenas ligeras idénticas con un peso molecular de 23 a 26 kDa, dichas cadenas a su vez están unidas por puentes disulfuro (Saniani, 2009)

#### **1.1.3.5. Glicomacropéptidos**

La fracción proteica del lactosuero contiene diversos compuestos biológicamente activos, como algunos péptidos que son inactivos dentro de la secuencia de la proteína nativa, pero una vez que son liberados por hidrólisis enzimática presentan una actividad moduladora de numerosos procesos dentro del organismo. Un glicomacropéptido (GMP) es un ejemplo de dichos péptidos, que se obtiene mediante la hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína provocada por la enzima quimosina en la elaboración de quesos (Galindo *et al.*, 2006).

Cuando la  $\kappa$ -caseína es tratada con la quimosina durante la obtención de quesos, la proteína es hidrolizada entre los aminoácidos 105 y 106 de la  $\kappa$ -caseína, que son fenilalanina y metionina respectivamente, dando como resultado dos fracciones que son: para- $\kappa$ -caseína (residuo 1 – 105) y GMP (residuo 106 – 169) el cual es removido con el suero de quesería (Chávez *et al.*, 2010).

El GMP queda soluble en el suero después de separar la cuajada, pero no está presente en la leche, por lo tanto, la detección de GMP puede utilizarse como indicador de la presencia de suero de quesería. Es de los pocos péptidos que están libres del aminoácido fenilalanina, por ende, es un producto ideal para las personas que presentan fenilcetonuria (Tomczak *et al.*, 2007).

Este es un péptido de gran interés, ya que se le atribuyen numerosas funciones biológicas como ser factor estimulador de bifido bacterias (al contener oligosacáridos), fuente de ácido siálico (importante para el desarrollo cerebral) del lactante, actividad antiviral (debido a los residuos de ácido siálico), modulador de las secreciones gástricas y puede ser objeto de nuevas digestiones dando lugar a péptidos bioactivos con actividad antitrombótica (Jiménez *et al.*, 2001).

En la figura 6, se observa la hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína

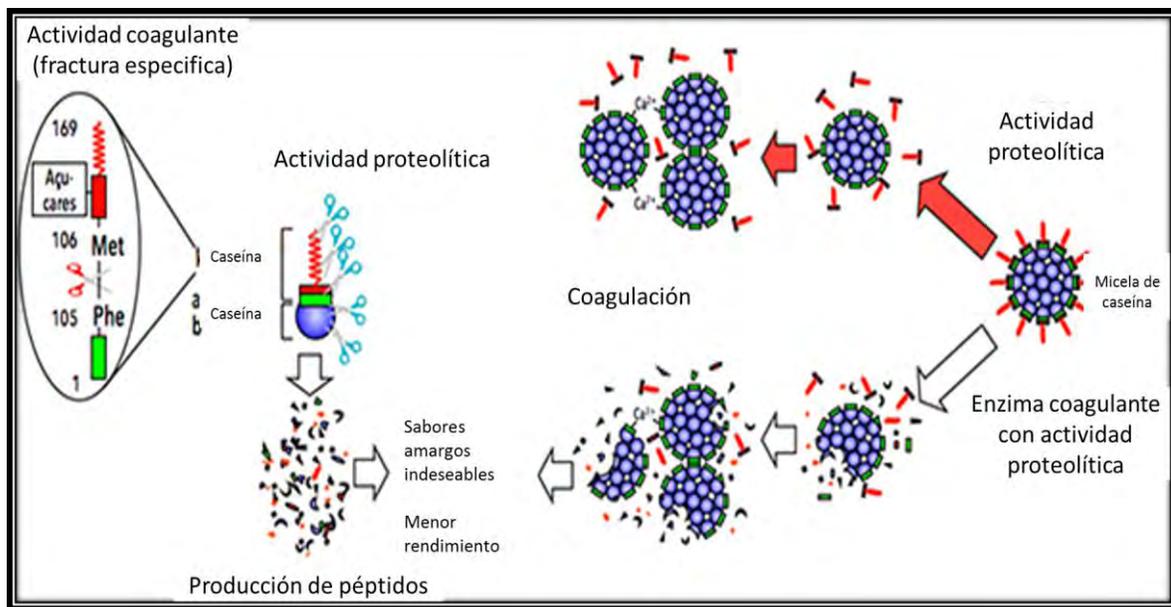


Figura 6. Hidrolisis de la  $\kappa$ -caseína y actividad coagulante de la leche (Alctesa, 2012).

#### 1.1.4. Composición de aminoácidos

Las proteínas del lactosuero desempeñan un importante papel nutritivo como una rica y balanceada fuente de aminoácidos esenciales, además, son de alto valor biológico por su contenido en triptófano, lisina, aminoácidos de cadena ramificada o BCAA por sus siglas en inglés (leucina, isoleucina, valina) y aminoácidos azufrados (cisteína, metionina), tienen una calidad similar a las del huevo y no son deficientes en ningún aminoácido (Parra, 2009).

Esto se puede observar en la siguiente tabla donde se compara el contenido de aminoácidos que contiene el lactosuero respecto al huevo, encontrándose que la leucina y la lisina son los aminoácidos que se encuentran en mayor cantidad, además, parecen ejercer determinados efectos biológicos y fisiológicos *in vivo*, potenciando la respuesta inmune, tanto humoral como celular (Baro *et al.*, 2001).

**Tabla 4. Composición de aminoácidos esenciales del lactosuero y del huevo (g/100g de proteína)**

<b>Aminoácido</b>	<b>Lactosuero</b>	<b>Huevo</b>	<b>Equilibrio recomendado por la FAO</b>
<b>Treonina</b>	6.2	4.9	3.5
<b>Cisteína</b>	1.0	2.8	2.6
<b>Metionina</b>	2.0	3.4	2.6
<b>Valina</b>	6.0	6.4	4.8
<b>Leucina</b>	9.5	8.5	7.0
<b>Isoleucina</b>	5.9	5.2	4.2
<b>Fenilalanina</b>	3.6	5.2	7.3
<b>Lisina</b>	9.0	6.2	5.1
<b>Histidina</b>	1.8	2.6	1.7
<b>Triptófano</b>	1.5	1.6	1.1

(Linden y Lorient, 1996)

La calidad de la proteína se refiere a la capacidad para proporcionar nitrógeno en un patrón equilibrado de aminoácidos esenciales y no esenciales (Jovanovic *et al.*, 2005).

La razón de eficiencia proteica (PER) de una fuente de proteína, mide el aumento de peso de los animales jóvenes por gramo de proteína consumido durante un período de tiempo dado. Las proteínas del suero tienen proporcionalmente más aminoácidos que contienen azufre (cisteína, metionina) que las caseínas, lo que contribuye un mayor PER (3.5) comparado con el de las caseínas (2.6). Cualquier proteína con un PER de 2.5 se considera de buena calidad (Walzem *et al.*, 2002).

#### **1.1.5. Valor biológico**

Para conocer la utilidad de las proteínas presentes en los alimentos de llevar a cabo procesos de crecimiento y formación de estructuras corporales en un organismo, se utiliza el término de “calidad de la proteína”, calidad que se estima utilizando

diversas medidas experimentales, una de ellas es el “**valor biológico de la proteína**” (Hernández y Sastre. 1999).

El valor biológico (VB) de una proteína representa la proporción de nitrógeno absorbido que es retenida por el organismo para su aprovechamiento y utilización (Hernández y Sastre. 1999).

$$VB = \left( \frac{NR}{NA} \right) * 100$$

dónde: NR= Nitrógeno retenido y NA= Nitrógeno absorbido.

El valor biológico de una proteína es alto cuando contiene aminoácidos esenciales en proporción cualitativa y cuantitativa adecuada (Hernández y Sastre. 1999).

Durante la síntesis proteica deben estar presentes en las células todos los aminoácidos necesarios, si falta alguno, la síntesis puede no efectuarse. Por ello, si la proteína ingerida contiene todos los aminoácidos esenciales en las proporciones necesarias para el hombre, se dice que es de alto valor biológico. Por el contrario, si solo tiene pequeñas cantidades de uno de ellos (aminoácido limitante), será de menor calidad. En general, las proteínas de origen animal tienen mayor valor biológico que las de procedencia vegetal (Hernández y Sastre. 1999).

Debido a su contenido de aminoácidos esenciales, el valor biológico de las proteínas del lactosuero es alto comparado con el de otras proteínas, incluso superior que las proteínas del huevo, las cuales por su valor biológico de 100, son consideradas como proteínas de referencia para designar la calidad proteica de otras fuentes alimenticias (Hernández y Sastre. 1999).

En la tabla 5 se muestra la comparación del valor biológico de las proteínas de lactosuero con otras fuentes alimenticias de proteína.

**Tabla 5. Valor biológico de algunas fuentes alimenticias comunes de proteína.**

<b>Proteína</b>	<b>VB</b>
<b>Proteínas del lactosuero</b>	<b>104</b>
<b>Huevo</b>	100
<b>Leche</b>	91
<b>Carne de res</b>	80
<b>Caseína</b>	77
<b>Proteína de soya</b>	74
<b>Pescado</b>	83

El **VB** captura la facilidad con la que los aminoácidos de la proteína digerida se pueden utilizar para la síntesis de proteínas en las células del organismo. Adaptado de (Colgan, 1998).

#### **1.1.6. Digestibilidad**

La digestión de las proteínas comienza en el estómago con la acción de pepsina y continua en el intestino delgado con enzimas pancreáticas como la tripsina, enzima derivada del tripsinógeno que se une a las proteínas de la dieta para comenzar su hidrólisis digestiva a aminoácidos, los cuales se absorben en presencia de sodio (León, 2006). La entrada de proteínas al estómago estimula la secreción de gastrina, a su vez, esta hormona estimula la formación de HCl que actúa como un antiséptico y mata a la mayoría de los entes patógenos que ingresan al tracto intestinal (Contreras, 2003).

Desde el punto de vista digestivo, las proteínas del lactosuero permanecen solubles al pH ácido del estómago, esto provoca que su tránsito por el estómago sea muy rápido y que lleguen al intestino intactas, permitiendo que su absorción sea a través de un sector más largo del intestino. Su largo paso por el intestino facilita una gran variedad de funciones, por ejemplo: interacciones con la flora gastrointestinal o con los minerales presentes en el bolo alimenticio mejorando su absorción (Figuroa *et al.*, 2013).

La  $\beta$ -LG presenta alta resistencia a la digestión gástrica en algunos seres humanos, lo que origina intolerancia y/o alergenicidad. Sin embargo, tratamientos industriales

como esterilización, calentamiento o presión hidrostática alta y la hidrólisis, mejoran la digestibilidad de la  $\beta$ -LG presente en el lactosuero (Pescumma *et al.*, 2008).

### 1.1.7. Solubilidad

La solubilidad de una proteína es la manifestación termodinámica del equilibrio entre las interacciones proteína-proteína y solvente-proteína, que a su vez dependen de la hidrofobicidad y naturaleza iónica (Hayase *et al.*, 1973).

Las cuatro categorías en las que se clasifican las proteínas de acuerdo a su solubilidad son las siguientes:

- a) **Albuminas:** Se solubilizan en agua a pH de 6.6 (albumina sérica,  $\alpha$ -Lactoalbúmina).
- b) **Globulinas:** Son solubles en soluciones salinas diluidas a pH de 7.0 ( $\beta$ -Lactoglobulina).
- c) **Glutelinas:** Son solubles en soluciones ácidas (pH 2) y alcalinas (pH 12) (glutelinas de trigo).
- d) **Prolaminas:** Son solubles en etanol al 70% (gluten de maíz, gliadinas del trigo) (Badui, 2013).

En los valores de pH superiores e inferiores al pH isoelectrico, las proteínas tienen una carga neta positiva o negativa respectivamente. En el punto isoelectrico las proteínas presentan una solubilidad mínima que, al graficar, permite observar curvas en "U". La  $\beta$ -Lactoglobulina (pI 5.2) es altamente soluble en su pH isoelectrico, porque no existe repulsión electrostática y contiene una alta concentración de residuos hidrofílicos en su superficie, comparados con los no polares, por lo que la proteína permanecerá soluble en su pI. (Badui, 2013).

Una proteína en su pI no es que no tenga carga, si no que las cargas positivas igualan a las negativas en su superficie. En este punto si la hidrofílicidad y las fuerzas de repulsión por hidratación provenientes de estos residuos cargados son mayores que las interacciones hidrofóbicas proteína-proteína, la molécula se mantendrá soluble en su pI. (Badui, 2013).

La funcionalidad de las proteínas del lactosuero depende de la solubilidad del pH y la fuerza iónica. Por ejemplo, si se añade sal progresivamente a un suero altamente desmineralizado (90%) a pH 4,5-5,5 se observan dos efectos macroscópicos: Inicialmente la solubilidad de las proteínas aumenta (salting-in) y, después de llegar a un máximo, decrece (salting-out). El salting-in se considera a partir de una red con la base de interacciones electrostáticas no específicas entre la molécula de proteína cargada y su medio. La solubilidad empeora debido al tratamiento térmico alrededor de 69°C a pH 4,5-6,5. Los tratamientos térmicos por encima o debajo de este pH causan menos pérdidas de solubilidad de las proteínas de suero (Voet, 2006).

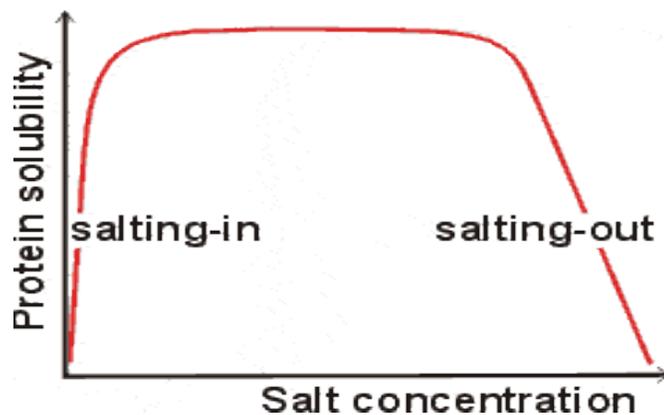


Figura 7. Efecto de la concentración de sales en la solubilidad de las proteínas, salting in y salting out. (Chaplin, 2016).

#### 1.1.8. Propiedades nutricionales y funciones biológicas

En la actualidad se sabe que las proteínas de lactosuero tienen diversos beneficios a la salud humana al ser ingeridas. Se han realizado diversos estudios en donde se demuestra científicamente que las proteínas del lactosuero parecen ejercer determinados efectos biológicos y fisiológicos *in vivo*, potenciando la respuesta inmune celular (Baro *et al*, 2001). Una posible explicación de los efectos de las proteínas de lactosuero sobre el consumo de alimentos puede residir en los péptidos presentes y sus acciones fisiológicas relevantes al consumirlos regularmente (Chung *et al.*, 2009).

Todas las proteínas del lactosuero tienen diferentes funciones biológicas. Entre los principales beneficios se destacan: prevención del cáncer (mama, colon y próstata),

incremento de los niveles de glutatión (aumento de la vulnerabilidad de las células tumorales y el tratamiento de los pacientes con VIH), transportador de retinol, ácidos grasos y vitamina D, actividades antimicrobianas y antivirales, incremento de la respuesta de saciedad, efectos inmunomoduladores, crecimiento de la masa muscular y actividad prebiótica (Marshall, 2004).

Las proteínas de lactosuero aportan cisteína (2,5%), a su vez este aminoácido dador de azufre es precursor de la síntesis de glutatión (antioxidante esencial que protege al organismo contra el daño producido por la generación de radicales libres causado por daño oxidativo y peroxidación) y otras micro fracciones que favorecen la liberación de factores de crecimiento como la somatomedina (IGF-1) que estimula la recuperación y crecimiento muscular (Di Pasquale, 1997, Naclerio, 2007).

#### **1.1.9. Propiedades funcionales**

Las proteínas de lactosuero ejercen diversas propiedades funcionales que pudieran ser benéficas en la elaboración de diferentes productos alimenticios, dentro de estas propiedades se tienen la solubilidad, hidratación, emulsificación, textura y consistencia, formación de espuma y propiedades de gelificación (Spellman *et al.*, 2009).

Estas propiedades permiten ser usadas como ingrediente para varios propósitos en la industria alimenticia. La fracción proteica compuesta por  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina es responsables de las propiedades de emulsificación y formación de espuma en soluciones de lactosuero.

Sin embargo, la fracción menor compuesta por inmunoglobulinas (13%), lactoferrina (3%), albumina de suero bovina (5%) y enzimas pueden influir significativamente en la funcionalidad del lactosuero (Aider *et al.*, 2009).

Algunos factores afectan las propiedades funcionales de las proteínas de lactosuero. Estos incluyen propiedades intrínsecas, como la secuencia ácida de aminoácidos y la composición, la estructura secundaria y terciaria, el carácter hidrófilo/hidrófobo de la superficie de la proteína y las distribuciones de carga; y también factores extrínsecos como pH, fuerza iónica, temperatura e interacción con otros ingredientes alimenticios (Nicorescu *et al.*, 2009).

#### **1.1.10. Procesos de recuperación de proteínas del Lactosuero**

Existen diversos procesos y tecnologías para recuperar las proteínas de lactosuero y brindarles una aplicación nutricional o como aditivo alimentario, los procesos más utilizados en la industria para separar estas proteínas son: concentración, aislamiento, hidrólisis.

##### **1.1.10.1. Concentración**

Los concentrados de proteína de lactosuero (WPC) son elaborados por la ultrafiltración que consiste de una membrana semipermeable, la cual selectivamente permite pasar materiales de bajo peso molecular como agua, iones y lactosa, mientras retiene materiales de peso molecular alto como la proteína. El retenido es así concentrado por evaporación, liofilizado y secado por aspersion (Zadow, 2003). El concentrado del suero de leche es generalmente clasificado como el más básico de los tipos de proteínas de suero de leche (Muro *et al.*, 2010). Es un producto menos costoso que el aislado de proteínas de suero de leche o que el hidrolizado (Etzel, 2004).

El WPC es definido por el Código de Estados Unidos de Regulaciones Federales como la sustancia obtenida por la eliminación de suficiente constituyente no proteico a partir de lactosuero para que el producto seco final contenga no menos del 25% de proteína. La mayoría de los WPC en el mercado contienen 34-35% u 80% de proteína (Foegeding y Luck, 2002).

Los WPC conteniendo 35% de proteína son elaborados como sustitutos de leche descremada, y son utilizados en la elaboración de yogurt, queso procesado, en varias aplicaciones de bebidas, también son empleados en salsa, helados, pasteles,

panadería, carne y productos de formulaciones infantiles debido a las propiedades funcionales excelentes de sus proteínas y sus beneficios nutricionales, resaltando que los WPC contienen un 80% de proteína, son formulados para aplicaciones como gelificación, emulsificantes y formación de espuma (Foegeding y Luck, 2002).

#### **1.1.10.2. Aislamiento**

Los aislados de proteína de lactosuero (Whey Protein Isolate) tienen como características importantes un 90% de proteína y entre 4-5,5% de agua. Por su alta pureza, los WPI son usados extensivamente en suplementación nutricional, bebidas deportivas y medicinales. Han sido empleados como proteínas de alimentos funcionales en formulaciones de alimentos, por sus propiedades de hidratación, gelificación, emulsificación, y propiedades para formación de espuma de WPI (Foegeding y Luck, 2002).

El aislado de proteína de suero se somete a un procesamiento más fino que los WPC, por lo que la proteína es más pura que la del concentrado. La mejoría en la calidad de la proteína puede ocurrir por un tiempo de filtrado más largo o por el proceso de cromatografía de intercambio iónico (Bounous, 2000).

Un método de aislamiento es el intercambio iónico; éste se basa en el uso de resinas especiales con carga iónica inversa a la carga de las proteínas. Una vez que las proteínas han sido atraídas por la resina y separadas así de la grasa, la lactosa y los minerales, la carga de dichas resinas es nuevamente invertida para provocar su separación de las proteínas. Este método genera un producto con alta concentración y pureza de proteína (90-92%), muy baja en grasa y en lactosa, pero desafortunadamente se pierden una gran parte de las microfracciones bioactivas del suero, especialmente las microfracciones lactoferrina y lactoperoxidasa (Acero *et al.*, 2006).

### 1.1.10.3. Hidrólisis enzimática

Si los concentrados y aislados de las proteínas de lactosuero pasan por un proceso de hidrólisis, las cadenas de proteínas más largas se descomponen en péptidos menores, (dipéptidos y tripéptidos), este proceso reduce la alergenicidad de las proteínas y es un proceso semejante a una pre-digestión proteica (Muro *et al.*, 2010).

La hidrólisis enzimática proteica se realiza normalmente en un biorreactor, con control de agitación, pH, temperatura y tiempo del proceso. El sustrato se disuelve en agua hasta que el pH y la temperatura se estabilizan. A continuación, se agrega la proteasa dando inicio a la hidrólisis. A medida que ésta progresa, se produce una disminución del pH debido a la rotura de los enlaces peptídicos. En los casos de hidrólisis enzimática el pH debe ser mantenido en el óptimo de la enzima mediante la adición de base diluida. Para finalizar la hidrólisis proteica la enzima puede ser inactivada con calor, mediante una disminución del pH o con una combinación de ambos. O también puede ser retirada del medio mediante filtración y la proteína finalmente precipitada (Benítez *et al.*, 2008).

Uno de los principales usos de los hidrolizados proteicos de lactosuero, es su utilización como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas enterales con destino a la alimentación infantil, de adultos enfermos y en suplementos deportivos, estas dietas entéricas se diseñan para ser absorbidas en el intestino sin una digestión previa en el estómago (Lebenthal, 1983).

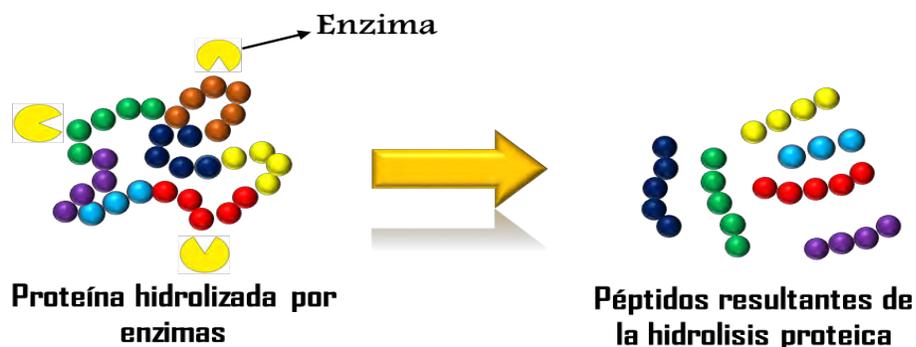


Figura 8. Esquema representativo de la hidrólisis enzimática de una proteína nativa a péptidos de menor peso molecular.

### **1.1.11. Producción nacional e internacional**

La distribución de la producción de lactosuero en el mundo en el año 2005 fue: Europa 53%, América del norte y central 28%, Asia 6%, África 5%, Oceanía 4%, América del sur 4% y anualmente estos porcentajes representan 110-115 millones de toneladas métricas de lactosuero producidas a nivel mundial a través de la elaboración de quesos (Londoño, 2006). Los países productores de queso y por ende de lactosuero más importantes son Estados Unidos, Francia, Alemania e Italia (Carrillo, 2002).

El éxito de los productos lácteos y la obtención de nuevos productos ha aumentado la producción de lactosuero, el cual se incrementa año con año, situación de la que nuestro país no es la excepción. El suero producido en México es de cerca de 1 millón de toneladas y contiene 50 mil toneladas de lactosa y 5 mil toneladas de proteína (Valencia *et al.*, 2009).

### **1.1.12. Impacto ambiental del lactosuero**

A pesar de que el lactosuero posee gran riqueza nutricional potencialmente utilizable, desafortunadamente el 45% de lactosuero producido a nivel mundial es descargado al drenaje y llega a ríos y suelos, causando un problema serio de contaminación. La descarga continua de suero en estos ecosistemas altera sus propiedades fisicoquímicas. En el caso de los suelos, disminuye el rendimiento de las cosechas, pero además se observa el fenómeno de lixiviación. Este fenómeno se presenta porque el lactosuero contiene nitrógeno soluble en agua, el cual es arrastrado a través de diversas capas llegando hasta los mantos freáticos y convirtiéndose en un peligro para la salud de los animales y humanos. Una industria quesera media que produzca diariamente 40,000 litros 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 brindándoles una aplicación benéfica al ser humano con el fin de no contaminar el ambiente (Valencia *et al.*, 2009).

### 1.1.13. Aplicaciones

Del 100% de la producción mundial de lactosuero, solo el 55% es aprovechado y transformado en varios productos alimenticios, de ese porcentaje, el 40% se procesa para la recuperación de sus proteínas (Panesar *et al.*, 2007).

Las proteínas de lactosuero son usadas ampliamente en una gran variedad de alimentos gracias a sus propiedades funcionales y nutricionales. En la tabla 6, se describen algunas de las aplicaciones más importantes de estas proteínas en alimentos.

**Tabla 6. Algunas aplicaciones y beneficios de las proteínas de lactosuero en alimentos.**

<b>Aplicaciones en</b>	<b>Algunos beneficios</b>
<b>Productos de panadería</b>	Incrementar el valor nutricional, funcionar como emulgente, reemplazar la adición de huevo, dar cuerpo a la masa
<b>Quesos</b>	Incrementar el valor nutricional, funcionar como emulgente y gelificante, mejorar propiedades organolépticas, mejorar consistencia, incrementar la cohesividad
<b>Bebidas</b>	Incrementar el valor nutricional, mejorar la viscosidad y solubilidad, mejorar la estabilidad coloidal.
<b>Postres</b>	Funcionar como emulgente, dar cuerpo y textura a los productos
<b>Confitería</b>	Funcionar como emulgente y facilitar el batido
<b>Productos cárnicos</b>	Funcionar como pre-emulgentes y gelificantes
<b>Otros</b>	Alimentos de mayor valor nutricional y bajo costo, alimentos para deportistas, para personas de la tercera edad, formulas nutricionales especiales para mantener peso saludable o aumentar consumo de proteína, formulas infantiles

Adaptado de (Poveda, 2013).

## **1.2. Bebidas carbonatadas**

El Codex Alimentarius y el RTCA definen a las bebidas carbonatadas como “todas las bebidas saborizadas a base de agua con adición de anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>) y con edulcorantes nutritivos, no nutritivos o intensos y otros aditivos alimentarios permitidos. Incluye a las gaseosas (bebidas a base de agua con adición de anhídrido carbónico, edulcorantes y aromatizantes) y bebidas con gas como “colas”. Estas bebidas pueden ser transparente o turbias. Incluye las llamadas bebidas para deportistas con gas que contienen niveles elevados de nutrientes y otros ingredientes como cafeína, taurina y carnitina (Maldonado, 2012).

### **1.2.1. Proceso de elaboración**

En la elaboración de las bebidas carbonatadas se realizan diversos procesos sistemáticos dentro de los cuales se identifican los siguientes: recepción y almacenamiento de materia prima, cocción, filtración, enfriamiento (en intercambiador de calor), almacenamiento de producto, elaboración de los jarabes, homogenizado, enfriamiento, inyección de CO<sub>2</sub>, embotellado, etiquetado, embalaje y despacho (Mera y Cedeño., 2012).

#### **1.2.1.1. Elaboración de jarabes (simple y concentrado)**

Uno de los ingredientes de mayor trascendencia que tienen las bebidas carbonatadas son sin duda los jarabes. Se deben elaborar según el sabor de la bebida bajo estándares de calidad y sanidad. Este proceso se divide en dos etapas: elaboración del jarabe simple y elaboración del jarabe concentrado. En la elaboración del jarabe simple se emplea agua purificada la cual se vierte en un tanque de dilución y se le agrega azúcar industrial, después la mezcla homogenizada pasa por un proceso de filtración y pasteurización, eliminando la materia extraña y microorganismos patógenos respectivamente, con esto se concluye el proceso del jarabe simple. Posteriormente el jarabe simple se envía a otro tanque para darle un tiempo de reposo y mezclarlo con los aditivos necesarios dependiendo la formulación de cada sabor, dichos aditivos pueden ser

saborizantes, colorantes, edulcorantes y conservadores, a este proceso se le denomina jarabe terminado (Maldonado, 2012).

#### **1.2.1.2. Inyección de CO<sub>2</sub>**

La inyección de CO<sub>2</sub> de las bebidas carbonatadas industrialmente se efectúa en un equipo denominado “carbocooler”. En éste, se dosifica agua tratada y jarabe terminado según la formulación correspondiente a la bebida a elaborar, para luego pasar a un sistema de enfriamiento y su posterior inyección de gas carbónico. La bebida preparada, pasa a la llenadora para ser envasada obteniendo así, la bebida carbonatada (Mera y Cedeño, 2012).

#### **1.2.2. Bebidas carbonatadas a base de lactosuero**

Cuando se habla de bebidas carbonatadas inmediatamente hay una relación directa con la producción de refrescos, en donde el único macronutriente de interés nutrimental y calórico es la sacarosa. Las bebidas carbonatadas con proteína no son muy comunes en el mercado, su popularidad se traslada a consumidores que practican algún deporte y que desean un aporte extra de proteínas y carbohidratos, ayudándoles a mejorar su rendimiento físico, Esta cuestión no delimita que cualquier persona las pueda consumir, ya que al ser bebidas con contenido proteico, las hace más nutritivas que cualquier otro refresco convencional.

En México específicamente en el estado de Yucatán, la empresa Embotelladora de Refrescos Pino, S.A. de C.V producía y comercializaba una bebida carbonatada llamada “El Soldado de Chocolate” la cual contenía como ingredientes principales azúcar, leche pasteurizada, cocoa, malta y vainilla.

La utilización del lactosuero como bebida refrescante es obstaculizada por la presencia de componentes grasos, este problema se solucionó al utilizar lactosuero desproteinizado y sin grasa. Un ejemplo muy conocido de bebida refrescante a base de lactosuero es “Rivella” producida en Suiza desde 1950 y hoy en día consumida en Canadá y Holanda. “Rivella” es una bebida de lactosuero pasteurizada, carbonatada, con un sabor de fruta agridulce y un pH de 3,7 (Parra, 2009).

### **1.3. Importancia de las proteínas en la nutrición humana**

Las proteínas constituyen uno de los componentes fundamentales en la nutrición humana (León, 2006).

Las proteínas son macromoléculas las cuales desempeñan el mayor número de funciones en las células de los seres vivos. Forman parte de la estructura básica de tejidos (músculos, tendones, piel, uñas, etc.), durante todos los procesos de crecimiento y desarrollo, crean, reparan y mantienen los tejidos corporales; además desempeñan funciones metabólicas (actúan como enzimas, hormonas, anticuerpos) y reguladoras: asimilación de nutrientes, transporte de oxígeno y de grasas en la sangre, eliminación de materiales tóxicos, regulación de vitaminas liposolubles y minerales, etc. Un gramo de proteína aporta 4 Kcal (Garrett y Grisham, 2004).

#### **1.3.1. Ingesta diaria recomendada de aminoácidos esenciales**

En la tabla 7 se presentan los requerimientos diarios de aminoácidos esenciales valorados en base al grupo de edad de la población.

**Tabla 7. Requerimientos estimados diarios de aminoácidos esenciales.**

<b>Requerimientos, mg/ Kg * día</b>				
<b>Aminoácido</b>	<b>Infantes 3-4 meses</b>	<b>Niños 2 años</b>	<b>Niños 10-12 años</b>	<b>Adultos</b>
Histidina	28	-	-	8-12
Isoleucina	70	31	28	10
Leucina	161	73	42	14
Lisina	103	64	44	12
Metionina más cisteína	58	27	22	13
Fenilalanina más tirosina	128	69	22	14
Treonina	87	37	28	7
Triptofano	17	12.5	3.3	3.5
Valina	93	38	25	10

(González *et al.*, 2007)

### 1.3.2. Ingesta diaria recomendada de proteínas

En la tabla 8 se presentan los requerimientos diarios de proteínas de personas de distinta edad, sexo y estado fisiológico según la FAO.

**Tabla 8. Cantidad diaria de proteínas recomendada para cubrir las necesidades de la población con la dieta en México y Latinoamericana <sup>(1)</sup>.**

	<b>Edad</b>	<b>Ingesta recomendada (g/Kg/día)</b>
<b>Niños</b>	4-5 meses	2,5
	7-9 meses	2,2
	10-12 meses	2,0
	1-2 años	1,6
	2-3 años	1,55
	3-5 años	1,5
	5-12 años	1,35
	<b>Hombres</b>	12-14 años
	14-16 años	1,3
	16-18 años	1,2
	18 y más años	1,0
<b>Mujeres</b>	12-14 años	1,3
	14-16 años	1,2
	16-18 años	1,1
	18 años y más	1,0
<b>Cantidad adicional por día (g)</b>		
<b>Embarazo</b>		8
<b>Lactancia primeros 6 meses</b>		23
<b>Lactancia después de 6 meses</b>		16

(UNU, 1988)

(1). Calculado en base a recomendaciones de FAO/OMS/UNU 1985. Proteína con digestibilidad verdadera de 80-85% y cómputo aminoacídico de 90% en relación a la leche o huevo.

## **Capítulo 2 Metodología Experimental**

### **2.1. Objetivo General**

Aislar y caracterizar las proteínas presentes en el lactosuero dulce mediante un tratamiento térmico en condiciones ácidas, para emplearlas como un ingrediente en la elaboración de una bebida carbonatada sabor chocolate, obteniendo un producto de alto aporte nutricional, que pueda contribuir a mejorar y complementar la nutrición del consumidor.

### **2.2. Objetivos Particulares**

**Objetivo 1:** Recuperar las proteínas de lactosuero fresco a través de un tratamiento térmico en condiciones ácidas para su posterior aislamiento.

**Objetivo 2:** Caracterizar las proteínas aisladas de lactosuero mediante Micro-Kjeldah, Cromatografía en papel y Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para asegurar si el porcentaje proteico, los aminoácidos, y las proteínas que se reportan en la bibliografía están presentes.

**Objetivo 3:** Elaborar la bebida carbonatada sabor chocolate partiendo de una formulación teórica, diseñada con base a la ingesta diaria recomendada de nutrientes establecida para la población Mexicana.

**Objetivo 4.** Evaluar la calidad sanitaria de la bebida a través de pruebas microbiológicas para garantizar su inocuidad.

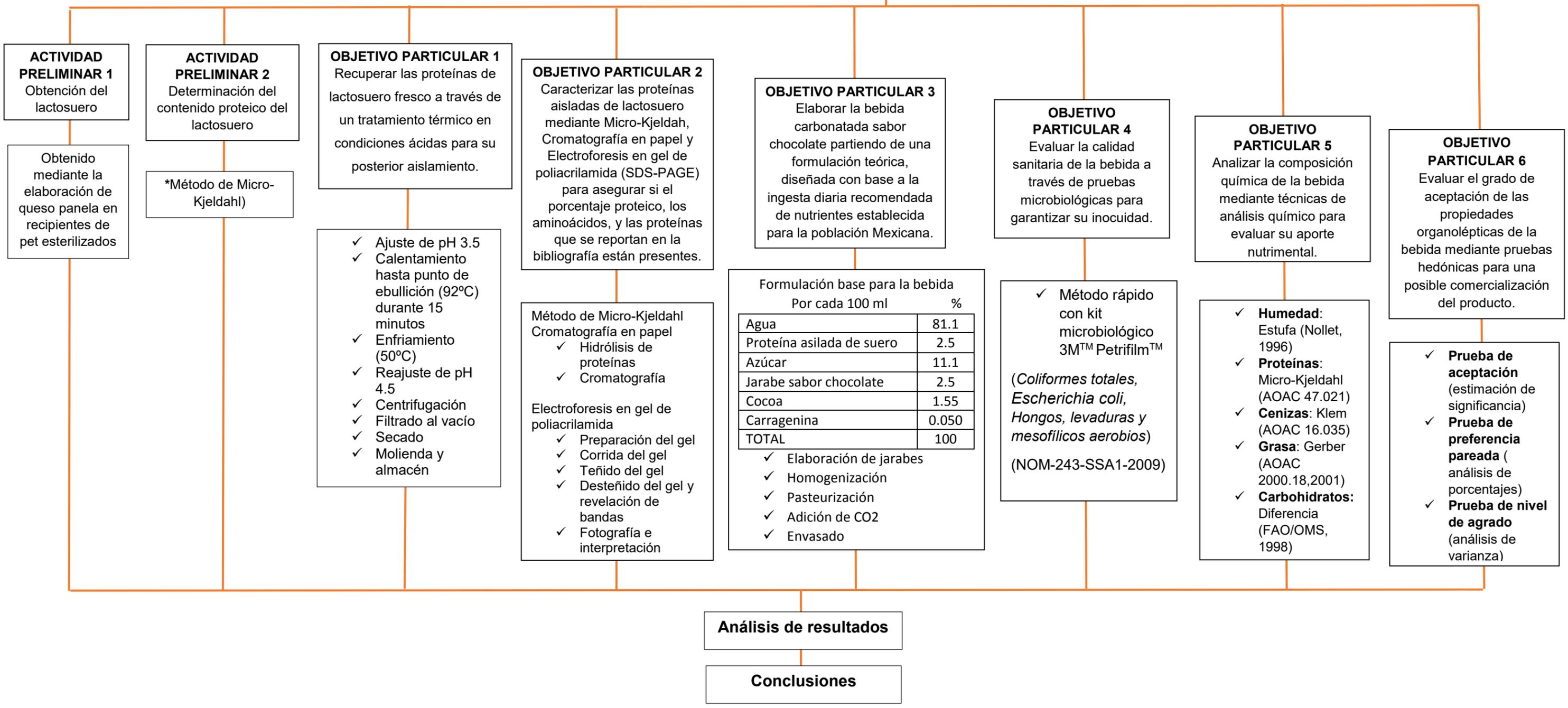
**Objetivo 5.** Analizar la composición química de la bebida mediante técnicas de análisis químico para evaluar su aporte nutricional.

**Objetivo 6.** Evaluar el grado de aceptación de las propiedades organolépticas de la bebida mediante pruebas hedónicas para una posible comercialización del producto.

**PROBLEMA**  
Aislamiento y caracterización de proteínas de lactosuero para la elaboración de una bebida carbonatada con contenido proteico

**2.3. Cuadro Metodológico**

**OBJETIVO GENERAL**  
Aislar y caracterizar las proteínas presentes en el lactosuero dulce mediante un tratamiento térmico en condiciones ácidas, para emplearlas como un ingrediente en la elaboración de una bebida carbonatada sabor chocolate, obteniendo un producto de alto aporte nutricional que pueda contribuir a mejorar y complementar la nutrición del consumidor.



**ACTIVIDAD PRELIMINAR 1**  
Obtención del lactosuero

Obtenido mediante la elaboración de queso panela en recipientes de pet esterilizados

**ACTIVIDAD PRELIMINAR 2**  
Determinación del contenido proteico del lactosuero

\*Método de Micro-Kjeldahl)

**OBJETIVO PARTICULAR 1**  
Recuperar las proteínas de lactosuero fresco a través de un tratamiento térmico en condiciones ácidas para su posterior aislamiento.

- ✓ Ajuste de pH 3.5
- ✓ Calentamiento hasta punto de ebullición (92°C) durante 15 minutos
- ✓ Enfriamiento (50°C)
- ✓ Reajuste de pH 4.5
- ✓ Centrifugación
- ✓ Filtrado al vacío
- ✓ Secado
- ✓ Molienda y almacén

**OBJETIVO PARTICULAR 2**  
Caracterizar las proteínas aisladas de lactosuero mediante Micro-Kjeldahl, Cromatografía en papel y Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para asegurar si el porcentaje proteico, los aminoácidos, y las proteínas que se reportan en la bibliografía están presentes.

- Método de Micro-Kjeldahl
- ✓ Hidrólisis de proteínas
  - ✓ Cromatografía
- Electroforesis en gel de poliacrilamida
- ✓ Preparación del gel
  - ✓ Corrida del gel
  - ✓ Teñido del gel
  - ✓ Desteñido del gel y revelación de bandas
  - ✓ Fotografía e interpretación

**OBJETIVO PARTICULAR 3**  
Elaborar la bebida carbonatada sabor chocolate partiendo de una formulación teórica, diseñada con base a la ingesta diaria recomendada de nutrientes establecida para la población Mexicana.

Formulación base para la bebida  
Por cada 100 ml

	%
Agua	81.1
Proteína asilada de suero	2.5
Azúcar	11.1
Jarabe sabor chocolate	2.5
Cocoa	1.55
Carragenina	0.050
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>

- ✓ Elaboración de jarabes
- ✓ Homogenización
- ✓ Pasteurización
- ✓ Adición de CO2
- ✓ Envasado

**OBJETIVO PARTICULAR 4**  
Evaluar la calidad sanitaria de la bebida a través de pruebas microbiológicas para garantizar su inocuidad.

- ✓ Método rápido con kit microbiológico 3M™ Petrifilm™
- (*Coliformes totales, Escherichia coli, Hongos, levaduras y mesofilicos aerobios*)  
(NOM-243-SSA1-2009)

**OBJETIVO PARTICULAR 5**  
Analizar la composición química de la bebida mediante técnicas de análisis químico para evaluar su aporte nutricional.

- ✓ **Humedad:** Estufa (Nollet, 1996)
- ✓ **Proteínas:** Micro-Kjeldahl (AOAC 47.021)
- ✓ **Cenizas:** Klem (AOAC 16.035)
- ✓ **Grasa:** Gerber (AOAC 2000.18,2001)
- ✓ **Carbohidratos:** Diferencia (FAO/OMS, 1998)

**OBJETIVO PARTICULAR 6**  
Evaluar el grado de aceptación de las propiedades organolépticas de la bebida mediante pruebas hedónicas para una posible comercialización del producto.

- ✓ **Prueba de aceptación** (estimación de significancia)
- ✓ **Prueba de preferencia pareada** (análisis de porcentajes)
- ✓ **Prueba de nivel de agrado** (análisis de varianza)

**Análisis de resultados**

**Conclusiones**

## 2.4. Materiales y equipos

Durante el trabajo experimental, se emplearon diversos materiales y equipos que permitieron llevar a cabo adecuadamente las actividades experimentales. En la tabla 9 se describen los equipos empleados.

**Tabla 9. Descripción de equipos utilizados**

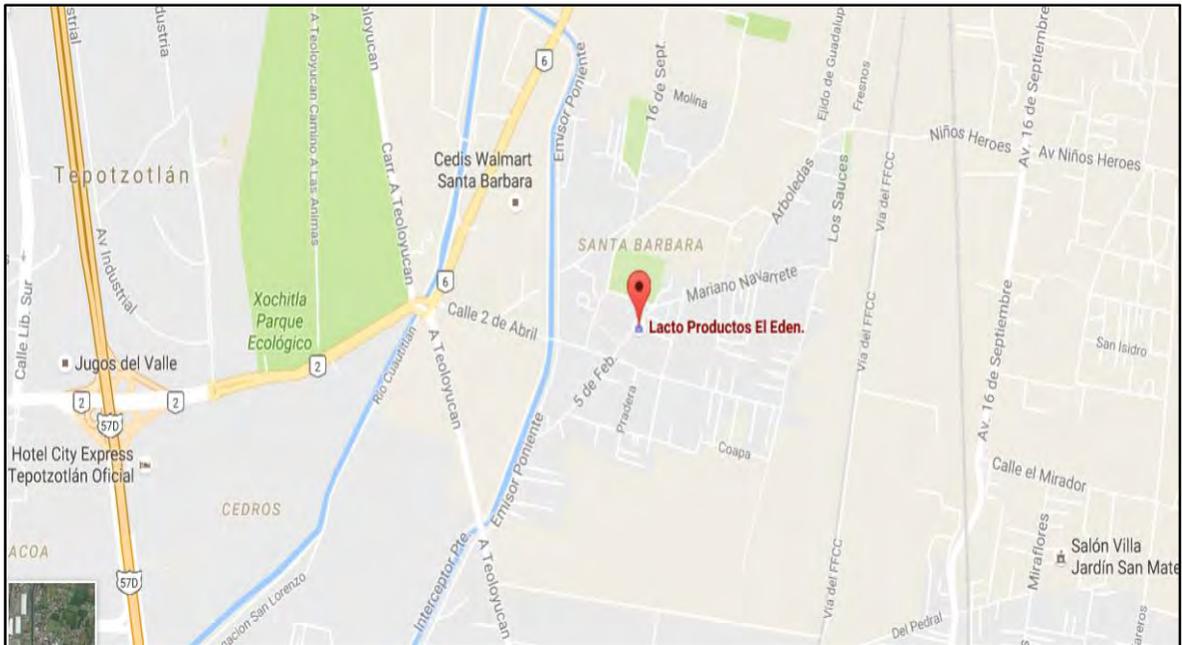
<b>EQUIPO</b>	<b>MARCA</b>	<b>MODELO</b>
Potenciómetro	Horizon Ecology Co	5997-20
Centrifuga	Dupont Sorvall	RC-5
Microondas	Panasonic	Inverter 1200W
Bomba de vacío	KNF Lab	UN811KTP
Estufa	Quiney Lab	30Gc Lab Oven
Termoagitador	Thermo Scientific	SP131325
Digestor Kjeldahl	Scorpion Scientific	-----
Destilador Kjeldahl	Labconco	-----
Termobalanza	Precisa	XM 50
Balanza digital	OHAUS	Scout-Pro
Balanza analítica	OHAUS	FA1104
Cámara de electroforesis	Bio-Rad	Mini-Protean Tetra Cell
Fuente de poder	E-C Apparatus Corporation	EC 105
Incubadora	Blue M	C-4008-Q
Incubadora con agitación	New Brunswick Scientific	NO'5
Thermoblock	Lab-Line	Multi-blok
Cámara fotográfica	Kodak	Gel Logic 100
Mezclador	Braun	MR 430 CA
Inyector de CO <sub>2</sub>	Soda Stream	C100/COOL

## Materiales y reactivos utilizados

Los reactivos que se utilizaron durante la etapa experimental fueron de las marcas: Sigma-Aldrich, J.T. Baker, Fermont, MERCK, ICN, HYCEL, AyT, CIVEQ y Productos Químicos Monterrey S.A. El material de laboratorio que se empleó fue de la marca PYREX.

## 2.5. Obtención del lactosuero

El lactosuero con el cual se trabajó, fue obtenido en una planta procesadora de quesos llamada “El Eden” ubicada en el municipio de Teoloyucan, Estado de México. En la Figura 9, se muestra su ubicación satelital.



**Imagen 9. Ubicación satelital de la planta procesadora de quesos “El Eden”**

(<https://www.google.com.mx/maps/place/Lacto+Productos+El+Eden./@19.7144555,-99.1845971,15.72z/data=!4m5!3m4!1s0x0:0x40a7e565821f38de!8m2!3d19.714235!4d-99.18722>).

El lactosuero fresco que se obtuvo fue del tipo dulce, producto de la elaboración de queso panela. En la recolección del lactosuero, se empleó un recipiente de plástico esterilizado, con el objetivo de prevenir la proliferación de microorganismos que pudieran alterar el producto.

Debido a que el lactosuero es altamente perecedero, es de suma importancia procesarlo inmediatamente después de su obtención. En la Figura 10, se muestra su recolección.



**Figura 10. Recolección del lactosuero dulce.**

## **2.6. Determinación del porcentaje proteico del lactosuero**

Para obtener lecturas más confiables, se removieron los pequeños residuos de caseínas realizando una filtración utilizando tela manta de cielo.

Se determinó el contenido proteico del lactosuero mediante el Método de Micro-Kjeldahl. El fundamento de la técnica se describe a continuación:

**Fundamento:** Se basa en la descomposición de compuestos de nitrógeno orgánicos. Fijación del  $N_2$  en forma de  $(NH_4)_2SO_4$  y liberación del  $N_2$  en forma de  $NH_3$  mediante la adición de una base fuerte de NaOH y aplicación de calor. Se realiza la recepción del  $NH_3$  en  $H_3BO_3$ . Los aniones del borato así formado se titulan con HCl estandarizado, lo cual se convierte en el nitrógeno de la muestra (A.O.A.C, 1990) (Método 47.021).

### **Cálculos:**

Para conocer el porcentaje de nitrógeno total, se ocupó la ecuación 1.

$$\%N = \frac{(N)(V_2 - V_1)(14.007)}{W} * 100 \dots\dots\dots (\text{ec. 1})$$

dónde: **N** es la normalidad del HCl; **V2** es el gasto en mililitros de la disolución de HCl en la muestra; **V1** es el gasto en mililitros de la disolución de HCl en blanco; **W** es la masa de la muestra en mg.

Para conocer el porcentaje de proteína del lactosuero, se ocupó la ecuación 2.

$$\%P = (\%N)(F) \dots\dots\dots (\text{ec.2})$$

donde: %N, es el porcentaje de nitrógeno total; F es el factor de conversión para calcular el contenido proteico en productos lácteos, el cual es de **6.25**

**Procedimiento:**

- ✓ En matraces Kjeldahl se depositó la mezcla catalizadora y la muestra de lactosuero de acuerdo a la siguiente tabla:

**Tabla 10: Mezcla catalizadora en la digestión de proteínas por el método de Micro-Kjeldahl**

Componente	Blanco	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
Lactosuero (ml)	-----	2.5	2.5	2.5
Sulfato de potasio (g)	2	2	2	2
Oxido de mercurio (mg)	40	40	40	40
Ácido sulfúrico (ml)	2	2	2	2

- ✓ Se digirieron las muestras en un digestor Kjeldahl marca *Scorpion Scientific* hasta que estas quedaran totalmente clarificadas (aproximadamente dos horas) (Ver figura 11).
- ✓ Las muestras digeridas se destilaron empleando 10ml de solución NaOH (60 gramos de NaOH, 5 gramos de Tiosulfato de sodio y 100 ml de agua).
- ✓ Por cada muestra se recolectaron 40ml del destilado, se le adicionaron 10ml de ácido bórico y dos gotas de la mezcla indicadora (azul y rojo de metilo).
- ✓ La mezcla se titula con HCl al 0.02N, posteriormente se cuantifican los mililitros gastados en la titulación.
- ✓ Con los datos de mililitros gastados se realizaron los cálculos pertinentes.

- ✓ Se llevó a cabo por triplicado y se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.
- ✓ El resultado obtenido experimentalmente se comparó con el valor reportado en la literatura.



**Figura 11. Digestión de nitrógeno del lactosuero mediante el método Micro-Kjeldahl**

### **2.7. Aislamiento de las proteínas del lactosuero**

Se precipitaron las proteínas del lactosuero a nivel laboratorio mediante un tratamiento térmico en condiciones ácidas para su posterior aislamiento, empleando métodos físicos de separación como centrifugación y filtración al vacío. El proceso de aislamiento que se llevó a cabo fue propuesto por (Hill *et al.*, 1982) realizando algunas modificaciones.

El trabajo experimental tuvo lugar en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, el cual brindó recursos para la realización del presente proyecto. A continuación, en la Figura 12, se presenta el diagrama de proceso del aislamiento de proteínas de lactosuero seguido de su descripción.

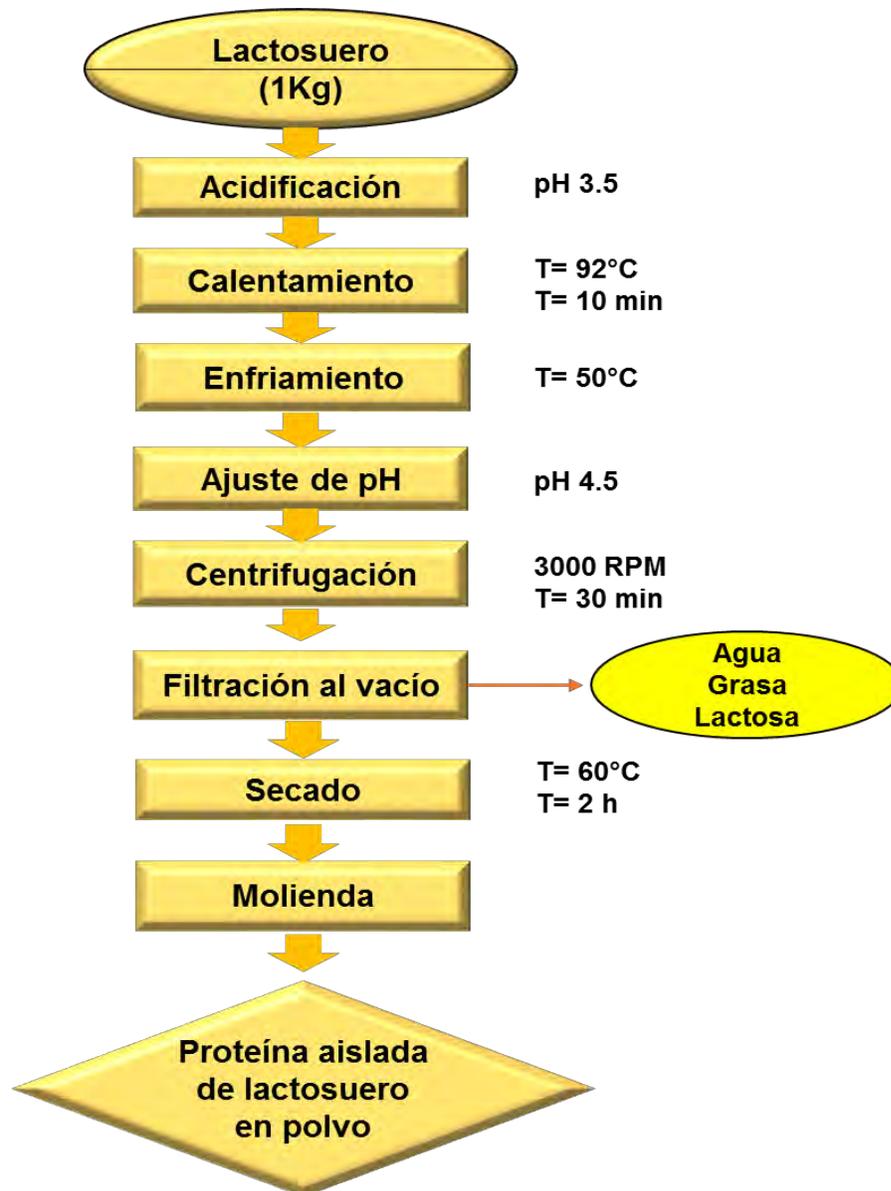


Figura 12. Diagrama de proceso de la recuperación y aislamiento de proteínas de lactosuero. Modificado de (Hill *et al*, 1982).

**Descripción del proceso:**

- ✓ Todos los utensilios y materiales que se emplearon en el aislamiento de las proteínas del lactosuero fueron previamente lavados y esterilizados con agua en ebullición para evitar una contaminación microbiana.
- ✓ Para medir la disminución de pH a 3.5, se utilizó un potenciómetro marca *Horizon Ecology Co*.

- ✓ En un recipiente de acero inoxidable esterilizado, se calentó el lactosuero hasta su punto de ebullición.
- ✓ Inmediatamente después de haber sido calentado, se enfrió a una temperatura de 50°C.
- ✓ Se ajustó a pH 4.5 con NaOH al 12%
- ✓ Se vertió el lactosuero en tubos previamente calibrados (ver apéndice) y se sometió a centrifugación a 3000 rpm durante un tiempo de 30 minutos.
- ✓ Se removió el excedente de agua producto de la separación de fases en la centrifugación, posteriormente se filtró la solución de proteínas precipitadas en un sistema de filtración al vacío acoplado con un matraz kitasato, un embudo Büchner, empaques de caucho, una bomba de vacío y papel filtro Whatman No. 1, reteniendo así, partículas de alto peso molecular, de esta manera, se aislaron las proteínas de lactosuero eliminando gran parte de la materia no proteica como agua, lactosa y grasa.
- ✓ La torta de proteína que se formó producto de la filtración al vacío, se sometió a un proceso de secado en una estufa con aire caliente a 60°C durante dos horas.
- ✓ Se retiró la proteína de la estufa y se realizó la molienda en un molino mecánico casero seguido de un mortero, obteniendo proteínas aisladas de lactosuero en polvo. El producto fue envasado y almacenado a 15°C.
- ✓ Se realizaron 10 repeticiones empleando el mismo proceso (ver figura 13). En cada corrida se cuantificaron los gramos de proteína aislada por cada litro de lactosuero, se realizó un promedio de los valores obtenidos, el valor promedio se comparó con el reportado en la literatura.



**Figura 13. Aislamiento de proteínas del lactosuero.** Acidificación (a); Calentamiento (b); Centrifugación (c); Filtración al vacío (d); Molienda (e); Proteína aislada de lactosuero en polvo (f).

## 2.8. Caracterización de las proteínas aisladas del lactosuero.

Se realizó la caracterización de las proteínas aisladas de lactosuero mediante diversas técnicas para conocer el porcentaje de proteína obtenida, las proteínas presentes y el perfil de aminoácidos. Los valores obtenidos experimentalmente se compararon con los reportados en la literatura. Las técnicas y métodos que se realizaron en la caracterización fueron los siguientes:

- ✓ Micro-Kjeldahl (porcentaje de proteína)
- ✓ Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Tipo de proteínas)
- ✓ Cromatografía en papel (Tipo de aminoácidos)

### 2.8.1. Método Micro-Kjeldahl (A.O.A.C 47.021, 1990)

Para conocer el porcentaje proteico neto de las proteínas aisladas de lactosuero, se empleó el método Micro-Kjeldahl descrito en la sección 2.6, con una cantidad de

muestra de 40mg. El método se realizó por triplicado, se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación. El valor promedio experimental se comparó con el reportado en la bibliografía.

### **2.8.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

La electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) es un método analítico semipreparativo, en el que se separan biomoléculas en dependencia de su carga, su peso molecular y entre otros factores bajo la acción de un campo eléctrico (García, 2000). La SDS-PAGE es uno de los métodos más utilizados para la purificación, análisis y caracterización de proteínas (García, 2000).

Para la caracterización de las proteínas de lactosuero, se empleó un sistema de geles discontinuos tomando como referencia el procedimiento de Laemmli (1970), de esta manera se comprobó si la  $\beta$ -Lactoglobulina, la  $\alpha$ -Lactoalbúmina y las demás proteínas presentes en el lactosuero líquido se encuentran en las proteínas aisladas experimentalmente. La electroforesis se realizó en una cámara marca *Bio-Rad (Mini-Protean Tetra Cell®)* utilizando una solución de monómeros acrilamida-bis acrilamida al 40% con la cual se realizaron los geles de separación al 10% y de concentración al 4% (ver apéndice).

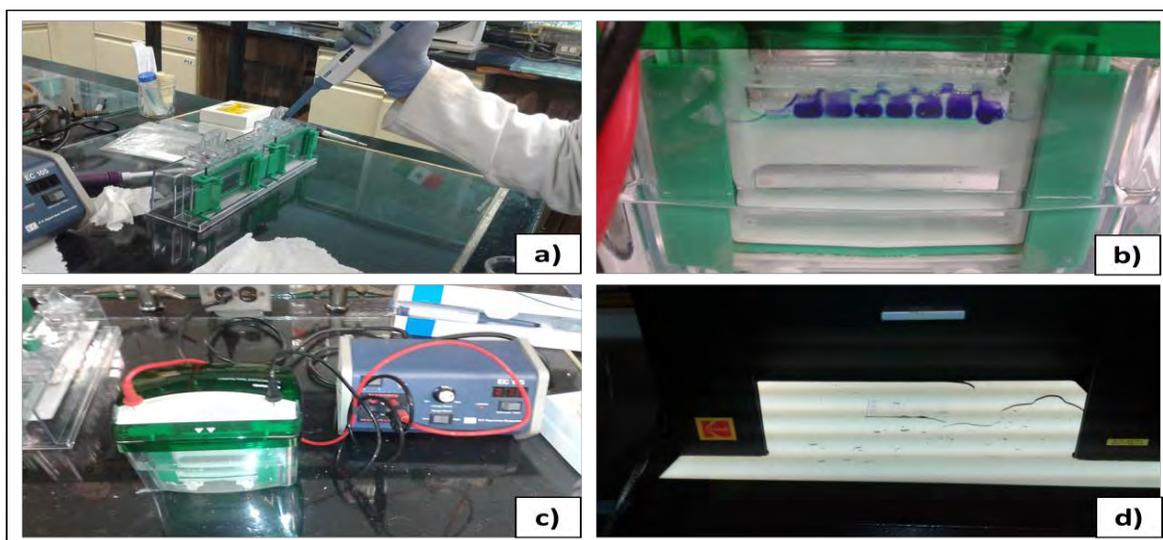
#### **Procedimiento:**

- ✓ Se montó adecuadamente el casting con el objetivo de evitar la fuga de soluciones. Con una micropipeta, se adicionó la solución del gel de separación ocupando aproximadamente el 80% del volumen total. Posteriormente se adicionó una fina capa de alcohol isopropílico como una barrera contra el oxígeno y para nivelar el gel. Se removió el alcohol isopropílico, se lavó con agua destilada y se secó con ayuda de papel filtro. Se vertió la solución del gel de concentración cubriendo la totalidad del casting e inmediatamente se colocó con cuidado el peine de 10 dientes, evitando la formación de burbujas en el interior del gel. El casting con el gel polimerizado se ensambló en la cámara interna de electroforesis, ésta a su vez se ensambló en la cámara externa.

- ✓ Se prepararon dos soluciones que por lo menos contuvieran de 20 a 30 µg de proteína en 20 µl de agua, una para las proteínas aisladas experimentalmente y otra para un producto patentado de proteínas aisladas de lactosuero llamado *Immunocal Platinum*® que a su vez sirvió como parámetro de comparación. En tubos Eppendorf previamente etiquetados, se agregaron 20 µl de cada muestra preparada y 20 µl de solución digestora (ver apéndice), se mezclaron perfectamente y se sometieron a ebullición en un termoblock durante 5 minutos, teniendo así, las muestras digeridas.
- ✓ Se añadió buffer amortiguador de corrida pH 8.3 (ver apéndice) a la cámara interna cubriendo la totalidad del casting, la misma solución se adicionó a la cámara externa hasta el límite de llenado (aproximadamente 1000 mL), se removió el peine para cargar las muestras dentro de los carriles del gel.
- ✓ Empleando jeringas Hamilton, se cargaron las muestras de la siguiente manera:
  - Carril 1: 6 µl de marcador de peso molecular de 12 proteínas marca *Sigma-Aldrich*® (Miosina de corazón porcino 200 kDa; β-Galactosidasa de *E.Coli* 116 kDa; Fosforilasa B músculo de conejo 97 kDa; BSA 66 kDa; Glutamato deshidrogenasa 55 kDa; Ovoalbúmina de huevo 45 kDa; Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 36 kDa; Anhidrasa carbónica 29 kDa; Tripsinógeno bovino 24 kDa; Inhibidor de la tripsina de soja 20 kDa; α-Lactoalbúmina 14.2 kDa; Aprotinina bovina 6.5 kDa)
  - Carril 4: 10 µl de albúmina de suero bovino pura (BSA) como control
  - Carril 7: 20 µl de muestra digerida de proteínas aisladas experimentalmente
  - Carril 10: 20 µl de muestra digerida *Immunocal Platinum*®
- ✓ Ya cargadas las muestras, se cerró la cámara y se conectó a la fuente de poder, verificando que la conexión de los electrodos sea la correcta (cátodo – y ánodo +), la electroforesis se corrió a 92 V y se detuvo hasta que el colorante de las muestras llegara al final del gel de separación.

- ✓ Se retiró el buffer de corrida de la cámara interna y se desensambló el casting. Con la ayuda de una espátula, se desprendió el gel del casting evitando cualquier fractura por mínima que sea esta.
- ✓ El gel desprendido se colocó en un recipiente con solución teñidora (ver apéndice) y se llevó a una incubadora con agitación durante 5 horas, trascurrido el tiempo, el gel se colocó en otro recipiente con la solución desteñidora I (ver apéndice) en la misma incubadora durante dos horas, por último, se transfirió a la solución desteñidora II (ver apéndice) hasta la completa eliminación de colorante, teniendo así, la distinción de las bandas de proteínas en el gel.
- ✓ El gel fue fotografiado en una cámara con transiluminador marca Kodak, colocando una ligera capa de agua evitando la adherencia del gel. Las bandas fueron interpretadas tomando como referencia el marcador de peso molecular. En la figura 14 se muestran algunas imágenes de la electroforesis.

**Nota:** La electroforesis al ser un método que presenta cierta sensibilidad, durante su ejecución fue de suma importancia emplear guantes de látex y cubre bocas.



**Figura 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).** Preparación de los geles (a); Cargado de las muestras (b); Corrimiento de la electroforesis (c); Fotografiado del gel (d).

### 2.8.3. Cromatografía en papel

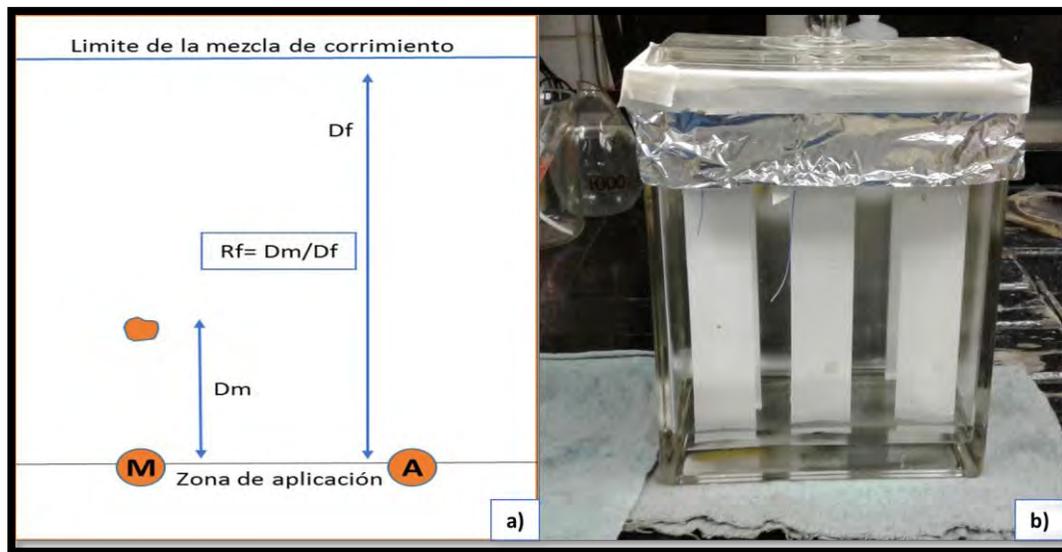
Se realizó la cromatografía en papel con el objetivo de conocer el perfil de aminoácidos esenciales presentes en las proteínas aisladas de lactosuero. Empleando soluciones de aminoácidos comerciales de la marca *Sigma-Aldrich*®, se evaluó la presencia de dichos aminoácidos en las proteínas aisladas experimentalmente.

#### **Procedimiento:**

- ✓ Se preparó la solución hidrolizante de ácido clorhídrico 6N y 2-mercaptoetanol (ver apéndice). Se tomaron 3 ml de dicha solución agregándole 3 mg de muestra. La mezcla fue depositada en una ampollita de vidrio sellada herméticamente, y se hidrolizó a una temperatura de 120°C durante 18 horas.
- ✓ Se prepararon los siguientes reactivos:
  - Mezcla de corrimiento: N butanol-Ácido acético-Agua (Stryer *et al.*, 2003) (ver apéndice).
  - Solución reveladora de aminoácidos: Ninhidrina al 0.5 % en Acetona (ver apéndice)
- ✓ En un papel vertical Whatman del No.1 (19.6 x 4.2 cm), se trazó en la parte inferior una línea horizontal de 5 cm de altura y sobre ella dos puntos equidistantes entre sí.
- ✓ Se colocaron 30 microgotas de la muestra hidrolizada sobre el punto izquierdo, y sobre el derecho 30 microgotas de la solución del aminoácido esencial mediante el uso de capilares. El procedimiento se realizó para los siguientes aminoácidos: Cisteína (Cys), Fenilalanina (Phe), Isoleucina (Ile), Metionina (Met), Leucina (Leu), Lisina (Lys), Treonina (Thr), Triptófano (Trp), Valina (Val).

- ✓ En una cámara de vidrio se vertieron 175 ml de la mezcla de corrimiento, posteriormente se colocaron los nueve papeles Whatman procurando que el solvente no entrara en contacto con las gotas aplicadas de las muestras, la cámara se cerró herméticamente observando el ascenso de la mezcla de corrimiento.
- ✓ Una vez que la mezcla de corrimiento llegó a la parte superior de los papeles, se retiraron cuidadosamente de la cámara y se les aplicó en abundancia la solución reveladora de aminoácidos. Se sometieron a una temperatura de 50°C para acelerar la revelación.
- ✓ Ya revelados los aminoácidos en el papel, se procedió a calcular su factor de movilidad mediante la siguiente ecuación:  $R_f = D_m / D_f$ ; donde  $R_f$  es el factor de movilidad;  $D_m$  es la distancia de la zona de aplicación al centro de la mancha del aminoácido revelado; y  $D_f$  es la distancia de la zona de aplicación al límite de la mezcla de corrimiento. En la figura 15 a) se muestra el esquema de corrimiento.
- ✓ El procedimiento anteriormente descrito se realizó de igual manera con un papel vertical Whatman del No.1 (54.3 x 6 cm) en el cual solamente se adiciono la muestra hidrolizada de las proteínas aisladas de lactosuero, de tal manera que se revelen los aminoácidos presentes en las proteínas y así poder comparar los valores  $R_f$  con los de los aminoácidos anteriormente descritos.
- ✓ Si el ( $R_f$ ) y el color de la banda revelada de la muestra coincide con el color de la banda del aminoácido esencial, se concluye que dicho aminoácido está presente en las proteínas aisladas de lactosuero, de lo contrario, pudo haber sufrido algún tipo de alteración durante el proceso. En la figura 15 b) se muestra el sistema donde se realizó la cromatografía en papel.

**Nota:** Al realizar el procedimiento, fue de suma importancia emplear guantes y cubre bocas, así se evitó el riesgo de que se revelaran aminoácidos presentes en el sudor de las manos o en partículas salivales.



**Figura 15. Cromatografía en papel.** Esquema de corrimiento donde M es la aplicación de la muestra hidrolizada y A es la aplicación del aminoácido (a); Sistema de corrimiento de la cromatografía en papel (b).

## 2.9. Proceso de elaboración de la bebida carbonatada con contenido proteico

Se elaboró la bebida carbonatada sabor chocolate empleando las proteínas aisladas de lactosuero como un ingrediente que ayude a incrementar el valor nutrimental del producto. En la elaboración de la bebida, se empleó una formulación teórica basada en la ingesta diaria recomendada de proteínas en la población Mexicana, se realizaron modificaciones a dicha formulación (Rosado *et al.*, 1999).

Se elaboraron tres formulaciones de la bebida carbonatada. La primera formulación fue hecha a base de las proteínas aisladas experimentalmente, la segunda con proteínas aisladas comerciales y la tercera sin adición de proteínas. Las dos primeras formulaciones se elaboraron para la evaluación sensorial, y así, conocer el nivel de agrado de ambas, la tercera formulación se elaboró solo para evaluar su contenido proteico mediante Micro-Kjeldahl y comprobar si efectivamente hubo un enriquecimiento de proteínas en la primera formulación, a la cual se le realizaron las evaluaciones microbiológicas y de AQP. En la tabla 11, se describen las formulaciones de las bebidas carbonatadas que se elaboraron, posteriormente en la figura 16, se muestra el diagrama de proceso de la bebida carbonatada sabor chocolate, ocupando un proceso similar al de (Mera y Cedeño, 2012).

Tabla 11. Formulaciones de las bebidas carbonatadas sabor chocolate

INGREDIENTE	FCPAE (%)	FCPAC (%)	FSP (%)
Agua	81.1	81.1	83.6
Proteína aislada de lactosuero	2.5	2.5	-----
Azúcar	11.1	11.1	11.1
Jarabe sabor chocolate	2.5	2.5	2.5
Cocoa	1.55	1.55	1.55
Extracto de vainilla	1.2	1.2	1.2
Carragenina	0.050	0.050	0.050
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

Formulación con proteínas aisladas experimentalmente (FCPAE); Formulación con proteínas aisladas comerciales (FCPAC); Formulación sin proteína (FSP).

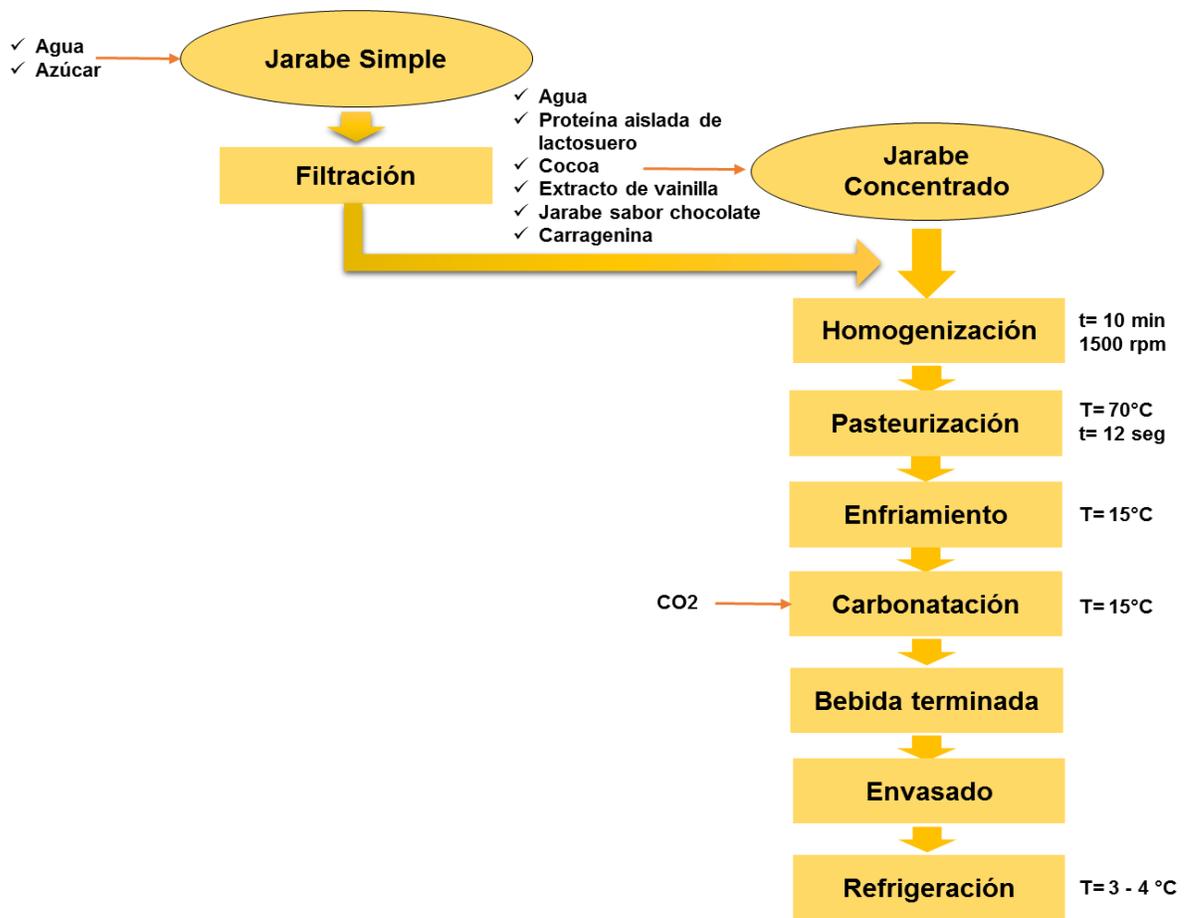


Figura 16. Diagrama de proceso de la bebida carbonatada sabor chocolate. Modificado de (Mera y Cedeño, 2012).

### **Descripción del proceso:**

- ✓ La elaboración de la bebida carbonatada se realizó con las mejores condiciones higiénicas posibles, los materiales e instrumentos que se utilizaron en su elaboración fueron perfectamente lavados y esterilizados, con el objetivo de tener un producto que cumpla con las especificaciones microbiológicas de la **NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010**.
- ✓ Se elaboró el jarabe concentrado mezclando los siguientes ingredientes: Agua, proteína aislada de lactosuero <sup>(1)</sup>, cocoa, extracto de vainilla, jarabe sabor chocolate y carragenina lambda<sup>(2)</sup>, este último ingrediente es un hidrocoloide que se utilizó para favorecer la suspensión de los sólidos.
- ✓ Se elaboró el jarabe simple realizando una dilución de azúcar en agua, se mezcló perfectamente y se filtró, removiendo cualquier impureza que pudiera tener.
- ✓ Ambos jarabes se mezclaron y se homogenizaron a 1500 rpm en un tiempo de 10 minutos, con la finalidad de promover una dispersión uniforme de todos los sólidos y favorecer el rompimiento de partículas de grasa presentes en la cocoa y en la proteína, teniendo una bebida visiblemente homogénea y agradable para el consumidor.
- ✓ Es imprescindible que cualquier producto alimenticio esté libre de microorganismos patógenos que pudieran perjudicar severamente la salud del consumidor, por ende, la bebida se pasteurizó a una temperatura de 70°C en un tiempo de 12 segundos (simulación UHT), garantizando la ausencia de cualquier forma vegetativa patógena sin comprometer las características químicas y sensoriales del producto. Inmediatamente de haber sido pasteurizada, se enfrió en baño María a una temperatura de 15°C, ya que el CO<sub>2</sub> obtiene una solubilidad aceptable a esa temperatura (ver apéndice).
- ✓ Teniendo la bebida a 15°C, se procedió a adicionarle el CO<sub>2</sub>, empleando un equipo de inyección llamado *Soda Stream*®, teniendo así la bebida terminada.
- ✓ La bebida fue envasada en botellas de vidrio esterilizadas. Posteriormente fue refrigerada a una temperatura de 3 a 4°C.

✓ Se elaboraron aproximadamente 500 ml de bebida para realizar las posteriores pruebas y análisis.

(1). Se utilizaron las proteínas aisladas experimentalmente y las proteínas aisladas comerciales en su correspondiente formulación. *Isopure*® fue la marca comercial utilizada, de igual manera se realizó la formulación sin proteína.

(2). La concentración de la carragenina lambda fue empleada con base a la recomendación del proveedor y en la especificación de la **NOM-243-SSA1-2010** la cual tiene como límite máximo 1200 mg/Kg de producto.

En la figura 17, se muestran algunas imágenes del proceso de elaboración de la bebida carbonatada sabor chocolate.



**Figura 17. Elaboración de la bebida carbonatada sabor chocolate.** Ingredientes de la bebida (a); Homogenización (b); Carbonatación (c); Equipo de inyección de CO<sub>2</sub> Soda Stream (d).

## 2.10. Calidad sanitaria de la bebida

La bebida carbonatada al contener proteínas lácteas, fue recomendable tomar como estándar de calidad sanitaria las especificaciones microbiológicas de la **NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.**

La evaluación sanitaria de la bebida se realizó con kits microbiológicos (3M™ Petrifilm™), los microorganismos analizados fueron: *Coliformes totales*, *Escherichia coli*, *Mesofílicos aerobios*, *Hongos* y *Levaduras*. Las especificaciones microbiológicas de la **NOM-243-SSA1-2010** se describen en la tabla 12.

**Tabla 12. Especificaciones microbiológicas. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado: pasteurizados y deshidratados.**

<b>Microorganismo</b>	<b>Límite máximo</b>
<b><i>Coliformes totales</i></b>	$\leq 10$ UFC/g o mL
<b><i>Escherichia coli</i></b>	$\leq 3$ NMP/g o mL
<b><i>Mesofílicos aerobios</i></b>	100,000 UFC/g o mL
<b><i>Hongos y levaduras</i></b>	50 UFC/g o mL

**NOM-243-SSA1-2010.**

**Procedimiento:**

- ✓ En total se utilizaron ocho placas, dos para cada microorganismo anteriormente especificado.
- ✓ Se preparó una solución de NaOH al 0.85%, se agregaron 9ml de la misma en un tubo de ensaye, se tapó con algodón, y se esterilizó. Posteriormente a la solución esterilizada, se le agregó 1ml de muestra y se mezcló vigorosamente.
- ✓ Se levantó el film superior de la placa, y con una micropipeta se añadió 1ml de la mezcla anterior en el centro del film inferior (medio de cultivo), después se dejó caer el film superior para sellar la placa, evitando la formación de burbujas.
- ✓ Las placas de *Coliformes totales*, *Escherichia coli* y *Mesofílicos aerobios* se incubaron a una temperatura de 37°C durante 24 horas, las placas de hongos y levaduras se dejaron a temperatura ambiente durante 72 horas.
- ✓ Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el conteo microbiano consultando la guía de interpretación de resultados 3M™ Petrifilm™. De esta manera, se evaluó si la bebida carbonatada cumplió con los estándares de

calidad sanitaria que exige la Norma. En la figura 18 se muestra la incubación de las placas.



Figura 18. Incubación de placas 3M™ Petrifilm™

### 2.11. Análisis Químico Proximal de la bebida

El análisis químico de los alimentos es la disciplina que se ocupa del desarrollo, uso y estudio de los procedimientos analíticos para evaluar las características de alimentos y de sus componentes como humedad, cenizas, proteína, carbohidratos y grasa (Muñoz *et al.*, 2014).

Se evaluó la composición química de la bebida carbonatada para conocer su aporte nutrimental, y así, poder establecer dicha información en la etiqueta del producto. Se evaluó el porcentaje de humedad, proteínas, cenizas, grasa y carbohidratos. Todas las pruebas excepto carbohidratos se realizaron por triplicado, calculando el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación (ver apéndice).

#### **Humedad: Método de secado en estufa con aire caliente**

**Fundamento:** *La determinación de secado en estufa se basa en la pérdida de peso de la muestra por vaporación del agua. Para esto se requiere que la muestra sea térmicamente estable y que no contenga una cantidad significativa de compuestos volátiles. El principio operacional del método de determinación de humedad utilizando estufa y balanza analítica, incluye la preparación de la muestra, pesado, secado, enfriado y pesado nuevamente de la muestra (Nollet, 1996).*

### **Cálculos:**

$$\%Humedad = \frac{m2 - m3}{m2 - m1} * 100 \dots \dots \dots (ec 3)$$

donde: **m1** es la masa de la cápsula vacía; **m2** es la masa de la capsula con la muestra antes del secado; **m3** es la masa de la capsula con la muestra desecada. Las unidades de masa se manejan en gramos.

### **Procedimiento:**

- ✓ Las capsulas vacías se sometieron a peso constante (gravimetría), adicionándoles a cada una 5ml de muestra homogenizada, se registró el peso de las cápsulas vacías (m1) y con la muestra añadida (m2).
- ✓ Las cápsulas se colocaron en la estufa a 105°C durante 5 horas, después del proceso de secado, se depositaron en el interior de un desecador por 20 minutos, de manera que alcanzaran la temperatura ambiente.
- ✓ Se registró el peso de las cápsulas con la muestra desecada (m3). Con los valores obtenidos, se realizaron los cálculos pertinentes.

### **Proteína: Micro-Kjeldahl (Método 47.021)**

El fundamento, los cálculos y el procedimiento de la técnica se describen en la sección 2.6. Para la formulación con proteínas aisladas experimentalmente, el análisis se realizó por triplicado, y solo una repetición para la formulación sin proteína; esta actividad se hizo con el objetivo de evaluar si hubo un aporte proteico en la bebida elaborada con proteínas de lactosuero aisladas experimentalmente. Se añadió 1ml de muestra a cada matraz Kjeldahl. Con los valores de ml gastados en la titulación, se realizaron los cálculos pertinentes (A.O.A.C, 1990).

### **Cenizas: Klem (Método 16.035)**

**Fundamento:** *Es el residuo orgánico que queda después de quemar la materia orgánica. De este modo la materia orgánica se oxida en ausencia de temperatura que va de 500 a 500°C, el material inorgánico que no se volatiliza a esta temperatura se conoce como ceniza. Se va calculando por diferencia de peso.*

*Es eficiente ya que determina tanto ceniza soluble en agua, insolubles y solubles en medio ácido (A.O.A.C, 1990).*

**Cálculos:**

$$\%Cenizas = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} * 100 \dots \dots \dots (ec 4)$$

donde: **m0** es la masa del crisol vacío; **m1** es la masa del crisol con la muestra; **m2** es la masa del crisol con las cenizas. Las unidades de masa se manejan en gramos.

**Procedimiento:**

- ✓ Los crisoles vacíos se sometieron a peso constante (gravimetría), adicionándoles a cada uno 2 ml de muestra homogenizada, se registró el peso de los crisoles vacíos (m0) y con la muestra añadida (m1).
- ✓ Los crisoles se colocaron en un termoagitador para evaporar el excedente de agua, con la finalidad de evitar la formación de espuma en la calcinación.
- ✓ Los sólidos resultantes se sometieron a calcinación empleando dos mecheros Fisher, la calcinación finaliza cuando las muestras adquieran una tonalidad blanca o grisácea.
- ✓ Las muestras se depositaron en un desecador durante 20 minutos hasta temperatura ambiente, posteriormente se registró el peso de los crisoles con las cenizas (m2) y se realizaron los cálculos pertinentes.

**Grasa: Método Gerber (2000.18, 2001):**

*Fundamento: Se basa en la digestión parcial de los componentes de la leche, excepto la grasa, en ácido sulfúrico. Emplea alcohol isoamílico para ayudar a romper la emulsión de la leche y evitar que se queme la capa de grasa. El alcohol isoamílico reacciona con el ácido sulfúrico formando un éster que es completamente soluble en dicho ácido (A.O.A.C, 1990).*

**Procedimiento:**

- ✓ A cada butirómetro Gerber se le añadieron: 10ml de ácido sulfúrico al 90%, 11ml de muestra (inclinando ligeramente el butirómetro para promover la formación de un estrato de muestra sobre el ácido) y 1ml de alcohol isoamílico, finalmente se sellaron perfectamente con el tapón.

- ✓ Los butirómetros se envolvieron con una toalla y se agitaron vigorosamente, efectuándose una reacción exotérmica que promueve la digestión de componentes no grasos.
- ✓ Se sometieron a un baño con agua caliente a 65°C por 10 minutos y se centrifugaron a una velocidad de 1200 rpm durante tres minutos, por último, se colocaron en el baño de agua caliente por cinco minutos.
- ✓ Se tomó lectura de los porcentajes de grasa en la escala del butirómetro, se registraron los valores y se realizaron los análisis correspondientes.

### **Carbohidratos: Diferencia**

**Fundamento:** *Se basa en la cualificación de carbohidratos por diferencia después de determinar humedad, proteína, grasa, cenizas y material no digerible (FAO/OMS, 1998).*

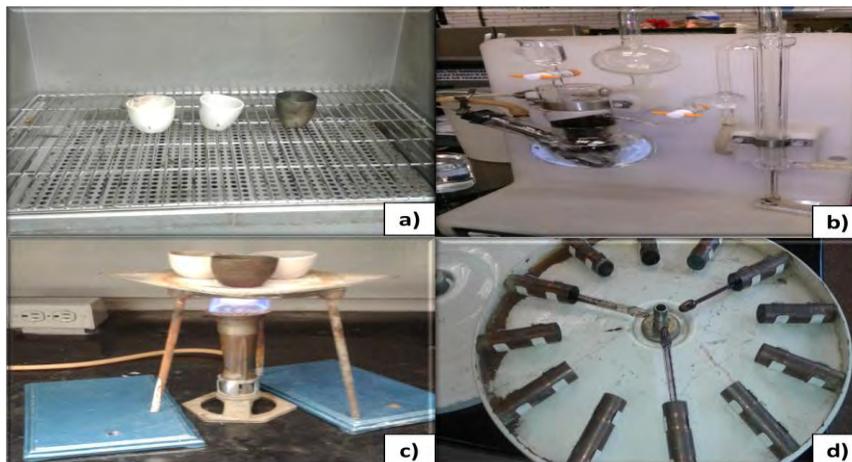
#### **Procedimiento:**

- ✓ Se calculó el porcentaje de carbohidratos utilizando la ecuación 5:

$$\%Carbohidratos = 100 - (\%Proteína + \%Humedad + \%Cenizas + \%Grasa) \dots\dots\dots (ec 5)$$

- ✓ En el cálculo, se emplearon los valores promedio de cada componente.

En la figura 19, se muestran algunas imágenes del análisis químico proximal de la bebida carbonatada.



**Figura 19. Análisis Químico Proximal de la bebida carbonatada.** Humedad por estufa (a); Proteínas por micro Kjeldahl (b); Cenizas por Klem (c); Grasa por Gerber (d).

## 2.12. Evaluación sensorial de la bebida.

Se realizó la evaluación sensorial de la bebida carbonatada con 20 jueces no entrenados de edades variadas (19 a 53 años), pidiéndoles que no ingirieran ningún tipo de alimento o bebida una hora antes de la evaluación. La formulación con proteínas aisladas experimentalmente se marcó con el número 164, y con el 364 la formulación con proteínas aisladas comerciales (*Isopure*®). Para ambas formulaciones se efectuaron pruebas de nivel de agrado y pruebas hedónicas, evaluando un parámetro (sabor) con cinco niveles de aceptación (me gusta mucho, me gusta poco, ni me gusta ni me disgusta, me disgusta ligeramente y me disgusta demasiado). A cada juez se le otorgó una encuesta con sus respectivas indicaciones (ver apéndice). Con los datos obtenidos de la evaluación sensorial, se realizaron los análisis estadísticos correspondientes y se determinó si la bebida carbonatada fue sensorialmente aceptada.

En la figura 20 se muestra una imagen de la evaluación sensorial anteriormente descrita.

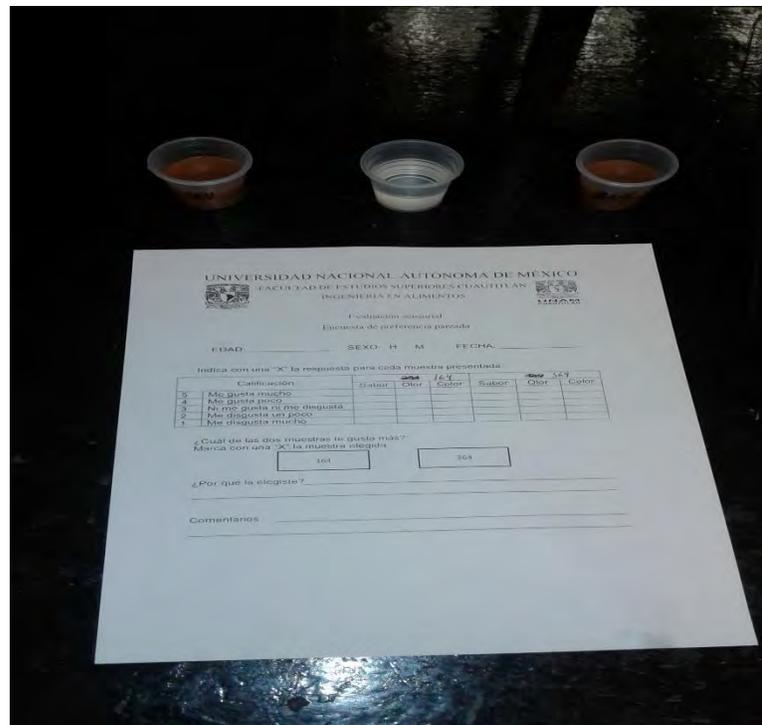


Figura 20. Evaluación sensorial de la bebida carbonatada con contenido proteico.

## **Capítulo 3 Resultados y Discusión**

### **3.1. Obtención del lactosuero**

El lactosuero dulce procedente de la planta de quesos “El Eden” fue obtenido exitosamente gracias a la ayuda y colaboración de las personas que laboran dentro de ella. Se utilizaron recipientes previamente esterilizados para su recolección e inmediatamente fue procesado para el aislamiento de sus proteínas.

### **3.2. Porcentaje proteico del lactosuero**

Fue de suma importancia analizar el porcentaje proteico del lactosuero líquido, para determinar si este sufrió algún tipo de modificación en su porcentaje proteico. En la tabla 13, se reportan los valores obtenidos del análisis del porcentaje proteico del lactosuero y se comparan con los valores reportados en la bibliografía.

**Tabla 13. Porcentaje proteico del lactosuero liquido por el método Micro-Kjeldahl.**

<b>Muestras</b>	<b>% Proteína Valor experimental</b>	<b>% Proteína Valor Bibliográfico</b>
<b>1</b>	0.93	<b>0.6 - 1</b>
<b>2</b>	0.91	
<b>3</b>	0.89	
<b>Promedio</b>	<b>0.91</b>	
<b>D. Estándar</b>	<b>0.02</b>	
<b>C.V</b>	<b>2.19</b>	

El valor promedio del porcentaje proteico del lactosuero entra en el intervalo del valor bibliográfico (0.6-1%) reportado por Panesar (2007) y Callejas (2012), con esto se afirma que el lactosuero no tuvo una modificación en su contenido proteico y a su vez, fue apto para ser procesado.

### 3.3. Aislamiento de las proteínas del lactosuero

Por cada repetición de aislamiento se empleó 1 litro de lactosuero, al cual se le midió el pH y se cuantificó la cantidad de proteína aislada por litro de lactosuero.

A continuación en la tabla 14 se reportan los resultados del aislamiento de proteínas de lactosuero, tanto del pH como de la cantidad de proteína obtenida por repetición.

**Tabla 14. pH y cantidad de proteína obtenida por repetición.**

No de Repeticiones	pH	Proteína aislada (g)
1	5.8	7.8
2	6.0	8.2
3	5.9	8.0
4	6.1	8.3
5	6.2	8.2
6	6.0	7.9
7	6.2	8.4
8	6.1	8.1
9	5.8	7.9
10	6.1	8.4
<b>Promedio</b>	<b>6.02</b>	<b>8.12</b>
<b>D. Estándar</b>	<b>0.147</b>	<b>0.215</b>
<b>C.V</b>	<b>2.4</b>	<b>2.64</b>
<b>Cantidad total de proteína aislada</b>		<b>81.2</b>

Se obtuvieron en total 81.2 gramos de proteína aislada de lactosuero dulce, mismas que se emplearon para la caracterización y la elaboración de la bebida carbonatada. El valor promedio obtenido del pH entra en el intervalo reportado en la bibliografía para el lactosuero dulce (pH 6,0-6,5) (Hernández y Vélez, 2014), de igual manera el valor promedio de gramos de proteína por litro de lactosuero (6.0-10.0 g/L) (Callejas, 2012), con dichos resultados, se deduce que en efecto, el lactosuero con el que se trabajó fue dulce, producto de la elaboración de queso panela, donde en su proceso

se emplea renina para la coagulación de las caseínas y no ácidos orgánicos, los cuales provocan la disminución del pH del lactosuero.

### 3.4. Caracterización

En las proteínas aisladas de lactosuero, hay un alto porcentaje de contenido proteico, pero también existen otros componentes como grasas, carbohidratos, y agua. Para que se le denomine aislado de proteína de lactosuero (WPI), el porcentaje proteico debe ser del 90-92%, y deben estar presentes las proteínas y los aminoácidos reportados en la bibliografía, es por eso que se realizó la caracterización de las proteínas experimentalmente aisladas por el método Micro-Kjeldahl, electroforesis en gel de poliacrilamida y cromatografía en papel respectivamente.

A continuación se muestran los resultados de la caracterización de las proteínas experimentalmente aisladas de lactosuero.

#### 3.4.1. Porcentaje proteico de las proteínas aisladas de lactosuero por el método Micro-Kjeldahl.

En la tabla 15 se reportan los resultados del porcentaje de nitrógeno total y del porcentaje proteico de las muestras de proteína aislada de lactosuero.

**Tabla 15. Porcentaje del nitrógeno total y de proteína de las muestras de proteína aislada de lactosuero.**

<b>Muestras</b>	<b>% Nitrógeno total Valor experimental</b>	<b>% Proteína Valor experimental</b>	<b>% Proteína Valor Bibliográfico</b>
<b>1</b>	14.49	90.6	<b>90-92</b>
<b>2</b>	14.42	91.1	
<b>3</b>	14.53	90.8	
<b>Promedio</b>	<b>14.48</b>	<b>90.83</b>	
<b>D. Estándar</b>	<b>0.055</b>	<b>0.251</b>	
<b>C.V</b>	<b>0.384</b>	<b>0.276</b>	

Se observa que el valor promedio del porcentaje proteico de las proteínas de lactosuero que se aislaron experimentalmente (90.83%) entran en el intervalo del valor bibliográfico reportado por Acero (2006) para los aislados de proteína de lactosuero o WPI por sus siglas en inglés (90-92%). Este resultado demuestra que en efecto, a las proteínas de lactosuero que se aislaron experimentalmente en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán se les pueden denominar como WPI por su alto porcentaje proteico del 90.83%, si el porcentaje proteico hubiese sido menor, se les considerarían simplemente como concentrados de proteína de lactosuero o WPC.

### 3.4.2. Proteínas presentes en el aislado de proteínas de lactosuero

En la figura 21 se muestran los resultados de los patrones electroforéticos revelados en el gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

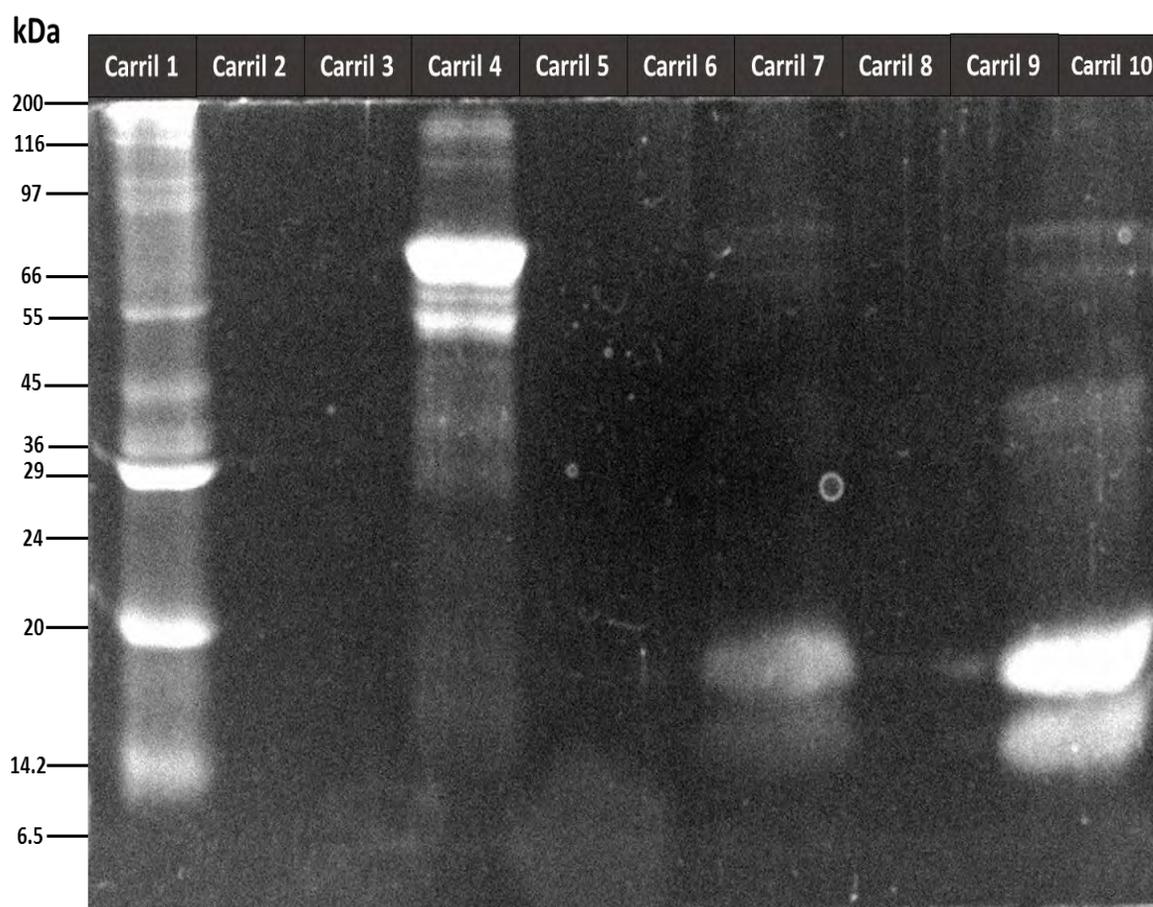
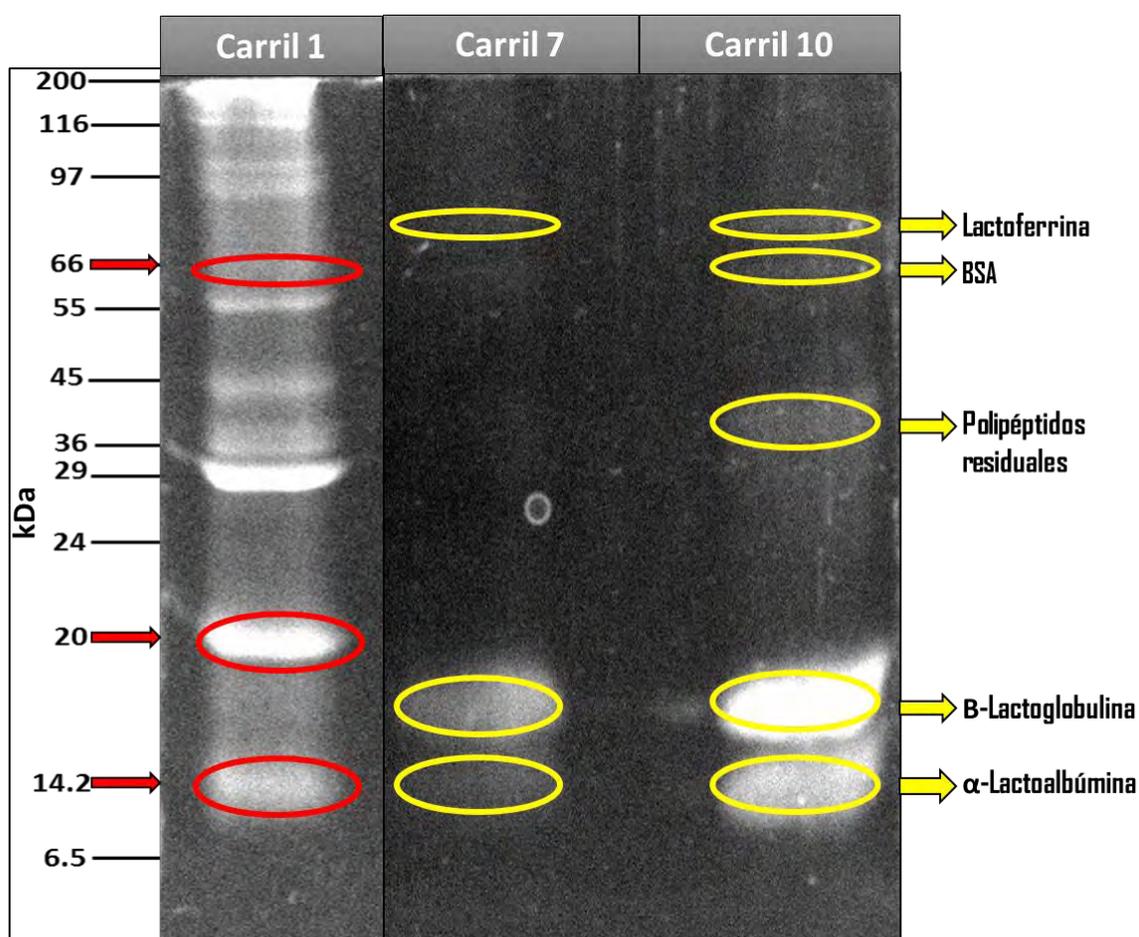


Figura 21. Patrón electroforético del gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

En el primer carril correspondiente al marcador de peso molecular se observan las bandas de las 12 proteínas, la banda correspondiente a la aprotinina bovina (6.5 kDa) no se alcanzó a definir bien debido al pequeño tamaño del gel. En el carril 4 donde se adicionó BSA (66 kDa), además de mostrarse dicha proteína se muestran más bandas, esto se presentó debido a una posible contaminación del carril 4 con fragmentos del peso molecular del carril 1. Se observa la definición de las bandas en los carriles 7 y 10 correspondientes a las proteínas de lactosuero aisladas experimentalmente y a la muestra digerida de proteínas aisladas de lactosuero marca *Immunocal Platinum*® respectivamente. En la figura 22 se observan dichos carriles aunados al carril del peso molecular (carril 1) para un análisis más certero.



**Figura 22. Comparación de los patrones electroforéticos del gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).** Marcador de peso molecular *Sigma-Aldrich*® (carril 1); Proteínas de lactosuero aisladas experimentalmente (carril 7); Aislado de proteínas de lactosuero marca *Immunocal Platinum*® (carril 10).

En la figura 22 se observa la comparación del patrón electroforético de las proteínas aisladas de lactosuero experimentalmente con respecto al patrón electroforético del *Immunocal Platinum*® y al marcador de peso molecular *Sigma-Aldrich*®, mismo que sirvió como referencia para comparar y así confirmar la presencia de las proteínas que se reportan bibliográficamente en el lactosuero. Las bandas marcadas con óvalos color rojo corresponden al peso molecular (carril 1), a su vez las bandas marcadas con óvalos amarillos corresponden a la muestra de las proteínas aisladas experimentalmente (carril 7) y a la muestra de *Immunocal Platinum*® (carril 10).

Se observa que en ambas muestras existe la presencia de  $\alpha$ -Lactoalbúmina con peso molecular de 14.2 kDa, ya que están en la misma posición de la banda referencia del marcador de peso molecular, al igual que la  $\beta$ -Lactoglobulina (18.4kDa), aunque dicha proteína no está presente en el marcador se asume su presencia, ya que esta entre la banda del inhibidor de tripsina de soja (20 kDa) y la  $\alpha$ -Lactoalbúmina (14.2 kDa). En ambas muestras se observa la presencia de Lactoferrina (80 kDa), pero solamente en el carril del *Immunocal Platinum*® se observa la presencia de BSA (66 kDa), y de una banda con un peso molecular que cae entre el gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (36 kDa) y la ovoalbúmina de huevo (45 kDa) la cual hipotéticamente podría ser una de las cadenas que conforman una inmunoglobulina u otro polipéptido residual hidrolizado de alguna otra proteína.

Hay una mayor resolución de bandas en la muestra del *Immunocal Platinum*® con respecto a la muestra de proteínas aisladas experimentalmente. Esto se presentó debido a que el tratamiento térmico en el proceso de aislamiento de las proteínas de lactosuero fue muy severo, ocasionando desnaturalización y daños a las proteínas afectando drásticamente su solubilidad, ya que al realizar la solución, gran parte de estas se precipitaban, caso contrario al *Immunocal Platinum*®, al ser un producto elaborado con la más alta tecnología y procesos avanzados, su solubilidad se ve beneficiada manteniendo la presencia de las proteínas del lactosuero. Tomando como referencia este acontecimiento, es necesario aislar las proteínas de

lactosuero de manera que no se vea afectada la solubilidad, modificando algunas de las variables de este proceso de aislamiento, dicha actividad sería una excelente propuesta para futuros proyectos, de manera que se obtenga el aislado de proteínas de lactosuero (WPI) y con la mayor solubilidad posible.

### 3.4.3. Aminoácidos presentes en el aislado de proteínas de lactosuero

Se revelaron en el papel solamente ocho aminoácidos de la muestra hidrolizada de proteínas aisladas de lactosuero, calculando a su vez su factor de movilidad correspondiente (Rf), dichos valores se presentan en la tabla 16, los cuales fueron etiquetados del 1 al 8. Posteriormente se calcularon los Rf de los aminoácidos (Cisteína, Fenilalanina, Isoleucina, Metionina, Leucina, Lisina, Treonina, Triptófano, Valina), los cuales se compararon con los Rf de los aminoácidos revelados de las proteínas aisladas de lactosuero, en la tabla 17 se muestra dicha comparación.

**Tabla 16. Valores Rf de los aminoácidos revelados de las proteínas aisladas de lactosuero en la cromatografía en papel**

Aminoácidos	Dm	Df	Rf
1	12.22	53.6	0.227
2	15.1	53.6	0.28
3	19.9	53.6	0.37
4	23.1	53.6	0.431
5	31.14	53.6	0.581
6	36.98	53.6	0.689
7	38.6	53.6	0.72
8	48.83	53.6	0.911

**Tabla 17. Comparación de valores Rf de los aminoácidos (Cisteína, Fenilalanina, Isoleucina, Metionina, Leucina, Lisina, Treonina, Triptófano, Valina) con los Rf de los aminoácidos revelados de las proteínas aisladas de lactosuero**

<b>Aminoácidos Esenciales más cisteína</b>	<b>Dm</b>	<b>Df</b>	<b>Rf</b>	<b>Rf (aminoácidos de proteínas aisladas de lactosuero)</b>
<b>Cisteína</b>	3	14.8	<b>0.202</b>	
<b>Lisina</b>	3.3	14.8	<b>0.223</b>	<b>0.227 (1)</b>
<b>Treonina</b>	6.3	14.8	<b>0.425</b>	<b>0.431 (4)</b>
<b>Isoleucina</b>	7.9	15.1	<b>0.52</b>	
<b>Metionina</b>	8.5	14.9	<b>0.579</b>	<b>0.581 (5)</b>
<b>Valina</b>	10.2	15	<b>0.68</b>	<b>0.689 (6)</b>
<b>Triptófano</b>	10.8	15.2	<b>0.71</b>	<b>0.72 (7)</b>
<b>Fenilalanina</b>	12.3	15.5	<b>0.79</b>	
<b>Leucina</b>	13.7	15.2	<b>0.901</b>	<b>0.911 (8)</b>

De acuerdo con los resultados obtenidos, y con la gran similitud que existe entre los valores Rf marcados con azul en la tabla 17, se afirma la presencia de 6 aminoácidos esenciales en las proteínas aisladas de lactosuero; Lisina, Treonina, Metionina, Valina, Triptófano y Leucina, resultando deficientes en Isoleucina, Fenilalanina y Cisteína, este último aminoácido azufrado no se considera como esencial, pero debido a su gran relevancia biológica, su presencia se considera como un parámetro de calidad, ya que es un importante precursor de glutatión (Di Pasquale, 1997, Naclerio, 2007).

Al ser un aminoácido sumamente termolábil, durante el proceso de aislamiento sufrió alguna alteración por la temperatura manejada, obstaculizando su presencia en las proteínas aisladas. El perfil de aminoácidos de las proteínas aisladas es bueno a pesar de la ausencia de los aminoácidos mencionados

Cabe destacar que la cromatografía en papel es un método cualitativo, para obtener una lectura de un perfil de aminoácidos más certero es recomendable emplear una cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), donde se obtenga la presencia y la cantidad de aminoácidos esenciales.

### **3.5. Elaboración de la bebida carbonatada con contenido proteico**

Se elaboraron exitosamente las tres formulaciones de las bebidas carbonatadas sabor chocolate, se envasaron y se almacenaron en refrigeración para su posterior análisis. En cuanto a la bebida elaborada con las proteínas de lactosuero aisladas experimentalmente, se observó que la carragenina lambda adicionada ayudó a que la fracción de sólidos de proteína no solubles se mantuvieran en suspensión, además de incorporarle mayor viscosidad, las proteínas comerciales *Isopure*® no presentaron problemas de solubilidad. La bebida carbonatada fue una aplicación que se le dió a las proteínas aisladas de lactosuero debido a la practicidad de incorporar otros ingredientes tecnofuncionales como la mencionada carragenina lambda, ayudando a mejorar la suspensión y homogeneidad del producto, buscando a su vez una bebida novedosa con un aporte adicional de proteínas de alto valor biológico ausentes en bebidas carbonatadas convencionales como la mayoría de los refrescos que se consumen en nuestro país.

### **3.6. Calidad sanitaria de la bebida**

En la figura 23, se muestran las placas (medios de cultivo 3M™ Petrifilm™) de la evaluación microbiológica de *Coliformes totales*, *Escherichia coli*, *Mesofílicos aerobios*, *Hongos* y *Levaduras* en la bebida carbonatada, posteriormente en la tabla 18 se muestran los resultados de las unidades formadoras de colonias (UFC) interpretados con la ayuda de la guía 3M™ Petrifilm™, estos resultados se contrastan con las especificaciones microbiológicas y límites máximos de la NORMA Oficial Mexicana **NOM-243-SSA1-2010**.

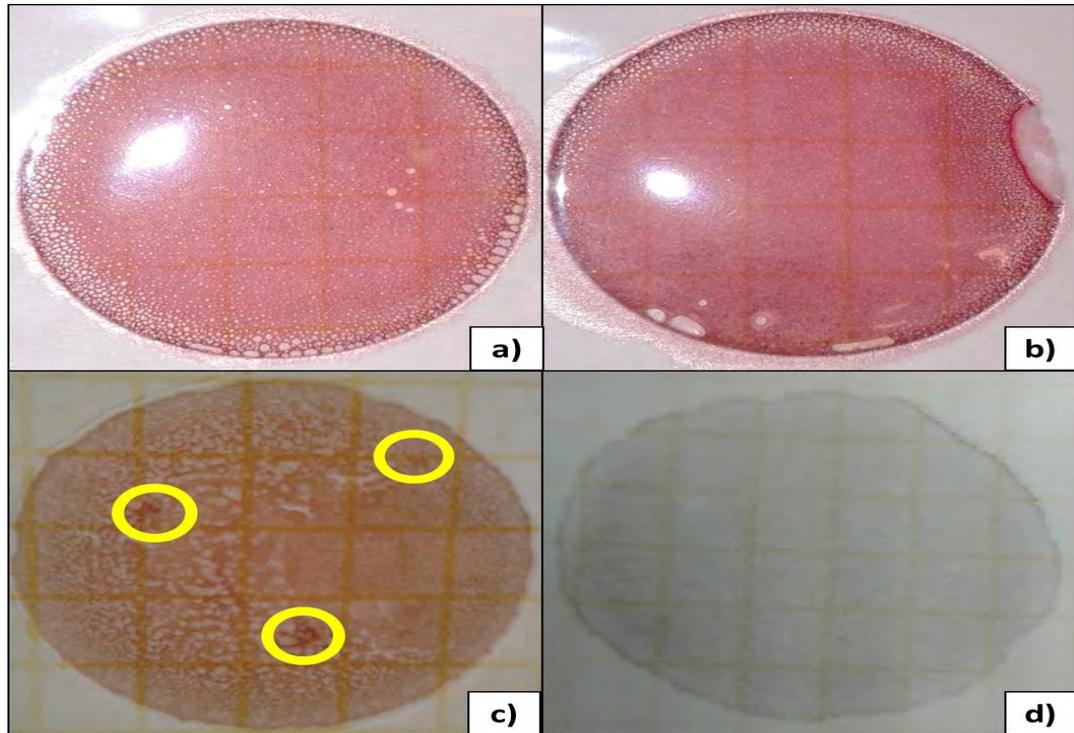


Figura 23. Medios de cultivo (3M™ Petrifilm™). *Coliformes totales* (a), *Escherichia coli* (b), *Mesofílicos aerobios* (c), *Hongos y Levaduras* (d).

Tabla 18. Comparación de los resultados de la evaluación microbiológica (3M™ Petrifilm™) de la bebida carbonatada con los límites máximos de la NOM-243-SSA1-2010.

Microorganismo	Límite máximo (NOM-243-SSA1-2010)	Calidad sanitaria bebida carbonatada
<i>Coliformes totales</i>	$\leq 10$ UFC/g o MI	Ausente
<i>Escherichia coli</i>	$\leq 3$ NMP/g o MI	Ausente
<i>Mesofílicos aerobios</i>	100,000 UFC/g o mL	3 UFC/mL
<i>Hongos y levaduras</i>	50 UFC/g o MI	Ausente

En la figura 23, se observa la presencia de 3 puntos rosas dentro de la placa correspondiente a *Mesofílicos aerobios*, cada punto rosa corresponde a una UFC, en las de más placas no se presentaron colonias de microorganismos.

En la tabla 18 se observa que los resultados de la evaluación microbiológica de la bebida carbonatada están por debajo de los límites máximos de la **NOM-243-SSA1-2010**, por ende, el producto es apto para consumo humano, ya que no representa ningún riesgo sanitario para el consumidor.

### 3.7. Composición Química de la bebida

En la tabla 19 se reportan los resultados del análisis químico proximal de la bebida carbonatada.

**Tabla 19. Composición química de la bebida carbonatada**

<b>Componente</b>	<b>%</b>
Proteína	<b>2.95</b>
Humedad	<b>77.67</b>
Cenizas	<b>0.56</b>
Grasa	<b>0.25</b>
Carbohidratos	<b>18.57</b>
TOTAL	<b>100</b>

En efecto, se observa que la bebida carbonatada obtuvo un aporte extra de proteínas, ya que la formulación sin las proteínas aisladas de lactosuero obtuvo un porcentaje proteico del 0.2%. Con un porcentaje proteico del 2.95%, 18.54% de carbohidratos y 0.25% de grasa, la bebida carbonatada se considera un producto con buen aporte nutricional, otorgándole al consumidor una importante fuente de energía además de proteínas de alto valor biológico como las proteínas aisladas de lactosuero. Puede ser un producto apto para consumidores de todas las edades, excepto para personas que presenten alergenicidad a las proteínas del lactosuero. También se puede crear un producto similar pero con menos calorías, substituyendo parcial o totalmente la sacarosa por algún edulcorante natural o artificial, y así, disminuir el porcentaje de carbohidratos sin substituir las proteínas de lactosuero.

### 3.8. Aceptación sensorial de la bebida

A continuación se presentan los resultados de la evaluación sensorial de la bebida carbonatada con contenido proteico. En la figura 24 se muestra la gráfica circular de los resultados obtenidos respecto al porcentaje de preferencia de las bebidas carbonatadas; **164** (con proteínas aisladas experimentalmente) y **364** (con proteínas aisladas comerciales).



**Figura 24. Gráfica circular del porcentaje de preferencia de las bebidas carbonatadas: 164 y 364.**

Se observa que el 55% de los jueces encuestados prefirieron la bebida carbonatada con proteínas aisladas experimentalmente, y el 45% restante optaron por la bebida con proteínas comerciales. No hubo mucha discrepancia en la preferencia, puesto que ambas bebidas presentaron un perfil sensorial bastante similar, por tal motivo, el proceso de aislamiento empleado no altero significativamente el sabor de las proteínas. A pesar de que el sabor de la bebida con proteínas aisladas experimentalmente fue aceptable, en los comentarios adicionales, gran parte de los encuestados escribieron la percepción de una textura ligeramente arenosa, posiblemente dicha textura se deba al tamaño de partícula de las proteínas.

En la tabla 20, se muestran los resultados de la evaluación sensorial para el nivel de agrado del sabor de las bebidas 164 y 364.

**Tabla 20. Nivel de agrado, sabor de las bebidas 164 y 364.**

	<b>NIVEL DE AGRADO</b>	<b>Bebida 164</b>	<b>Bebida 364</b>
<b>5</b>	<b>Me gusta mucho</b>	8	7
<b>4</b>	<b>Me gusta poco</b>	8	7
<b>3</b>	<b>Ni me gusta ni me disgusta</b>	4	6
<b>2</b>	<b>Me disgusta ligeramente</b>	0	0
<b>1</b>	<b>Me disgusta demasiado</b>	0	0

Se realizó un análisis de varianza de un factor con un  $\alpha=0.05$ . El valor F calculado fue menor que el valor F de tablas, por ende, no hubo diferencia significativa en el nivel de agrado del sabor de ambas bebidas. El resumen del análisis de varianza se muestra en apéndices.

El nivel de agrado del sabor de ambas formulaciones fue muy similar, con una tendencia del 40% para el nivel 5 (Me gusta mucho) en la bebida 164 contra un 35% para la bebida 364. Cabe destacar que no hubo desagradó para los jueces en ambas bebidas.

Solo el 10% de los encuestados afirmaron haber consumido alguna vez un producto similar, lo que confirma la escasez de las bebidas carbonatadas con contenido proteico en el mercado habitual, no obstante, el 70% de los mismos encuestados confirmo que compraría la bebida carbonatada si esta fuese comercializada, argumentando el buen sabor que posee, además de su contenido de proteínas aisladas de lactosuero.

### 3.9. Presentación comercial de la bebida carbonatada con contenido proteico

Al obtener un perfil sensorial aceptado, se realizó una propuesta para la posible comercialización de la bebida carbonatada, en la cual se presenta la información nutrimental elaborada con la ayuda de su composición química, y la declaración de ingredientes. La bebida tendría el nombre de “**Carbo-Prot**” y su presentación sería en envases de vidrio de 250 ml. En la figura 25 se presenta la etiqueta de la bebida.



Figura 25. Propuesta de etiqueta de la bebida carbonatada con proteínas aisladas de lactosuero sabor chocolate “Carbo-Prot”

## **Conclusiones**

El lactosuero dulce de la planta procesadora de quesos “El Eden” fue obtenido en buenas condiciones, además por su porcentaje proteico, fue apto para el aislamiento de las proteínas, mismas que se aislaron exitosamente mediante el proceso de aislamiento empleado. Las operaciones unitarias de centrifugación y filtración al vacío en el proceso de aislamiento, fueron factores de importancia al eliminar gran porcentaje de la grasa, lactosa y agua contenidas en el lactosuero, de esta manera se obtuvieron proteínas con un elevado porcentaje proteico (90.83%) obteniendo la denominación de WPI.

En cuanto a la caracterización del WPI, se confirmó la presencia de las principales proteínas que conforman el lactosuero ( $\beta$ -Lactoglobulina,  $\alpha$ -Lactoalbúmina y Lactoferrina) y de algunos aminoácidos esenciales (Lisina, Treonina, Metionina, Valina, Triptófano y Leucina), sin embargo, al pretender solubilizarlas en agua se formaban pequeños grumos, por ende, se concluye que el proceso de aislamiento no deterioro significativamente el valor nutricional de las proteínas de lactosuero, pero si afecto su solubilidad a causa de una posible desnaturalización provocada por el tratamiento térmico que sufrieron durante el proceso de aislamiento, por tal motivo, es necesario aislar las proteínas manteniendo su valor nutricional y a su vez que adquieran una mejor solubilidad, asignándoles una aplicación donde se aproveche dicha propiedad tecnofuncional, esto puede ser logrado mejorando el proceso de aislamiento modificando algunas variables independientes que permitan dichas características, por ejemplo, la temperatura de calentamiento y el tiempo de calentamiento. De igual manera es fundamental poner énfasis en algunos aminoácidos que no estuvieron presentes en las proteínas aisladas de lactosuero, por ejemplo la Cisteína, que es un aminoácido termolábil y muy importante en la nutrición humana, ayudando a sintetizar antioxidantes como el glutatión.

En cuanto a la bebida carbonatada con contenido proteico, al ser un producto novedoso e inusual, sorpresivamente logro obtener buena aceptación sensorial. La formulación con proteínas de lactosuero aisladas experimentalmente obtuvo una

aceptación y un perfil similar a la formulación con proteínas aisladas de lactosuero marca *Isopure*®, con lo cual, el proceso de aislamiento no afectó el sabor de las proteínas de lactosuero, pero sí su textura, otorgándoles una ligera sensación arenosa al momento de evaluar el producto, dicho problema se podría solucionar mejorando el proceso de aislamiento, la carragenina lambda ayudó bastante a la consistencia cremosa de la bebida, además de favorecer la suspensión de las proteínas.

Por su calidad sanitaria, su aceptación sensorial y su aporte nutricional, la bebida carbonatada podría ser comercializada, ya que presenta mejor valor nutricional que cualquier refresco convencional, sin embargo, para poder analizar dicha posibilidad, es indispensable realizarle análisis más específicos como: estabilidad, análisis fisicoquímicos, caracterización reológica, pruebas de anaquel, y análisis de costos. Dichas actividades podrían ser propuestas para futuros proyectos.

## **Recomendaciones**

Para mejorar la solubilidad de las proteínas del lactosuero, es de suma importancia realizar modificaciones en las variables del proceso, una de esas variables sin duda es la temperatura de aislamiento. La recomendación sería emplear un sistema de evaporación al vacío en el calentamiento del lactosuero, con esto, se produce su ebullición y el subsecuente aislamiento de sus proteínas a una temperatura más baja que en condiciones normales de presión atmosférica, de esta manera, se obtendrá una mejor solubilidad, además hay más probabilidades de asegurar la presencia de los aminoácidos termolábiles como la cisteína.

Una recomendación importante sería elaborar curvas de solubilidad para analizar en qué condiciones o variables del proceso se logró una mayor solubilidad de las proteínas.

Para la caracterización del perfil de aminoácidos, se recomienda realizar una cromatografía HPLC, con la finalidad de obtener un perfil cualitativo y a la vez cuantitativo de los aminoácidos, y así, poder establecer un análisis más contundente.

En la bebida carbonatada, lo ideal es disminuir el contenido de azúcar agregando algún edulcorante natural como la estevia, teniendo un producto bajo en carbohidratos y alto en proteínas, que pueda ser consumido por personas con problemas de diabetes.

## **Bibliografía**

- Acero, J. L., Benítez F.J., Leal A.I. y Real F.J. (2006). *Removal of phenolic compounds in wáter by ultrafiltration membrane treatments*. Journal of Environmental Science, 40(8) ,1585-1603.
- Aider, M., D. Halleux and I. Melnikova. (2009). *Skim acidic milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: Impact of processing conditions*. Innovative Food Science and Emerging Technologies 10(3): 334-341.
- Alexandrescu, A.T., Evans, P.A., Pitkeathly, M., Baum, J. y Dobson, C.M. (1993). *Structure and dynamics of the acid-denatured molten globule state of  $\alpha$ -lactalbumin: A twodimensional NMR study*. Biochemistry (Easton) 32, 1707-1718.
- Altecса, (2012, Sep 06). *Coagulantes en la industria láctea*. Recuperado el 10 de Octubre de 2016, de <http://es.slideshare.net/FUSADESORG/4-coagulantes-en-la-industrialactea>.
- AOAC. (1990). *Methods of Analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemist. Washington, D.C.
- Azcona, Á.C. (2013). *Manual de Nutrición y Dietética*. Madrid: Universidad Complutence de Madrid.
- Badui, Dergal,S. (2013). *Química de los Alimentos (5ª. Ed.)*. México: Pearson Education.
- Baro, L., J. Jiménez, A. Martínez y J. Bouza. (2001). *Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales*. J. Ars. Pharmaceutica. 42(3-4): 135-145.
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). *Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones*. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 42(2), 227–237. <http://doi.org/1851-6114>.
- Bounous, G. (2000). *Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cáncer treatment*. Anticancer Research, 20(6C), 4785-4792.

- Bravo, I. (2012). *Estudio de la fracción proteica de leche y formulas infantiles sometidas a altas presiones*. Madrid, España: Universidad Autónoma de Madrid.
- Callejas. J., Prieto,F., Reyes, V.E., Marmolejo, Y. y Méndez, M.A.(2012). *Caracterización fisicoquímica de un lactosuero*.
- Carrillo, AJL., (2002). *Tratamiento y reutilización del suero de leche*. Revista *Conversus* 10, IPN, México; 27-30.
- Cayot, P. y Lorient, D. (1997). Structure-function relationships of whey proteins. En: *Food Proteins and their Applications*. Damodaran, S. y Paraf, A. (Eds.). Marcel Dekker, Inc., pp. 225-256.
- Chaplin, M. (2016, Oct 19). *The Hofmeister series is the ordering of ions in terms of their ability to affect the solubility of proteins*. Recuperado el 13 de 03 de 2017, de [www1.lsbu.ac.uk/water/hofmeister\\_series.html](http://www1.lsbu.ac.uk/water/hofmeister_series.html)
- Chávez Vela., N.A, Salinas Miralles., E.M. Jáuregui Rincón. J., Palomares Aguilera.I.A. (2010). Fernando Bon Rosas F. *Detección de glicomacropéptido (gmp) en leche y productos lácteos mediante western blot*.
- Chung, S., P. Moughan, A. Awati and H. Morton. (2009). *The influence of whey protein and glycomacropéptido on satiety in adult humans*. *Physiology & Behavior* 96(1): 162–168.
- Colgan, M. (1998). *The right protein for muscle and strength*. Progressive health series. Colgan Institute, pg 20. Biological value proteins.
- Contreras, E. (2003). *Digestión de proteínas*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.

- Di Pasquale, M.G. (1997). *Amino acids and proteins for the athlete: The anabolic edge*. In Energy-Yielding Macronutrients and Energy Metabolism in: Sports Nutrition. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Etzel, M.R. (2004). *Manufacture and use of dairy protein fractions*. The Journal of Nutrition, 134(4), 996-1002.
- FAO/OMS. 1998. Carbohydrates in human nutrition. Report of a Joint FAO/OMS Expert Consultation, Estudio FAO Alimentación y Nutrición 66. Roma, 14-18 Abril 1997 (<http://www.fao.org/drocep/W8079E/W8079E00.ht>)
- Figueroa Hernández, Claudia; Jiménez Guzmán, Judith; Rodríguez Serrano, Gabriela; Gómez Ruiz, Lorena; García Garibay, Mariano. (2013). *La leche como alimento funcional*. Revista Contacto, No. 87, 17–24.
- Foegeding, E. and P. Luck. (2002). *Whey protein products. 1957-1960*. In: Caballero, B., L. Trugo, P. Finglas (eds.). Encyclopedia of Foods Sciences and Nutrition. Academic Press, New York.
- Galindo L, Valbuena E, Rojas E. (2006). *Estandarización de la detección del glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche*. Revista Científica FCV-LUZ 16(3):308-314.
- García, H. M. G. (2000). *Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia*. Univ Diag, 1(2), 31–41.
- Garrett R. H., y C. M Grisham. (2004). *Biochemistry Brooks Cole Publisher*. Charlottesville, VA, USA. p 1216.
- Google Maps. Mapa satelital de la localización de “Lacto productos El Eden”<https://www.google.com.mx/maps/place/Lacto+Productos+El+Eden./@19.7144555,99.1845971,15.72z/data=!4m5!3m4!1s0x0:0x40a7e565821f38de!8m2!3d19.714235!4d-99.18722>. Fecha de consulta: 20 de 06 de 2016.

- González, T., L. Téllez, V., A. Sampredro, J y Nájera, H. (2007). *Las proteínas en la nutrición*. Área académica de nutrición. Instituto de ciencias de la salud, Universidad Autónoma de Hidalgo, México.
- Hambling, S.G., Mc Alpine, A.S. y Sawyer, L. (1992).  $\beta$ -Lactoglobulin: *Advanced Dairy Chemistry, volume 1: Proteins*. Fox, P.F. (Eds.), Elsevier Inc. London, pp. 141-190.
- Hayase, F., Kato, H. y Fujimaki, M. (1973). *Racemization of amino acid residues in proteins during roasting*. Agric. Biol. Chem. 37:191-192.
- Hernández, M. Sastre, A. (1999). *Tratado de nutrición*. Madrid. Ed. Díaz de Santos.
- Hernández, R. and Vélez, J, F, (2014). *Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(2), 13–22.
- Hill, a. R., Irvine, D. M., & Bullock, D. H. (1982). *Precipitation and Recovery of Whey Proteins: A Review*. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 15(3), 155–160.
- Huerta, R. (2005). *Determinación del punto de hebra y modificación de la textura después del fundido de quesos Oaxaca*. Tesis Maestría. Universidad de las Américas. México. 106 p.
- Jelen,P. (2003). *Whey processing*. Utilization and products. Encyclopedia of Dairy Sciences, 4, 2.739-2745.
- Jiménez B, Martínez A, J Bouza. (2001). *Bioactive milk peptidos and proteins*. Asr Pharmaceutical. 42: 135-145.
- Jovanovic, S., Barac, M. y Macej. O. (2005). *Whey proteins-Properties and Possibility of Application*. Mljekarstvo, 55(3). 215-233.
- Kraulis, P.J. (1991) MOLSCRIPT: *A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures*. Journal of Applied Crystallography,. 24:946-950.
- Laemmli, U.K., 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, London. 227: 680-685.

- Lebenthal E, Lee PC, Heitinger LA (1983). *Impact of development of the gastrointestinal tract on infant feeding*. J Pediatr; 102: 1-9.
- León, M. (2006). *Proteínas en nutrición artificial. Nutrición enteral*. Madrid, España: Sociedad Española de Nutrición Parental y Enteral.
- Linden, G. and D. Lorient. (1996). *Bioquímica Agroindustrial: revalorización alimentaria de la producción agrícola*. Editorial Acribia, Zaragoza. España. 454 p.
- Londoño, M. (2006). *Aprovechamiento del suero ácido de queso doble crema para la elaboración de quesillo utilizando tres métodos de complementación de acidez con tres ácidos orgánicos. Perspectivas en nutrición humana*. Revista Perspectivas en Nutrición Humana-Escuela de Nutrición y Dietética-Universidad de Antioquia 16: 11-20.
- Londoño, M., J. Sepúlveda, A. Hernández y J. Parra. (2008). *Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con lactobacillus casei*. Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín 61(1): 4409-4421.
- Maldonado, E. (2012). *Estudio de prefactibilidad para la implementación de un laboratorio de análisis fisicoquímico en la planta de producción de una fábrica de bebidas carbonatadas en la ciudad de Guatemala*. Mazatenango, Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Marshall, K. (2004). *Therapeutic applications of whey protein*. Alternative Medicine Review. 9(2). 136-156.
- Mera, C., Cedeño, T. (2012). *Producción más limpia en una embotelladora de bebidas gaseosas*. Guayaquil, Ecuador: Universidad de Guayaquil.
- Muñoz. A., Vega, J., Vera, J. (2014). *Determinación de análisis proximal de productos alimenticios*. Perú: Universidad Nacional del Santa.
- Muro, C., Díaz, C., García., Zavala, R.E., Ortega, R.E., Álvarez, R. y Riera, F. (2010). *Recuperación de los componentes del lactosuero residual de una industria elaborada de queso utilizando membranas*. Afinidad: Revista de Química teórica y aplicada, 67(547), 212-220.
- Naclerio, F.J. (2007). *Utilización de las Proteínas y Aminoácidos como suplementos o Integradores Dietéticos*. PubliCE Standard. Pid: 766.

- Nicorescu, I., C. Loisel, A. Riaublanc, C. Vial, G. Djelveh, G. Cuvelier, J. Legrand. (2009). *Effect of dynamic heat treatment on the physical properties of whey protein foams*. Food Hydrocolloids 23(4): 1209–1219.
- Nollet. (1996). Leo M.L.; *Handbook of food analysis*; M. Dekker, New York.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012, Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba
- NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones y sanitarias. Metodos de prueba.
- Onwulata, C. (2008). *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*, Wiley-Blackwell, New York.
- Panesar, P., J. Kennedy, D. Gandhi and K. Bunko. (2007). *Bioutilisation of whey for lactic acid production*. Food Chemistry 105: 1-14.
- Parra Huertas, R. A. (2009). Lactosuero: *Importancia en la industria de alimentos*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 62(1), 4967–4982. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.011>.
- Pescumma, M., E. Hérbet, F. Mozzi and G. Font. (2008). *Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content*. Food Microbiology 25(3): 442–451.
- Peso Echarri, P. I, Vasallo Morillas M. M, Santaella Pascual. G, Ros Berruezo. C. Frontela, Saseta. (2012). *α-Lactoalbúmina como ingrediente de fórmulas infantiles*. Murcia. España 62. Universidad de Murcia 30100.
- Poveda. E. (2013). *Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad*. *Revista Chilena de Nutrición*. 40 (4). 397-403.
- PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012. SISTEMA PRODUCTO LECHE ALIMENTOS LÁCTEOS SUERO DE LECHE (LÍQUIDO O EN POLVO) ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA.

- Rodríguez, F. Vázquez, M. Clamont, G. (2005). *Actividad antimicrobiana de la Lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales*. México. Asociación Mexicana de microbiología. Revista Latinoamericana de microbiología. Pp.102-111.
- Rosado, J. L., C, M., Rivera, J., López, G., JI, R., Rivera, J., Solano, L. (1999). *Desarrollo y evaluación de suplementos alimenticios para el Programa de Educación, Salud y Alimentación*. *Salud Pública de México*, 41(15), 153–162. Retrieved from.
- Saniani (2009). *Curso de Inmunología 7*. Departamento de sanidad animal. Recuperado el 20 de 10 de 2016, de <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/saniani/troncales/inmunologia/documentostemas/Tema%207.pdf>
- Schlimme, E. y Buchheim, W. (2002). *Proteínas lácteas: caseínas, proteínas del suero y proteínas minoritarias*. En: *La leche y sus componentes. Propiedades químicas y físicas*. Acribia. Zaragoza, Spain, pp. 33-75.
- Spellman, D., G. O’Cuinn and R. FitzGerald. (2009). *Bitterness in Bacillus proteinase hydrolysates of whey proteins*. *Food Chemistry* 114(2): 440–446.
- Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL (2003). *Estructura y función de las proteínas*. En: “Bioquímica”, 5ª ed. Editorial Reverté (Barcelona, España), pp. 41-76. Muestra las características de los aminoácidos: estructura, variación de su carga con el pH, etc.
- Tomczak TL, Noemberg LE, L Bileski C. (2007). Review: *Isolation and purification of milk whey glycomacropeptide*. *B.CEPPA.Curitiba*.25 (1):121-132.
- Tm, T. M. (n.d.). 3M Petrifilm Guía de Interpretación TM.
- UNU. (1988). *Guías de alimentación. Bases para su desarrollo en América Latina*. Reunión UNU. Fundación CAVENDES. Caracas 1988.

- Valencia, D., Ramírez, M., Denicia, V., Castillo, R., Leticia, M., Valencia, E., & Ramírez, M. L. (2009). *La industria de la leche contaminación del agua*. Elementos: Ciencia Y Cultura, 16, 27–31. México.
- Voet, D., Voet, J. (2006). *Bioquímica*. Buenos Aires, Argentina: Ed. Medica Panamericana S.A, 3ra edición.
- Walzem, R.L., Dillard,C.J. y German, J. B. (2002). *Whey components millenina of evolution créate funcionalities for mammalian nutrion what we know and what we may be overlooking*. Citrical Reviews in Food Science and Nutrition, 42(4), 353-375.
- Zadow, J. (2003). *Protein concentrates and fractions*. 6152-6156. In: Francis, F. (ed.). *Encyclopedia of Food Science and Technology*. Wiley, New York.

## Apéndices

### 1. Aislamiento de proteínas de lactosuero

#### 1.1. Calibración de tubos de centrifuga

Aproximadamente 250 ml en cada tubo calibrados en una balanza granataria de dos platos.



### 2. Caracterización de las proteínas de lactosuero

#### 2.1. Preparación de soluciones y reactivos de la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

##### 2.1.1. Gel de separación (10%)

Solución de monómeros acrilamida-bis acrilamida (40%).....	2.75 ml.
Amortiguador Tris-HCl 1.5M, pH 8.8.....	2.75 ml.
SDS 10%.....	110.0 µl.
Agua destilada.....	5.33 ml.
Persulfato de amonio 10%.....	55.5 µl.
N´N´N´tetrametiletilendiamina (TEMED).....	5.5 µl.

##### 2.1.2. Gel de concentración (4%)

Solución de monómeros acrilamida-bis acrilamida (40%).....	600 µl.
Amortiguador Tris-HCl 0.5M, pH 6.8.....	1.51 ml.
SDS 10%.....	60.0 µl.
Agua destilada.....	3.815 ml.
Persulfuro de amonio 10%.....	30.0 µl.
N´N´N´tetrametiletilendiamina (TEMED).....	6.0 µl.

#### 2.2. Soluciones amortiguadoras Tris-HCl para los geles de poliacrilamida

### **2.2.1. Amortiguador del gel de separación Tris-HCl 1.5M, pH 8.8**

Trizma base.....18.15 g.  
Agua destilada.....90 ml.

(Se ajustó el pH con HCl a 6N, posteriormente se aforo a 100 ml y se almacena a 3-4 °C).

### **2.2.2. Amortiguador del gel de concentración Tris-HCl 0.5M, pH 6.8.**

Trizma base.....3 g.  
Aguas destilada.....30 g.

(Se ajustó el pH con HCl a 6N, posteriormente se aforo a 100 ml y se almaceno a 3-4°C).

### **2.3. Lauril sulfato de sodio (SDS) al 10%**

SDS.....10 g.  
Agua destilada.....90 ml.

### **2.4. Persulfato de amonio al 10%**

Persulfato de amonio.....0.1 g.  
Agua destilada.....0.9 ml.

(Es recomendable prepararlo antes de utilizarse)

### **2.5. Buffer amortiguador de corrida pH 8.3**

Trizma base.....3.0 g.  
Glicina.....14.4 g.  
SDS al 10%.....10 ml.  
Agua destilada hasta.....1 l.

(El buffer de la cámara interna puede ser reutilizado hasta 4 veces, el de la cámara superior se descarta en cada corrida)

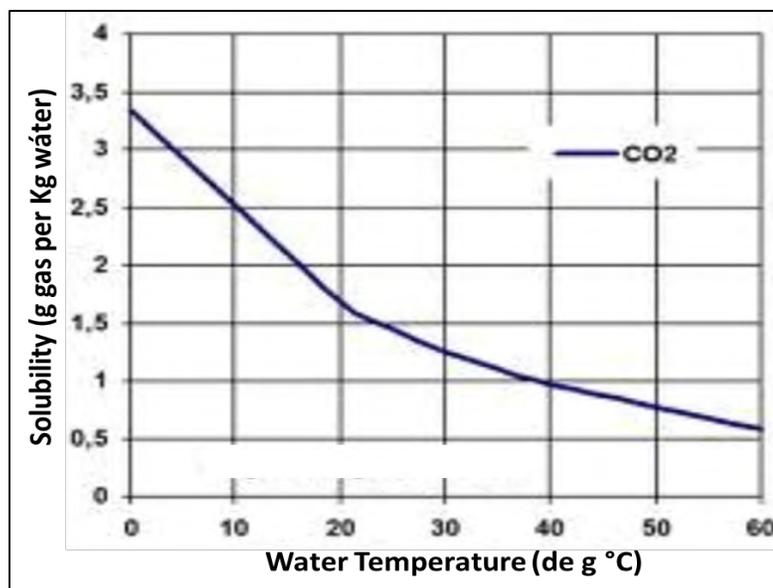
### **2.6. Solución digestora**

Tris 0.5M, pH 6.8.....8.75 ml.  
SDS.....0.2 g.  
Glicerol.....1 g.  
2-Mercaptoetanol.....0.5 ml.  
Azul de bromofenol.....0.1g.

(Emplear cámara de extracción al momento de añadir el 2-Mercaptoetanol)

- 2.7. Solución teñidora madre**  
Azul de Comasie R-250.....2 g.  
Agua destilada.....200 ml.
- 2.8. Solución teñidora para tinción de bandas de proteínas (Comasie R-250 al 0.125%)**  
Solución teñidora madre.....62.5 ml.  
Metanol absoluto.....250 ml.  
Ácido acético glacial.....50 ml.  
Agua destilada.....137.5 ml.
- 2.9. Solución desteñidora del gel I**  
Metanol absoluto.....500 ml.  
Ácido acético glacial.....100ml.  
Agua destilada.....400 ml.
- 2.10. Solución desteñidora del gel II**  
Metanol absoluto.....25 ml.  
Ácido acético glacial.....35 ml.  
Agua destilada.....440 ml.
- 2.11. Preparación de soluciones y reactivos de la cromatografía en papel.**
- 2.11.1. Solución hidrolizante**  
HCl al 6N.....5 ml.  
2-Mercaptoetanol.....25 µl.
- 2.11.2. Mezcla de corrimiento: N butanol-Ácido acético-Agua.**  
N-Butanol.....120 ml.  
Ácido acético glacial.....30 ml.  
Agua.....50 ml.
- 2.11.3. Solución reveladora de aminoácidos.**  
Ninhidrina.....0.5 g.  
Acetona.....99.5 g.

**3. Solubilidad del CO<sub>2</sub> en agua a diferentes temperaturas.**



Fuente: engineeringtoolbox.com

4. Tabla de resultados de la composición química de la bebida carbonatada con contenido proteico (promedios, desviación estándar, coeficiente de variación).

Componentes				
Muestras	Proteína (%)	Humedad (%)	Cenizas (%)	Grasa (%)
1	2.98	77.68	0.57	0.27
2	3.11	77.67	0.56	0.25
3	2.77	77.66	0.55	0.24
Promedio	<b>2.95</b>	<b>77.67</b>	<b>0.56</b>	<b>0.25</b>
D. Estándar	<b>0.17</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	<b>0.015</b>
C.V	<b>5.81</b>	<b>0.012</b>	<b>1.78</b>	<b>4</b>

$$\%Carbohidratos = 100 - (2.95 + 77.67 + 0.56 + 0.25) = 18.57\%$$

(Los resultados condensados se encuentran en el capítulo 3, sección 3.7)

**5. Encuestas realizadas en la evaluación sensorial de la bebida carbonatada con contenido proteico.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Evaluación sensorial

Encuesta de preferencia pareada



EDAD: \_\_\_\_\_ SEXO: H M FECHA: \_\_\_\_\_

Indica con una "X" la respuesta para cada muestra presentada:

Calificación		164	364
		Sabor	Sabor
5	Me gusta mucho		
4	Me gusta poco		
3	Ni me gusta ni me disgusta		
2	Me disgusta un ligeramente		
1	Me disgusta demasiado		

¿Cuál de las dos muestras te gusta más?

Marca con una "X" la muestra elegida

164

364

¿Por qué la elegiste? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Comentarios \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

INGENIERÍA EN ALIMENTOS



EDAD: \_\_\_\_\_ SEXO: H M FECHA: \_\_\_\_\_

1. ¿Conoce el lactosuero?  
a) Si      b) No
2. ¿Sabía que el lactosuero es un subproducto de la industria quesera que contiene proteínas del más alto valor biológico y que a su vez poseen importantes beneficios a la salud humana como aumento de la respuesta inmune, actividad antimicrobiana y aumento de la masa muscular entre otros?  
a) Si      b) No
3. a) Si      b) No
4. ¿Consume bebidas carbonatadas?  
a) Si      b) No
5. ¿Si su respuesta fue afirmativa, con qué frecuencia las consume?  
a) Una vez a la semana  
b) Dos o tres veces a la semana  
c) Diario  
d) Otro: \_\_\_\_\_
6. Considera que las bebidas carbonatas que consume son nutritivas?  
a) Si      b) No
7. ¿Alguna vez ha consumido una bebida carbonatada elaborada con proteínas aisladas de lactosuero?  
a) Si      b) No
8. Considerando que las proteínas de lactosuero son de alto valor biológico con importantes beneficios nutricionales. ¿Cuánto pagaría por una bebida carbonatada con proteínas de lactosuero?

6. Resumen del análisis de varianza del nivel de agrado en el sabor de las bebidas carbonatadas 164 y 364.

**ANÁLISIS  
DE  
VARIANZA**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F (calculada)</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F (tablas)</i>
<i>Entre grupos</i>	0	1	0	0	1	5.3176550
<i>Dentro de los grupos</i>	118	8	14.75			72
<i>Total</i>	118	9				