Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Bebida funcional fermentada elaborada a base del permeado obtenido en la microfiltración de leche descremada, adicionada con fibra de guayaba

TESIS

que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta:
I.Q. Wendy María Meneses Corona

Dirigida por:
Dr. Eduardo Castaño Tostado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Julio 2015

REPOSITORIO INSTITUCIONAL DGBSDI-UAQ

La presente obra está bajo la licencia:
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es

CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.

NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .

SinDerivadas — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad, o derechos morales pueden limitar la forma en que utilice el material.

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Bebida funcional fermentada elaborada a base del permeado obtenido en la microfiltración de leche descremada, adicionada con fibra de guayaba

TESIS

que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta:
I.Q. Wendy María Meneses Corona

Dirigido por:
Dr. Eduardo Castaño Tostado

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Presidente — Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Asesor — Firma

Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez
Asesor — Firma

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Asesor — Firma

Dr. Lech Ozimek
Asesor — Firma

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Julio 2015

RESUMEN

Las bebidas funcionales pueden ser formuladas con diferentes ingredientes que hayan demostrado tener un efecto benéfico para la salud, entre ellos la fibra dietaria, probióticos, prebióticos, antioxidantes. Estudios previos han confirmado que los subproductos obtenidos de la industria de jugos son una fuente importante de fibra antioxidante. Por otra parte, para minimizar los subproductos de la industria láctea, se puede emplear la separación por membrana como un proceso alternativo en la elaboración de quesos a partir del retenido y generar como subproducto un permeado con características similares al suero, pero con propiedades adecuadas para la elaboración de bebidas. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una bebida funcional fermentada, usando el permeado obtenido en la microfiltración de leche descremada para elaboración de quesos y fibra de guayaba proveniente de los desechos de la industria de jugos. La metodología se dividió en cuatro etapas: a) evaluar el crecimiento de las cepas fermentativas *Lactobacillus helveticus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* usando permeado de leche descremada como substrato, b) establecer las proporciones adecuadas de cada microorganismo para generar los atributos fisicoquímicos deseados, c) formular la bebida evaluando dos edulcorantes distintos, y d) estimar la vida de anaquel sensorial de la misma. Como resultados se encontró que *L. helveticus* alcanza un bajo crecimiento máximo (1.19 g/L) pero es capaz de acidificar el medio a valores adecuados para desarrollar una bebida fermentada; el crecimiento máximo de *S. cerevisiae* también fue bajo (0.80 g/L) debido a la incapacidad de esta levadura para usar lactosa; *K. marxianus* fue el microorganismo que alcanzó el mayor crecimiento máximo (4.05 g/L) además de producir etanol (3.81 g/L) y CO_2 (1.66 g/L) como productos de la fermentación. Para determinar la proporción adecuada de cada microorganismo se usó un diseño de mezclas y se observó que la acidez aumentó cuando se incrementó la proporción de *L. helveticus* y *K. marxianus*; obteniendo valores de pH de 3.27 y acidez de 7.09 g/L. Las concentraciones de etanol y CO_2 aumentaron al incrementar la proporción de *K. marxianus*, obteniendo una concentración máxima de 2.21 y 1.44 g/L respectivamente. El mayor grado de hidrólisis (10.45%) se obtuvo cuando se incrementó la proporción de *L. helveticus* y *S. cerevisiae*. La mezcla usada para la formulación de la bebida fue *L. helveticus* y *S. cerevisiae* en una proporción 0.67:0.33, ya que mostró tener los atributos fisicoquímicos adecuados para generar características sensoriales agradables. Para la formulación final, se utilizó Splenda® como edulcorante debido a que se observó un incremento en la concentración de etanol y CO_2, así como en el crecimiento de *S. cerevisiae*. El análisis de vida de anaquel sensorial mostró que la bebida tiene una vida de anaquel de 14–17 días a 4°C, considerando como aceptable una probabilidad de rechazo por parte de los consumidores del 0.25; además, se encontró que posiblemente el aumento en el grado de hidrólisis y de etanol puede modificar negativamente el sabor de la bebida, causando su rechazo. Por último, la concentración de *L. helveticus* durante la vida de anaquel fue mayor de 7 log UFC/mL, la cual es adecuada para tener un efecto probiótico.

PALABRAS CLAVE: Fermentación, Permeado de Leche Descremada, Fibra Antioxidante, Bebida Funcional, Vida de Anaquel Sensorial

SUMMARY

Functional beverages can be formulated with different ingredients that have shown beneficial effects for the consumers, such as dietary fiber, probiotics, prebiotics, and antioxidants, among others. Previous studies have found that sub-products obtained from the wastes of juice industry are important sources of antioxidant fiber. Besides, an alternative to cheese processing using membrane separation allows the recovery of a permeate similar to whey, which has adequate properties for the development of functional beverages. The aim of this research was to develop a functional fermented beverage using the permeate obtained from skim milk microfiltration for cheese making, and antioxidant fiber from guava juice manufacturing wastes. The methodology was divided in four parts: a) evaluate the growth of *Lactobacillus helveticus*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* using skim milk permeate as culture medium, b) establish the suitable proportions of each microorganism to generate adequate physicochemical attributes, c) formulate the beverage by evaluating two different sweeteners, and d) estimate a sensory shelf life of the beverage. As results it was found that *L. helveticus* reached a low value of maximum growth (1.19 g/L) but it was capable to acidify the medium adequate values to develop a fermented beverage; maximum growth of *S. cerevisiae* was the lowest (0.80 g/L) due to its incapability to use lactose as carbon source; *K. marxianus* was the microorganism that reached the highest value of maximum growth (4.05 g/L) and produced ethanol (3.81 g/L) and CO_2 (1.66 g/L) as fermentation products. A mixture design was used to establish the suitable proportions of fermentative microorganisms. It was observed that titratable acidity increased as *L. helveticus* and *K. marxianus* proportions were increased; the lowest value of pH was 3.27 and the highest for titratable acidity was 7.09 g/L. Ethanol and CO_2 concentration increased along with the increase of *K. marxianus* proportion, obtaining a maximum concentration of 2.21 and 1.44 g/L respectively. Higher hydrolysis degree (10.45%) was obtained by increasing the proportion of *L. helveticus* and *K. marxianus*. The mixture used to formulate the beverage was *L. helveticus* and *S. cerevisiae* in a proportion of 0.67:0.33 because it had adequate physicochemical attributes to generate good sensory characteristics. Splenda® was used as sweetener for the final formulation of the beverage, because an increase in ethanol and CO_2 concentration was observed, as well as in the growth of *S. cerevisiae*. The estimation of shelf life shown that best before date corresponds to 14–17 days at 4°C, considering a 25% sensorial rejection probability as acceptable; also, it was found that ethanol concentration and degree of hydrolysis of proteins increased during shelf life, and this could modify the taste of the beverage. Finally, *L. helveticus* concentration during shelf life was above 7 log CFU/mL, which is an adequate concentration to have a probiotic effect.

KEY WORDS: Fermentation, Skim Milk Permeate, Antioxidant Fiber, Functional Beverage, Sensory Shelf Life

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER), por el apoyo económico brindado durante la realización de este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC), por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

Al Dr. Eduardo Castaño, por aceptarme como su alumna, por compartirme sus conocimientos, por creer y confiar en mi capacidad, por la asesoría brindada en este proyecto.

A mis sinodales, por las valiosas aportaciones realizadas para la mejora de este trabajo; especialmente a la Dra. Silvia Amaya, porque además me permitió realizar el trabajo experimental en su laboratorio.

A la Dra. Sofía Arvizu, por el apoyo brindado la parte microbiológica de este proyecto y por su disposición incondicional.

A mis compañeros de laboratorio, porque de una u otra manera hicieron posible la realización de este trabajo, gracias por su apoyo y por los consejos brindados para la mejora del proyecto.

A mis amigos del posgrado, gracias por sus consejos y el apoyo que me brindaron durante la realización de este proyecto, porque aprendí muchos de cada uno de ustedes.

Al personal administrativo del posgrado, especialmente a Carmelita y Laurita, por su apoyo y ayuda en todos los trámites realizados.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen 2

Summary 4

Agradecimientos 5

Tabla de Contenido 6

Índice de Figuras 8

Índice de Cuadros 11

1. Introducción 13

2. Revisión Bibliográfica 14

2.1. Bebidas funcionales 14

2.1.1. Probióticos 15

2.1.2. Prebióticos 17

2.1.2.1. Fibra dietaria 18

2.1.3. Péptidos bioactivos 19

2.1.4. Uso de suero en bebidas 22

2.1.4.1. Mercado de bebidas a base de suero 23

2.1.5. Bebidas fermentadas a base de suero 25

2.1.5.1. *Lactobacillus helveticus* 27

2.1.5.2. *Saccharomyces cerevisiae* 28

2.1.5.3. *Kluyveromyces marxianus* 30

2.2. Suero de Leche 32

2.2.1.1. Proteínas 32

2.2.1.2. Lactosa 34

2.2.1.3. Sales Minerales 34

2.2.1.4. Vitaminas 35

2.3. Separación por membrana 35

2.3.1. Aplicaciones de separación por membrana en la industria láctea 38

2.3.2. Fraccionamiento de las Proteínas de Leche por MF 39
3. Justificación 41
4. Objetivos 42
4.1. Objetivo General 42
4.2. Objetivos Específicos 42
5. Materiales y Métodos 43
5.1. Materiales 43
5.2. Métodos 44
5.3. Diseño experimental y análisis estadístico 46
5.4. Diagrama de Flujo 47
6. Resultados y Discusión 48
6.1. Evaluación del desarrollo de BAL y levaduras en PLD 48
6.2. Establecer la mezcla de proporciones idóneas de bacterias ácido lácticas y levaduras 67
6.3. Elaboración de la bebida 74
6.4. Estimación de la vida de anaquel sensorial de la bebida 78
7. Conclusiones 84
8. Bibliografía 85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Valor del mercado de bebidas no alcohólicas por país del 2000-2014, representada en millones de dólares 15
Figura 2. Principales tipos de bebidas a base de suero 22
Figura 3. Vías metabólicas principales de lactosa en bacterias ácido lácticas usadas en la fermentación de leche; PEP/PTS: sistema fosfoenolpiruvato / fosfotransferasa 26
Figura 4. Vía metabólica para la síntesis de UDP-galactosa y UDP-glucosa en la producción de exopolisacáridos por *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807, a partir de glucosa, lactosa y galactosa 28
Figura 5. Vía metabólica de Leloir, contiene las enzimas responsables de la conversión de galactosa a glucosa-6-fosfato 29
Figura 6. Vía catabólica de la lactosa y galactosa de *Kluyveromyces marxianus* . 31
Figura 7. Proceso de ósmosis y ósmosis inversa 36
Figura 8. Selectividad de los diferentes procesos de separación por membrana aplicables a leche 37
Figura 9. Curvas de crecimiento de *L. helveticus* a 37°C en PLD; inoculando 6.7, 5.7 y 4.7 log UFC/mL 48
Figura 10. Curvas de acidificación del PLD; inoculando 7.3, 6.3 y 5.3 log UFC/mL de *L. helveticus* e incubando a 37°C 50
Figura 11. Curvas de crecimiento de *L. helveticus* a 37°C en caldo MRS; inoculando 6.7, 5.7 y 4.7 log UFC/mL 51
Figura 12. Curvas de acidificación del caldo MRS; inoculando 7.3, 6.3 y 5.3 log CFU/mL de *L. helveticus* e incubando a 37°C 52
Figura 13. Curvas de acidificación de PLD versus crecimiento de *L. helveticus* ... 54
Figura 14. Electroforesis Tricine-SDS-Page, fermentación con *L. helveticus* 55
Figura 15. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* a 37°C en PLD; inoculando 6.2, 5.3 y 4.2 log UFC/mL 57
Figura 16. Curva de pH vs curva de crecimiento de *S. cerevisiae* a 37° en PLD .. 58
Figura 17. Electroforesis Tricine-SDS-Page, fermentación con *S. cerevisiae* 59

Figura 18. Curva de Crecimiento de *S. cerevisiae* a 37°C en Caldo YPD; inoculando 6.2, 5.3 y 4.2 log UFC/mL 60
Figura 19. Curva de crecimiento de *K. marxianus* a 37°C en PLD; inoculando 6.6, 5.6 y 4.6 log UFC/mL 62
Figura 20. Curva de pH vs curva de crecimiento de *K. marxianus* a 37°C en PLD 63
Figura 21. Electroforesis Tricine-SDS-Page, fermentación con *K. marxianus* 65
Figura 22. Curva de crecimiento de *K. marxianus* a 37°C en Caldo YPD; inoculando 6.6, 5.6 y 4.6 log UFC/mL 66
Figura 23. Análisis de curvas de nivel de los modelos de regresión estimados para el pH y la acidez 68
Figura 24. Análisis de curvas de nivel de los modelos de regresión estimados para el etanol y el CO_2 69
Figura 25. Concentración de (A) *K. marxianus* y (B) *S. cerevisiae* antes y después de la fermentación. 70
Figura 26. Análisis de superficie respuesta para el grado de hidrólisis de proteínas según modelo de regresión 71
Figura 27. Electroforesis SDS-PAGE, diseño experimental de mezclas 71
Figura 28. Concentración de *L. helveticus* antes y después de la fermentación de 24 h a 37°C 72
Figura 29. Análisis de variables respuesta por técnica multivariada de componentes principales 73
Figura 30. pH y acidez de la bebida usando distintos edulcorantes 74
Figura 31. Concentración de etanol y CO_2 de la bebida usando distintos edulcorantes 75
Figura 32. Concentración de *S. cerevisiae* antes y después de la fermentación . 76
Figura 33. Concentración de *L. helveticus* antes y después de la fermentación... 76
Figura 34. Resultados de aceptación/rechazo de la bebida con diferentes tiempos de almacenamiento 78
Figura 35. Modelo LEV ajustado a los datos para obtener la probabilidad de rechazo 79

Figura 36. Vida de anaquel estimada a partir de la probabilidad de rechazo 79
Figura 37. Diagrama de dispersión de las variables etanol, grado de hidrólisis y probabilidad de rechazo 82

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Listado de las propiedades deseables en los microorganismos para su incorporación en alimentos fermentados 16
Cuadro 2. Péptidos bioactivos derivados de proteínas lácteas 21
Cuadro 3. Actividad de péptidos derivados de las proteínas del suero bovino 21
Cuadro 4. Composición aproximada del suero..... 32
Cuadro 5. Sales minerales importantes en la leche y su distribución entre suero y caseína 35
Cuadro 6. Parámetros cinéticos estimados mediante el modelo logístico, para el crecimiento de *L. helveticus* a 37 °C usando PLD como medio de cultivo 49
Cuadro 7. Parámetros cinéticos estimados mediante el modelo logístico, para el crecimiento de *L. helveticus* a 37 °C usando caldo MRS como medio de cultivo 51
Cuadro 8. Grado de hidrólisis de las proteínas del PLD por efecto de la fermentación con *L. helveticus* a 37 °C 56
Cuadro 9. Parámetros cinéticos estimados mediante el modelo logístico, para el crecimiento de *S. cerevisiae* a 37 °C usando PLD como medio de cultivo57
Cuadro 10. Concentración de etanol, dióxido de carbono y grado de hidrólisis en PLD después de 24 horas de fermentación a 37 °C con *S. cerevisiae* 59
Cuadro 11. Parámetros cinéticos estimados mediante el modelo logístico, para el crecimiento de *S. cerevisiae* a 37 °C usando caldo YPD como medio de cultivo 61
Cuadro 12. Parámetros cinéticos estimados por medio del modelo logístico, para el crecimiento de *K. marxianus* a 37 °C usando PLD como medio de cultivo 63
Cuadro 13. Concentración de etanol, dióxido de carbono y grado de hidrólisis en PLD después de 24 horas de fermentación a 37 °C con *K. marxianus* 64
Cuadro 14. Parámetros cinéticos estimados por medio del modelo logístico, para el crecimiento de *K. marxianus* a 37°C usando caldo YPD como medio de cultivo 66

Cuadro 15. Proporciones de cada microorganismo en cada uno de los tratamientos a evaluar en el diseño de mezclas..... 67
Cuadro 16. Resultados obtenidos para cada variable respuesta evaluada en los tratamientos con tres microorganismos en distintas proporciones, según el diseño de mezclas 68
Cuadro 17. Formulación final de la bebida funcional fermentada..... 77
Cuadro 18. Resultados del análisis proximal y microbiológico realizado a la bebida formulada..... 77
Cuadro 19. Análisis proximal de la bebida durante 24 días de almacenamiento a 4 °C..... 80
Cuadro 20. Análisis microbiológico de la bebida durante 24 días de almacenamiento a 4 °C..... 80
Cuadro 21. Análisis de correlación entre las variables respuesta y la probabilidad de rechazo 81

1. INTRODUCCIÓN

El mercado global de los alimentos funcionales continúa siendo un segmento de la industria alimentaria muy dinámico y en crecimiento (según Euromonitor Internacional en el 2012 creció el 6% respecto al año anterior). El aumento en el interés de los consumidores en la salud y bienestar es el factor principal del éxito del mercado de los alimentos funcionales (Champagne y Møllgaard, 2008). Entre los alimentos funcionales, los alimentos lácteos funcionales cuentan con cerca del 43% del mercado, en su mayoría formado por productos lácteos fermentados (Saxelin *et al.*, 2003a)

Las bebidas lácteas funcionales pueden ser clasificadas en dos grupos: (i) bebidas fortificadas (incluyendo probióticos, prebióticos / fibras, polifenoles, péptidos, esteroles, minerales, vitaminas y omega-3), y (ii) bebidas a base de suero (bebidas de frutas y bebidas lácteas) (Özer y Kirmaci, 2010). Los subproductos generados en la industria de jugos y néctares constituyen una fuente de fibra dietaria; por lo que incluir éstos en la industria de alimentos funcionales puede ayudar a mejorar el desarrollo económico de los productores y procesadores de frutas. En los productos lácteos fermentados, que tienen una imagen positiva como productos saludables, la fibra puede interactuar con las poblaciones microbianas potenciando su crecimiento (Sendra *et al.*, 2008). Así mismo, las proteínas presentes en los lácteos fermentados también pueden usarse, ya que son precursoras de distintos péptidos con actividad biológica.

El proceso tradicional de elaboración de queso genera grandes cantidades de suero como subproducto, el cual se ha convertido en un producto de gran interés económico debido a que puede emplearse en una gran cantidad de procesos; sin embargo, la mayoría de los procesos generan suero ácido, reduciendo así su campo de aplicación. Este problema puede ser resuelto con la microfiltración de la leche previo al proceso de elaboración de queso, ya que se obtendría como subproducto un permeado muy similar al suero pero con proteínas en su forma nativa (no desnaturalizadas ni dañadas) (Heino, 2010).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Bebidas funcionales

Los productos lácteos forman la mayor parte del mercado de los alimentos funcionales, esto debido a que la leche es un alimento natural y altamente nutritivo. El concepto de alimento funcional fue usado por primera vez en 1984 por los científicos japoneses, quienes estudiaron la relación entre nutrición, satisfacción sensorial, fortificación y modulación de los sistemas fisiológicos (Siró *et al.*, 2008). El Programa Europeo de Ciencia de los Alimentos Funcionales, fundado por la Unión Europea y liderado por el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (International Life Sciences Institute, ILSI) define un alimento funcional como: "un alimento en el cual se ha demostrado satisfactoriamente el efecto benéfico que tiene en una o más funciones del cuerpo (más allá de los efectos nutritivos), de manera que su consumo pueda mejorar la salud o reducir el riego de una enfermedad" (Diplock *et al.*, 1999).

Algunas de las opciones para lograr que un alimento sea funcional son: eliminar compuestos como alérgenos, lactosa y fenilalanina presentes naturalmente en el alimento; fortificar con vitaminas y minerales; adicionar antioxidantes, probióticos o prebióticos; y aumentar la biodisponibilidad y estabilidad de un compuesto que se conozca que tiene un efecto funcional o que reduzca un riesgo potencial. Los ingredientes funcionales que son más aceptados, por estar en la mente del consumidor desde hace muchos años, son los minerales, fibras y vitaminas; sin embargo, nuevos productos adicionados con probióticos, prebióticos, flavonoides, carotenoides y ácido linolénico conjugado han tenido una muy buena aceptación por parte de los consumidores (Homayouni *et al.*, 2012).

Como se observa en la Figura 1 el mercado de bebidas funcionales ha incrementado durante la última década, el mercado a nivel mundial de bebidas no alcohólicas está valorado en un poco menos de $500 billones, de los cuales Europa posee la fracción mayor con un total de $189 billones. Sin embargo, China ha sido el país con el crecimiento más rápido con una tasa de 77% (Fortitech, 2011).

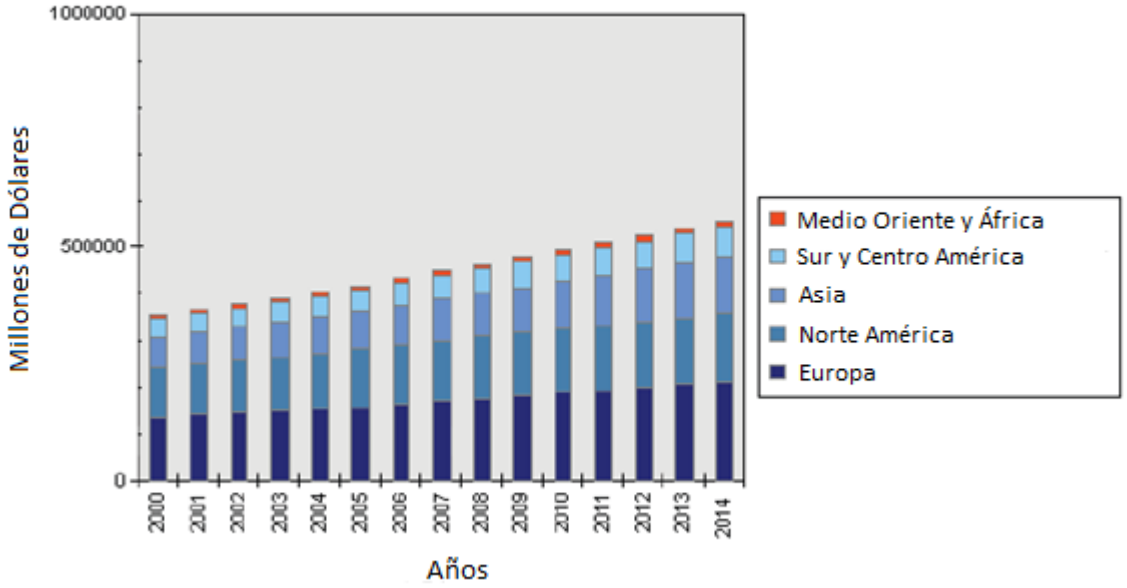


Figura 1. Valor del mercado de bebidas no alcohólicas por país del 2000-2014, representada en millones de dólares (Fortitech, 2011)

2.1.1. Probióticos

Los probióticos son definidos como microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas tienen un efecto benéfico en la salud (FAO/WHO, 2002). Para que los probióticos tengan un efecto benéfico, deben ser capaces de desarrollarse en el intestino y además de sobrevivir el paso del tracto gastrointestinal, en el cual están expuestos al ácido clorhídrico del estómago y a las sales biliares del intestino delgado; en el Cuadro 1 se muestran detalladamente las propiedades que son deseables en los microorganismos probióticos. Las bacterias *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las más usadas, debido a que habitan en el tracto gastrointestinal, son tolerantes a los ácidos y a las sales biliares, pueden adherirse a las células intestinales y tienen status GRAS (Generally Regarded as Safe) (Dunne *et al.*, 2001; FAO/WHO, 2001).

Los dos criterios más importantes para producir alimentos con probióticos son mantener la viabilidad, debido a que el producto debe de tener como mínimo 10^7 UFC/ml al momento de consumirse, y la actividad de los cultivos probióticos en los alimentos hasta el final de su vida de anaquel (Lee y Salminen, 1995). Por

ejemplo, la supervivencia de bifidobacteria después del proceso de elaboración del producto es muy baja, ya que se trata de un microorganismo anaerobio estricto con altos requerimientos nutricionales. Adicionalmente, algunos otros microorganismos probióticos usados pueden ser inactivados por la exposición a altas temperaturas o condiciones del medio durante el procesamiento del alimento. Otro reto al cual se enfrenta la industria, es el pobre crecimiento de los cultivos en el medio alimenticio, por ser bacterias adaptadas al crecimiento en el intestino, y por lo tanto, se ven obligados a agregar altas cantidad del cultivo para garantizar su eficacia (Kearney *et al.*, 2008).

Cuadro 1. Listado de las propiedades deseables en los microorganismos para su incorporación en alimentos fermentados (Kearney *et al.*, 2008)

1. Origen humano
2. Status GRAS
3. Antecedentes de uso seguro en alimentos
4. Documentación de los efectos benéficos en la salud
5. Propiedades antimutagénicas y anticarcinógenas
6. No patógenas
7. Tolerancia a sustancias antimicrobianas
8. Adherencia a la mucosa intestinal
9. Habilidad de disminuir la adhesión de patógenos
10. Activada antimicrobiana contra potenciales bacterias patógenas
11. Inmunoestimulación sin efectos proinflamatorios
12. Acidotolerante
13. Tolerante al jugo gástrico
14. Tolerante a sales biliares
15. Resistencia a los fagos
16. Tolerancia al calor y al oxígeno
17. Actividad metabólica deseable
18. Habilidad para desarrollarse en el alimento
19. Buenas propiedades sensoriales
20. Viabilidad y estabilidad durante el procesamiento, almacenamiento y consumo del alimento

Como se mencionó, lactobacilli y bifidobacteria han sido los probióticos más utilizados en los alimentos y generalmente han sido incorporados en productos lácteos fermentados como el yogurt, queso, mantequillas, helados y bebidas

lácteas; sin embargo, ha aumentado el uso de probióticos en todo tipo de bebidas y jugos (Halliwell, 2002; Hilliam, 2004). Los productos lácteos con probióticos son conocidos por aumentar la tolerancia a la lactosa, aliviar malestares intestinales, prevenir la diarrea y disminuir la duración de la diarrea causada por una gastroenteritis (Saxelin *et al.*, 2003b).

2.1.2. Prebióticos

Los prebióticos son ingredientes no digeribles que tienen un efecto benéfico en el organismo, debido a que estimulan selectivamente el crecimiento y/o la actividad de un limitado número de bacterias en el colon. Los alimentos simbióticos son aquellos alimentos que contienen una mezcla de pro y prebióticos que benefician al consumidor, mejorando la supervivencia y alojamiento de una selecta flora microbiana en el trasto gastrointestinal (de Verse y Schrezenmeir, 2001).

La importancia de los prebióticos radica en que no son digeridos en el tracto intestinal superior, debido a la incapacidad de las enzimas digestivas de hidrolizar las uniones entre los monosacáridos. Estos ingredientes actúan como fibras solubles y son digeridos en el colon, estimulando la actividad microbiana y el crecimiento de bifidobacteria y lactobacilli. Sin embargo, su consumo excesivo puede causar síntomas como flatulencia y malestar intestinal (Wollowski *et al.*, 2001).

Algunos de los prebióticos provenientes de la dieta normal son el almidón resistente, las gomas, la inulina, las hemicelulosas y los oligosacáridos (como la rabinosa y la estaquiosa). Algunos oligosacáridos que tienen efectos prebióticos comprobados son los fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, isomaltooligosacáridos, glucooligosacáridos y xilooligosacáridos; la mayoría de estos compuestos están formados por glucosa, maltosa, xilosa y fructosa (Manning *et al.*, 2004).

Como se mencionó, la mayoría de los prebióticos son carbohidratos que no digeribles o parcialmente digeribles, no se absorben en el intestino delgado, son

pobremente fermentables por las bacterias de la boca, son muy fermentables por las bacterias colónicas y a su vez son pobremente fermentables por las bacterias patógenas presentes en el intestino (Lee y Salminen, 2009).

2.1.2.1. Fibra dietaria

La Asociación Americana de Químicos de Cereales (American Association of Cereal Chemists, AACC) junto con el Comité Técnico de Carbohidratos de Norteamérica (Carbohydrate Technical Committee of North American), que pertenece a Instituto Nacional de Ciencia de la Vida (International Life Sciences Institute, ILSI), han definido la fibra dietaria como: “Partes comestibles de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado del ser humano, con una completa o parcial fermentación en el intestino grueso”. Tradicionalmente los consumidores han escogido alimentos como granos enteros, frutas y vegetales como fuente de fibra dietaria; sin embargo, recientemente las empresas han desarrollado alimentos altos en fibra en los cuales pueden incluir harinas 100% integrales o ingredientes sintéticos como la polidextrosa (Nelson, 2001).

La fibra dietaria llega al intestino grueso en donde es fermentada en mayor o menor medida por las bacterias colónicas. Los principales productos de esta fermentación son los ácidos grasos de cadena corta, produciendo también algunos gases como hidrógeno, anhídrido carbónico y metano. En esta fermentación, los polímeros de glucosa son hidrolizados a monómeros por medio de la acción de enzimas, los cuales ingresan a la vía de Embdem – Meyerhoff hasta obtener piruvato; este último es posteriormente convertido a ácidos grasos de cadena corta como acetato, propionato y butirato. Los compuestos proteolíticos producen derivados nitrogenados como aminas, amonio y compuestos fenólicos (Escudero Álvarez y González Sánchez, 2006).

Los principales beneficios de la fibra son el aumento de la velocidad del tránsito intestinal y la disminución de los lípidos y glucosa en la sangre. Además, muchos desórdenes han sido asociados al bajo consumo de fibra en la dieta, como

la constipación, diverticulitis, hemorroides, diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer del intestino y obesidad. La recomendación de ingesta diaria de fibra varían dependiendo del país, según la Fundación Británica de Nutrición es de 18–24 g/día, para la Academia de Nutrición y Dietética de Estados Unidos es de 20–30 g/día y la OMS/FAO recomienda 25 g/día (Fallourd y Viscione, 2009).

La fibra dietaria puede ser clasificada según su solubilidad en agua como fibra soluble (FDS) y fibra insoluble (FDI). La FDI no se dispersa en agua, generalmente sirve para aumentar la masa fecal y agilizar la eliminación de desechos; entre este tipo se encuentran la celulosa, hemicelulosa, lignina, cutina, suberina, quitina, quitosana y almidones resistentes. La FDS forma una dispersión en agua, es capaz formar geles viscosos, ayuda en la absorción de alimentos y genera mayor saciedad; entre estas se encuentran la pectina, β-glucanos, gomas e inulina (Nelson, 2001; Chamorro y Mamani, 2010).

Al agregar una fuente de fibra en la formulación de bebidas para aumentar su contenido de fibra dietara total se obtienen otros beneficios como mejorar la textura (aumentando su viscosidad), estabilizar las emulsiones o espumas (ayudan a disminuir el tamaño de las gotas en la emulsión y en tamaño de las burbujas de aire en la espuma), aumentar la suspensión de partículas sólidas y pueden mejorar el sabor (dependiendo del origen de la fibra) (Nelson, 2001).

Las frutas son alimentos conocidos como una buena fuente de fibra dietaria. La fibra de guayaba es producida de los materiales remanentes del proceso de extracción de jugo, tanto la pulpa como la cáscara tienen un alto contenido de fibra dietética (48.55 y 49.22%) y de polifenoles extraíbles (2.62 y 7.79%) respectivamente (Jiménez-Escrig *et al.*, 2001).

2.1.3. Péptidos bioactivos

La Asociación Americana de Dietética (American Dietetic Association, ADA) define a los compuestos bioactivos como “constituyentes fisiológicamente

activos en los alimentos o en suplementos dietarios derivados de fuentes animales o vegetales, incluyendo aquellos necesarios para la nutrición básica del humano, que han demostrado tener un papel en la salud y que son seguros para el consumo, incluyendo: compuestos sintéticos que son equivalentes fisicoquímica o biológicamente a los compuestos bioactivos naturales en los alimentos, cualquier compuesto alimenticio activo procesado naturalmente, extraído, concentrado o modificado con propósitos de fortalecer los alimentos o suplementos dietarios" (Owusu-Apenten, 2010).

Los péptidos bioactivos se encuentran dentro de la estructura primaria de las proteínas animales y vegetales, y pueden ser liberados por medio de proteólisis *in vivo, in vitro* o por combinación de ambas (Hebert *et al.*, 2010). La proteólisis *in vivo* involucra la digestión gastrointestinal (con enzimas digestivas como la pepsina, tripsina o quimosina) así como peptidasas provenientes de la microbiota intestinal. Por otro lado, la producción de péptidos bioactivos *in vitro* incluye la hidrólisis enzimática por enzimas endógenas presentes en la matriz del alimento como la proteólisis que ocurre durante el procesamiento del alimento o en la maduración por la acción de los cultivos iniciadores o enzimas aisladas de los microorganismos proteolíticos (como *Lactobacillus helveticus, Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*) (Hebert *et al.*, 2010; Espeche Turbay *et al.*, 2012). La fermentación microbiana es uno de los procesos más usados para generar péptidos bioactivos, principalmente en la industria láctea (Hebert *et al.*, 2008; Hebert *et al.*, 2010; Espeche Turbay *et al.*, 2012).

Una gran variedad de péptidos con diferentes efectos fisiológicos han sido aislados al hidrolizar las proteínas de la leche, entre los cuales podemos encontrar: péptidos antihipertensivos, antitrombóticos, antimicrobianos, inmunoestimulantes, acarreadores de minerales y anti-stress (Sendra *et al.*, 2008; Nielsen, 2009). En el Cuadro 2 se muestran algunos ejemplos de péptidos derivados de proteínas de leche y su bioactividad.

Cuadro 2. Péptidos bioactivos derivados de proteínas lácteas (Fitzgerald y Meisel, 2003)

Péptido Bioactivo	**Proteína Precursora**	**Bioactividad**
Casomorfinas	α_{s1}- y β-caseínas	Agonista opioide
α-Lactofinas	α-lactoalbúminas	Agonista opioide
β-Lactofinas	β-lactoglobulinas	Agonista opioide
Lactoferroxinas	Lactoferrina	Antagonista opioide
Casoxinas	κ-caseína	Antagonista opioide
Casoquininas	α_{s1}- y β-caseínas	Inhibidor de la ACE
Lactoquininas	α-lactoalbúminas, β-lactoglobulinas y seroalbúminas	Inhibidor de la ACE
Inmunopéptidos	α_{s1}-, β- y κ-caseínas	Inmunomodulatorios
Lactoferricina	Lactoferrina	Antimicrobiano
Casocidicina	α_{s2}-caseína	Antimicrobiano
Isradicina	α_{s1}-caseína	Antimicrobiano
Casoplatelinas	κ-caseínas	Antitrombótico
Fosfopéptidos	α_{s1}-, α_{s2}-, β- y κ-caseínas	Unión con minerales

Cuadro 3. Actividad de péptidos derivados de las proteínas del suero bovino (Morris y Fitzgerald, 2008)

Secuencia del Péptido	**Fragmento**	**Proteína Precursora**	**Bioactividad**
WLAHK	104-108	α-lactoalbúmina	Inhibidor de la ACE
LF	99-108	α-lactoalbúmina	Inhibidor de la ACE
YGL	50-52	α-lactoalbúmina	Inhibidor de la ACE
YGLF	50-53	α-lactoalbúmina	Inhibidor de la ACE, hipotensivo, agonista opioide
LKP	46-48	β-lactoglobulinas	Inhibidor de la ACE
KW	60-61	β-lactoglobulinas	Inhibidor de la ACE
LVR	11-124	β-lactoglobulinas	Inhibidor de la ACE
IPA	78-80	β-lactoglobulinas	Hipotensivo
YLLF	102-105	β-lactoglobulinas	Agonista opioide
HIRL	146-149	β-lactoglobulinas	Agonista opioide
EQLTK	1-5	α-lactoalbúmina	Antimicrobiano
ISCDKF	75-80	α-lactoalbúmina	Antimicrobiano
IPAVFK	78-83	β-lactoglobulinas	Antimicrobiano
VAGTWY	15-20	β-lactoglobulinas	Antimicrobiano

Las proteínas del suero son una excelente fuente de nitrógeno y aminoácidos esenciales, pero además de esta función nutricional se ha encontrado evidencia de que sus péptidos tienen efectos benéficos en la salud del consumidor (Morris y Fitzgerald, 2008). En el Cuadro 3 se muestran algunas de las actividades de péptidos obtenidos a partir de estas proteínas.

2.1.4. Uso de suero en bebidas

El suero, dulce o ácido, puede ser utilizado de diferentes maneras en la industria alimentaria; pero en su mayoría es deshidratado para producir suero en polvo, para la producción de concentrados y aislados de proteínas o para concentrados de lactosa. El uso del suero para la elaboración de bebidas comenzó desde los años 1970's y desde entonces se han desarrollado varias bebidas no alcohólicas y alcohólicas (Jeličić *et al.*, 2008).

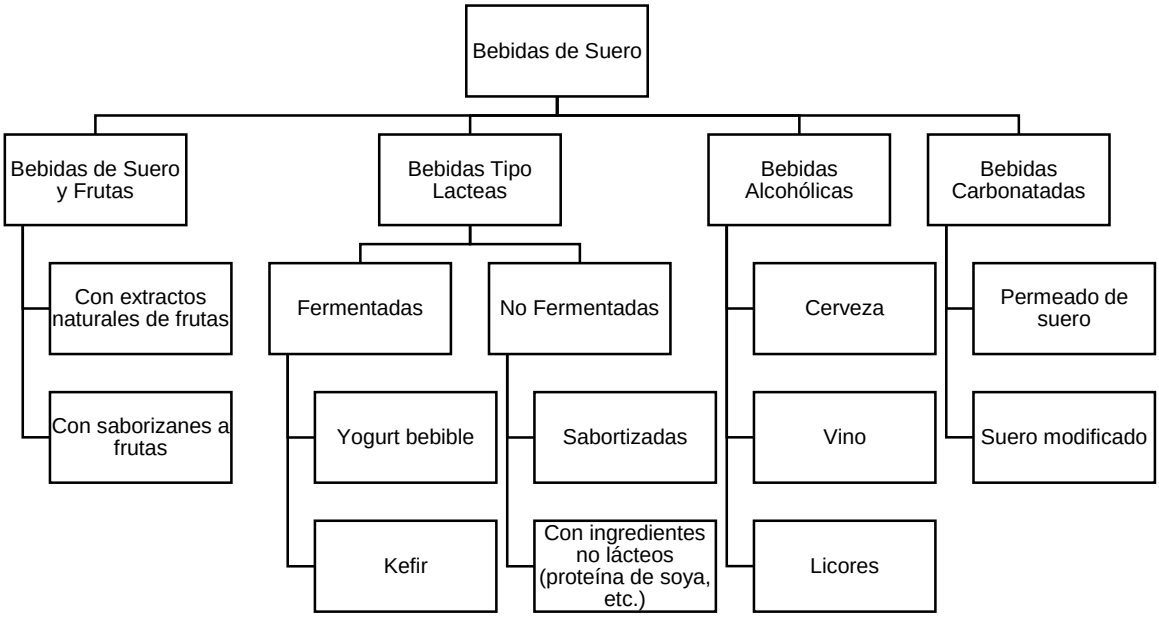


Figura 2. Principales tipos de bebidas a base de suero (Jelen, 1992)

El suero también puede ser empleado como materia prima principal o como ingrediente en la elaboración de diversos productos, como las bebidas y los productos lácteos; algunos de los usos principales del suero en bebidas se muestran en la Figura 2. El incremento del uso de este producto en las bebidas se ha debido a que se han logrado obtener proteínas en su forma nativa (no desnaturalizadas ni dañadas) por medio del uso de procesos de separación por membrana, las cuales son ideales para elaborar bebidas carbonatadas y no carbonatadas. Además estas proteínas tienen una alta solubilidad en condiciones ácidas, las cuales se presentan en la mayoría de bebidas (Jelen, 1992).

En las últimas dos décadas se han registrado varias patentes de formulaciones de bebidas de suero adicionadas con concentrados de frutas. Las bebidas con sabores cítricos o con frutas tropicales como el mango, el plátano y la papaya han sido las desarrolladas con mayor frecuencia, debido a que se ha comprobado que este tipo de frutas son capaces de enmascarar sabores indeseables provenientes del suero ácido (Djurić *et al.*, 2004).

Además de frutas, algunos científicos han usado otros ingredientes como saborizantes; entre ellos chocolate, cocoa, vainilla, miel con cereales de arroz y de avena. La adición de cereales le proporciona a la bebida una fuente de fibra dietaria, ácidos grasos esenciales y proteínas hipoalergénicas. Otra opción, es la elaboración de bebidas fermentadas a base de suero, en donde la lactosa presente actúa como sustrato para las bacterias; en este campo se han obtenido bebidas fermentadas con características sensoriales aceptables para los consumidores (Jeličić *et al.*, 2008).

2.1.4.1. Mercado de bebidas a base de suero

Las proteínas del suero tienen varios compuestos bioactivos que pueden aumentar la inmunidad y un efecto positivo en la salud cardiovascular y en el tono muscular. Adicionalmente, este ingrediente ofrece un sabor suave y pude ser usado en una gran variedad de bebidas como té frío, aguas saborizadas, bebidas para niños, y smoothies. De forma tradicional, estos productos han sido consumidos por

deportistas durante años; pero se considera que el mercado de estas bebidas se expande conforme los consumidores buscan bebidas refrescantes, que cumplan las necesidades nutricionales y además tengan buen sabor. En estos productos, los aislados de proteína se han convertido en un ingrediente clave, ya que tienen una excelente estabilidad y características sensoriales agradables (Fuhrman, 2011).

Algunas de las bebidas a base de suero que actualmente se encuentran en el mercado son:

- Special K20® Protein Water Mix de Kellog's (Estados Unidos): bebida en polvo que ya preparada contiene 1% de proteína y 1% de fibra, elaborada con aislado de proteína de suero y se comercializa en varios sabores (fresa – kiwi y pink lemonade) (Kellog's, 2013).
- Protein Plus™ de Bolthouse Farms (Estados Unidos): batido proteico que contiene 6% de proteína, 21 vitaminas y minerales, elaborada con concentrado de proteína de suero y aislado de proteína de soya, se comercializa en varios sabores (chocolate, café, mango y vainilla) (Bolthouse Farms, 2010).
- Whey Juice de EB Perfomance (Estados Unidos): bebida que contiene 3% de proteína y 0.6% de fibra prebiótica, elaborado con proteína de suero y se comercializar en varios sabores (arándano rojo – manzana, fresa – plátano, arándano azul, naranja – melocotón y mango) (Industria Alimentaria, 2010).
- Hidra de Batavo de Brasil Foods (Brasil): batido de suero de leche y zumos de frutas, se realizar a partir de suero de leche (88%) y jugo concentrado (12%), se comercializa en varios sabores (maracuyá, uva y durazno) (Industria Alimentaria, 2013).
- Whey Up (Estados Unidos): bebida elaborada con aislado de proteína de suero (4%) y cafeína (0.03%) (Whey Up, 2013).
- Fruity Whey de Balancereal (Inglaterra): bebida en polvo a base de suero en polvo, se comercializa en varios sabores (maple, guinda, frambuesa, arándano, manzana y cocoa) (Balancereal, 2009).

Otra opción para el uso de suero es como ingrediente secundario en la elaboración de bebidas lácteas o alimentos lácteos. En México existen varias marcas que incluyen suero en su listado de ingredientes, algunos ejemplos son: Nutrileche, Mileche, Dulac, PorSalud, Ganata, Besto Choice, Ricalac, Lala Desarrollo, Nestlé Crecimiento, Alpura Kids, Vitaleche y Nestlé Omega Plus (PROFECO, 2004).

2.1.5. Bebidas fermentadas a base de suero

Todos los productos lácteos fermentados contienen bacterias ácido lácticas vivas, a menos que hayan sido pasteurizados después de su fermentación. El proceso de fermentación consiste en transformar una materia prima en varios productos de alto valor, utilizando microorganismos y la actividad de los mismos sobre distintos sustratos; lo cual implica que es esencial el conocimiento de los microorganismos para poder entender el proceso de fermentación (Joshi y Pandey, 1999). Es por eso que el incremento en el conocimiento en las áreas de microbiología, bioquímica, tecnología e ingeniería de alimentos ha hecho que se desarrollen una gran cantidad de alimentos fermentados, entre los cuales encontramos diversos lácteos, cereales, frutas, vegetales, mariscos y carnes fermentadas (Nair y Prajapati, 2003).

La fermentación de suero por bacterias ácido lácticas disminuye su contenido de lactosa, produciendo ácido láctico y metabolitos que contribuyen en el aroma, sabor y consistencia en el producto. Además, estas bacterias son capaces de hidrolizar la β-lactoglobulina, principal componente alérgeno, aumentando de esta manera la digestibilidad e hidrolizando los péptidos alergénicos (Pescuma *et al.*, 2008). Respecto a la fracción de carbohidratos, la lactosa puede ser fermentada a ácido láctico por varias vías dependiendo de la bacteria usada y se forma una mezcla de los isómeros L (+) y D (-); en la Figura 3 se muestran algunas de las vías metabólicas. Aunque la cantidad de cada isómero presente en la mezcla depende del cultivo utilizado, el isómero L(+) representa alrededor del 50 – 70% del total de ácido láctico formado (Water, 2003).

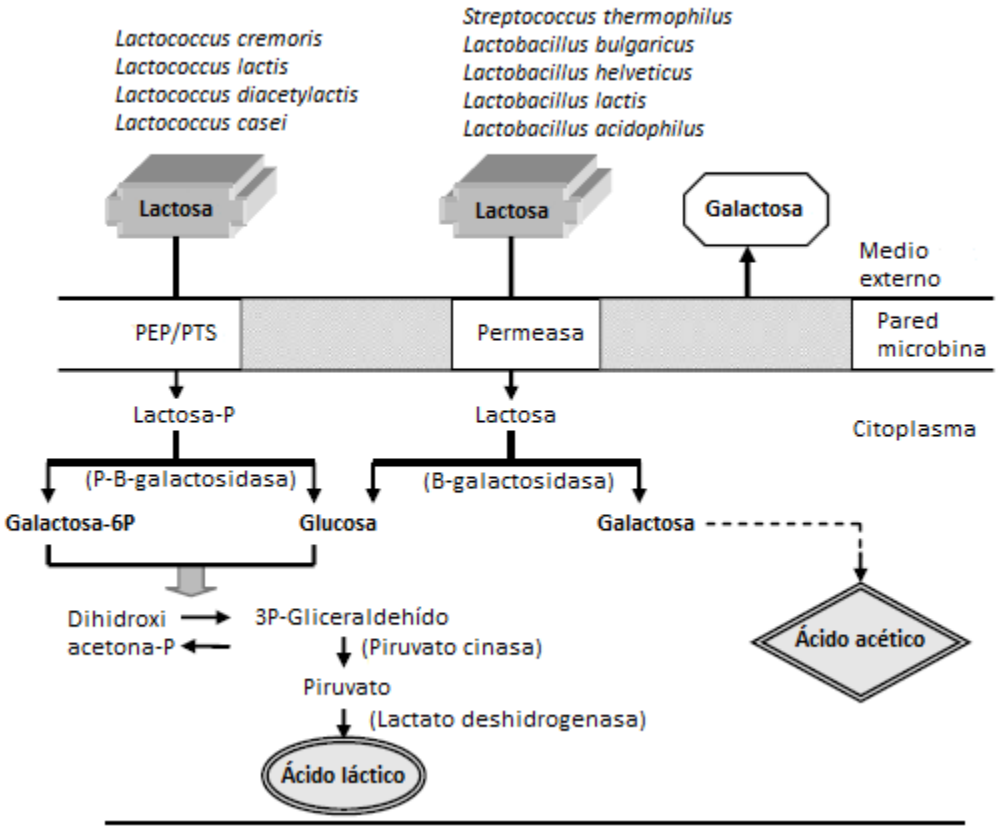


Figura 3. Vías metabólicas principales de lactosa en bacterias ácido lácticas usadas en la fermentación de leche; PEP/PTS: sistema fosfoenolpiruvato / fosfotransferasa (Water, 2003)

Los lactobacilli se dividen en 3 grupos dependiendo del tipo de fermentación que lleven a cabo: (1) homofermentativos obligados que fermentan hexosas por glucólisis y producen principalmente ácido láctico, (2) heterofermentativos obligados que usan la vía del 6–fosfogluconato / fosfocetolasa (6–phosphogluconate / phosphoketolese, 6PG/PK) para producir otros productos como CO_2 y etanol además de ácido cítrico y (3) heterofermentativos facultativos que fermentan hexosas por la vía de la glucólisis y pentosas por la vía 6PG/PK (Lee y Salminen, 2009).

En el 2000, el consumo total de leches fermentadas y yogurt en Estados Unidos fue de 6.35 millones de toneladas (Boletín de la Federación Internacional de Lácteos), lo cual representa el consumo de 10^{20} UFC de bacterias ácido lácticas (Saxelin *et al.*, 2003b). La popularidad de los yogurt bebibles con frutas ofrece una

excelente oportunidad para elaborar productos similares en donde el suero sea uno de los principales ingredientes de la formulación, convirtiéndose las bebidas lácteas fermentadas en una excelente opción (Zall, 1992).

Existen algunos estudios que muestran que fermentar el suero usando cultivos para yogurt (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus termophilus*) produce un sabor a yogurt más intenso comparado con el producido cuando se fermenta leche descremada. Surgiendo la posibilidad de elaborar bebidas a base de suero con características sensoriales similares a una leche fermentada o a un yogurt bebible (Gallardo-Escamilla *et al.*, 2005).

La bacteria que más comúnmente es usada para la fermentación de suero es *Lactobacillus bulgaricus*; sin embargo, también se han usado otras bacterias como *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus delbrueckii, Streptococcus lactis, Streptococcus lactis* var. *diacetilactis, Saccharomyces fragilis, Torulopsis sphaerica* y *Mycoderma* ssp, esto dependiendo del tipo de bebida a producto fermentado a elaborar (Webb y Whittier, 1970).

2.1.5.1. *Lactobacillus helveticus*

El género *Lactobacillus* es el grupo más amplio de bacterias ácido lácticas (BAL), existiendo más de 120 especies y 20 subespecies. Morfológicamente se caracterizan por ser bacilos gram positivo, no formadores de esporas. Son fermentadores estrictos (homo o heterofermentadores dependiendo de la especie), aerotolerantes o anaeróbicos, acidodúricos o acidofílicos y con requerimientos nutricionales complejos (carbohidratos, aminoácidos, péptidos, ésteres de ácidos grasos, sales, derivados ácidos nucleicos y vitaminas) (Lee y Salminen, 2009).

Lactobacillus helveticus es usado industrialmente como cultivo para la elaboración de quesos semiduros, como el Grana y el Provolone (Fortina *et al.*, 1998), y para la elaboración de queso Mozzarella en combinación con *S. thermophilus* (Broadbent *et al.*, 2001). Esta especie también posee un sistema proteolítico para degradar las proteínas de la leche y así obtener aminoácidos para

su desarrollo, las proteinasas y peptidasas que posee son similares, pero no idénticas, a las encontradas en *Lactococcus lactis* (Kunji *et al.*, 1996).

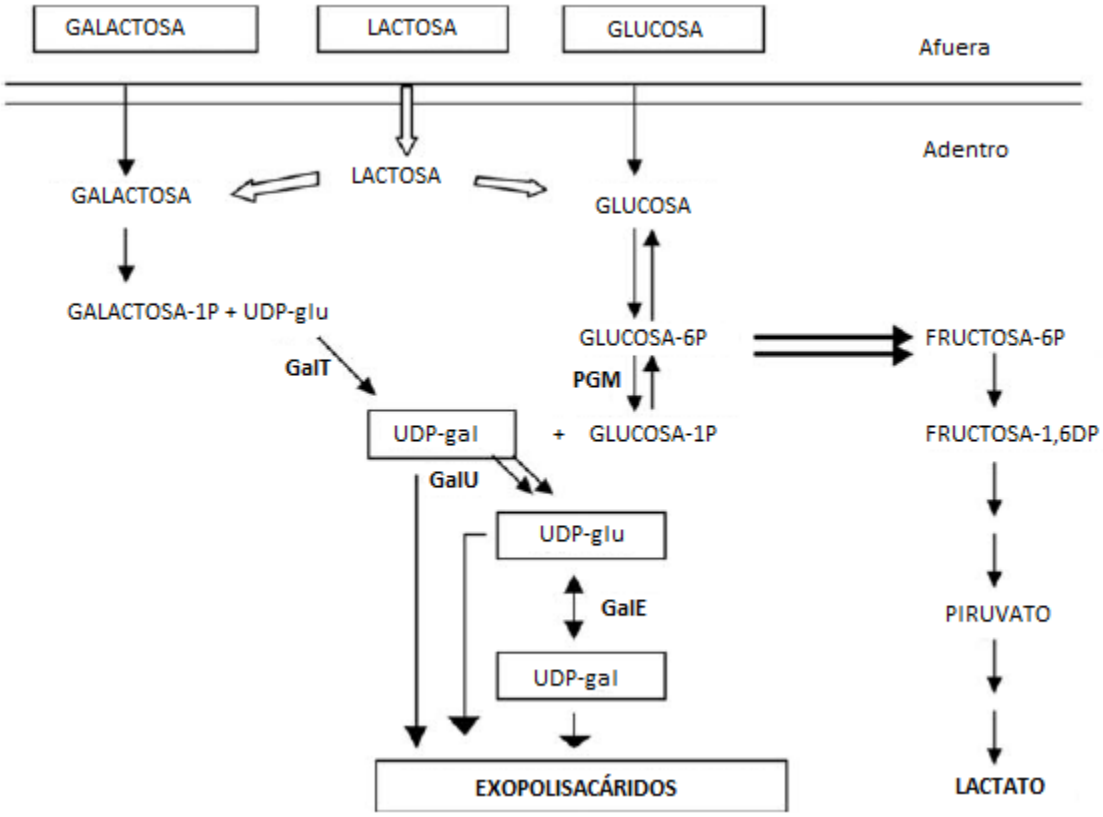


Figura 4. Vía metabólica para la síntesis de UDP-galactosa y UDP-glucosa en la producción de exopolisacáridos por *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807, a partir de glucosa, lactosa y galactosa (Torino *et al.*, 2005)

La cepa de *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 es capaz de sintetizar exopolisacáridos de alto peso molecular al desarrollarse en cultivos lácteos. En la Figura 4 se muestra la vía metabólica usada por esta cepa para la producción de UDP-galactosa y UDP-glucosa, monómeros necesarios para la producción de los exopolisacáridos (Torino *et al.*, 2005).

2.1.5.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Por varios siglos, *Saccharomyces cerevisiae* ha sido usado en la producción de alimentos y bebidas alcohólicas, y hoy en día este microorganismo

es también es usado en la industria farmacéutica. *S. cerevisiae* es un microorganismo muy atractivo para trabajar debido a que no es patógeno, y por esto se ha usado a lo largo de la historia en la elaboración de productos consumibles como en la producción de etanol y en la panadería; además ha sido clasificado como microorganismo GRAS (Generalmente aceptado como seguro). Así mismo, la fermentación y los procesos tecnológicos para su uso a gran escala están completamente establecidos, por lo que es atractivo usarlo para varios propósitos biotecnológicos (Goffeau *et al.*, 1996).

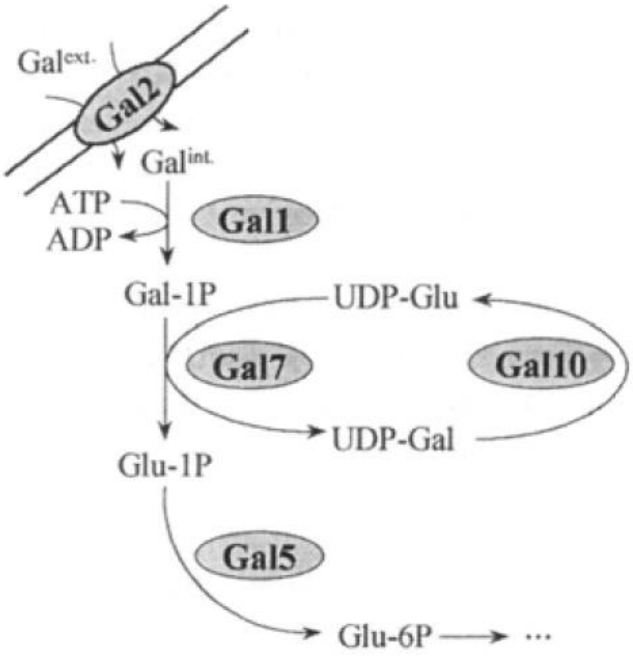


Figura 5. Vía metabólica de Leloir, contiene las enzimas responsables de la conversión de galactosa a glucosa-6-fosfato (Ostergaard *et al.*, 2002)

No muchas cepas de levaduras son capaces de fermentar la lactosa a etanol. La levadura más comúnmente usada en para la producción de etanol, *S. cerevisiae*, no puede fermentar la lactosa debido a que no posee la enzima β-galactosidasa y ni el sistema lactosa permeasa. Sin embargo, algunas otras alternativas se han estudiado, Champagne y Goulet (1988) utilizaron un

microorganismo β-galactosidasa positivo para hidrolizar la lactosa y así obtener un sustrato adecuado para la fermentación con *S. cerevisiae*.

Por otra parte, *S. cerevisiae* posee genes GAL que codifican para proteínas responsables de tomar la galactosa extracelular y convertirla el glucosa–6–fosfato en el interior (conocida como la vía de Leloir), como se muestra en la Figura 5 (Ostergaard *et al.*, 2002).

2.1.5.3. *Kluyveromyces marxianus*

Kluyveromyces marxianus es una levadura que fue descrita por primera vez en 1888 por E. C. Hansen, y fue llamada *Saccharomyces marxianus*. Ha sido aislado a partir de las uvas, sin embargo también puede aislarse a partir de bebidas fermentadas como el kéfir y el pulque (Fonseca *et al.*, 2008); así como de otros alimentos como el queso, yogur y leche (Roostita y Fleet, 1996).

Esta levadura es capaz de fermentar la galactosa, sacarosa, rabinosa y lactosa, y se ha utilizado en la producción de etanol teniendo una menor tendencia a producirlo cuando se encuentra en presencia de un exceso de azúcares (Fonseca et al., 2008). Otra de sus características es su capacidad para producir compuestos aromáticos como ésteres, ácidos carboxílicos, alcoholes, y acetato (Jakobsen y Narvhus, 1996).

La levadura fermentadora de lactosa *K. marxianus* que se encuentra regularmente en la leche y en los productos lácteos ha sido señalada como candidato prometedor para generar péptidos antihipertensivos a partir de las proteínas del suero α–lactoalbúmina y β–lactoglobulina (Hamme *et al.*, 2009). Su potencial para producir leche fermentada con péptidos ACE-inhibitorios derivados de la caseína también ha sido descrito (Chaves-López *et al.*, 2012); sin embargo, los efectos antihipertensivos *in vivo* todavía no han sido evaluados (García-Tejedor *et al.*, 2014).

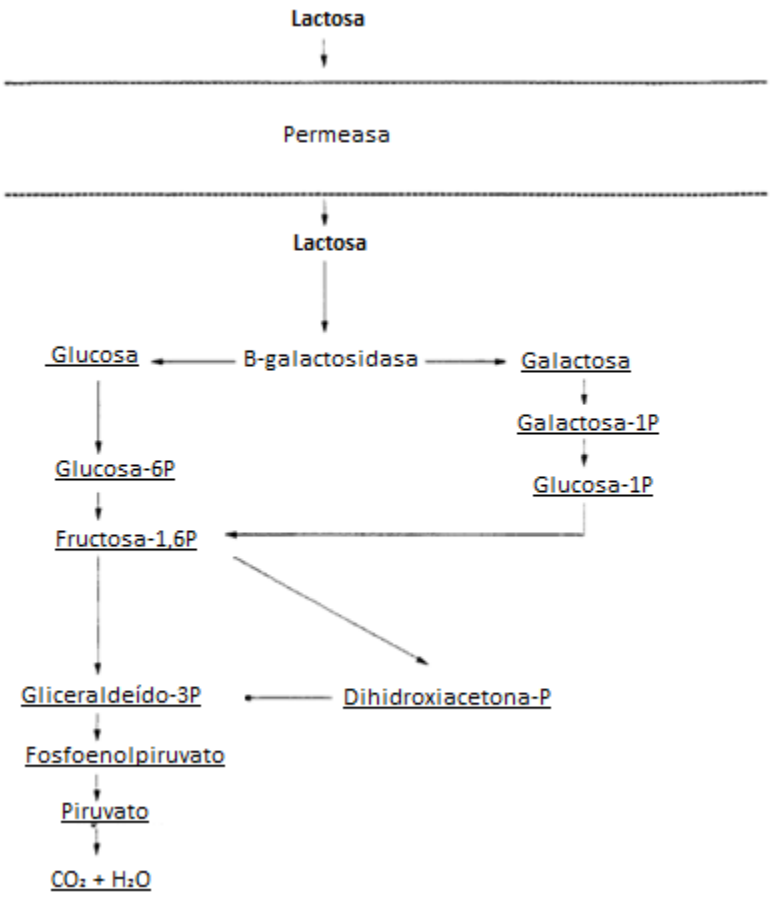


Figura 6. Vía catabólica de la lactosa y galactosa de *Kluyveromyces marxianus* (Lee *et al.*, 1996)

En la Figura 6 se muestra el esquema del metabolismo de lactosa *K. marxianus*; y el uso de esta levadura en la industria presenta varias ventajas, entre las cuales se pueden mencionar:

1. Buena tasa de crecimiento, lo cual tiene un impacto económico positivo en la industria de alimentos (Castillo, 1989).
2. Es aceptado como GRAS, un aspecto técnico importante a considerar cuando se elaboran alimentos fermentados (Castillo, 1989).
3. Mayor actividad β–galactosidasa (de algunas cepas) en comparación a otras levaduras que usan lactosa como sustrato (Inchaurrondo *et al.*, 1994).

2.2. Suero de Leche

El suero es el producto obtenido al remover la grasa y la caseína presente en la leche, generalmente se obtiene en la fabricación de quesos. Este producto representa el 80-90% del volumen total y contiene alrededor del 50% de los nutrientes originales, está compuesto mayormente por agua pero contiene proteínas, lactosa, vitaminas y sales minerales (Bylund, 1995; Kilara, 2008).

Como subproducto de la fabricación de quesos, existen dos tipos de suero: el suero dulce, con un pH mayor a 5.6, originado por la coagulación de caseína por acción del cuajo; y el suero ácido, con pH no mayor a 5.1, resultado de la coagulación de la caseína por efecto de la acidificación de la leche (Tunick, 2008). En el Cuadro 4 se muestra la composición aproximada del suero que se obtiene de la fabricación de quesos.

Cuadro 4. Composición aproximada del suero (Bylund, 1995)

Constituyente	**% en el Suero**
Sólidos Totales	6.4
Agua	93.6
Grasa	0.05
Proteína	0.55
Nitrógeno no Proteico	0.18
Lactosa	4.8
Sales Minerales	0.5

Además, las proteínas del suero tienen excelentes propiedades de solubilidad, viscosidad, emulsión y gelificación (Tunick, 2008). Aunado a que los aminoácidos presentes en estas proteínas tienen un alto valor biológico en comparación a los presentes en la caseína o en otras proteínas de origen animal (Jeličić *et al.*, 2008).

2.2.1.1. Proteínas

Las proteínas del suero poseen un gran valor nutritivo debido a su composición de aminoácidos. En su mayoría son β-lactoglobulinas, sin embargo,

también se encuentran otras proteínas como la α-lactoalbúmina, seroalbúmina e inmunoglobulinas.

2.2.1.1.1. α-lactoalbúmina

La α-lactoalbúmina es la segunda proteína presente en mayor cantidad en el suero, representa el 2% del total de proteínas presentes en la leche y el 13% de total de las proteínas presentes en el suero (Kilara, 2008). Ésta consiste en una cadena de 123 aminoácidos, con un peso molecular de 14 kDa (Goff, 2009) y tiene una función primordial en la síntesis de lactosa en la ubre de los mamíferos; modifica la actividad de la enzima galactosil transferasa, catalizando la reacción entre glucosa y UDP-galactosa para dar lugar a la lactosa (Kilara, 2008).

La α-lactoalbúmina es capaz de formar puentes iónicos intramoleculares con el calcio, con lo cual se estabiliza la conformación de la proteína y aumenta su resistencia ante altas temperaturas, en condiciones favorables de calcio y pH es capaz de permanecer soluble después de ser sometida a temperaturas mayores de 100°C (Walstra *et al.*, 2005; Kilara, 2008).

2.2.1.1.2. β-lactoglobulina

La β-lactoglobulina representa el 10% del total de proteínas presentes en la leche y el 58% de las proteínas presentes en el suero (Kilara, 2008). Esta proteína consiste en una cadena de 162 aminoácidos, con un peso molecular de 18 kDa e incluye 8 variantes genéticas (Goff, 2009). A pH mayores a 8.0 y menores a 3.0 se encuentra en forma monomérica, a pH en el intervalo de 3.1 – 5.1 se encuentra como octámero y a otros pH se encuentra cómo dímero (Kilara, 2008).

2.2.1.1.3. Seroalbúmina

Esta proteína no es sintetizada en la glándula mamaria sino que se encuentra presente en el suero del torrente sanguíneo, pero puede llegar a la leche

por filtración. Tienen un peso molecular de 69 kDa, en la sangre tiene la función de transportar ácidos grasos libres (Kilara, 2008).

2.2.1.1.4. Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas son moléculas de glicoproteínas que están compuestas por dos cadenas de peso molecular de 20 – 25 kDa y dos cadenas de peso molecular de 50 – 70 kDa, existen 4 tipos distintos en la leche: IgG1, IgG2, IgA y IgM. Estas moléculas son las encargadas de proporcionar anticuerpos al ternero cuando son consumidas a través del calostro. La IgM es de gran importancia en la leche debido a que posee lacteninas L1 y L3 que son inhibidores de bacterias gram positivo (Walstra *et al.*, 2005; Kilara, 2008).

2.2.1.2. Lactosa

La lactosa es un carbohidrato que se encuentra únicamente en la leche, está formado por un monosacárido de galactosa y un monosacárido de glucosa, unidos por un enlace glucosídico β–1,4. Este carbohidrato es sintetizado en las vesículas de Golgi debido a la presencia de α-lactoalbúmina y su contenido en la leche puede variar desde 4.8 hasta 5.2% en algunos casos (Walstra *et al.*, 2005).

Una solución de lactosa es 0.3 veces tan dulce como una solución de sacarosa a la misma concentración. En la leche, este sabor dulce es enmascarado por las proteínas, en especial por la caseína. Si la lactosa es hidrolizada en glucosa y galactosa, el sabor dulce aumenta considerablemente (Walstra *et al.*, 2005).

2.2.1.3. Sales Minerales

Las sales minerales se encuentran disueltas en el suero de la leche o formando compuestos con la caseína, las más importantes son sales de calcio, sodio, potasio y magnesio; éstas se encuentran como fosfatos, cloruros, citratos y caseinatos (Bylund, 1995). La concentración de sales presentes en la leche, y por

lo tanto, en el suero puede variar; pero su concentración promedio se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Sales minerales importantes en la leche y su distribución entre suero y caseína. (Walstra *et al.*, 2005)

Componente	**Promedio (mg/100g)**	**Fracción presente en el Suero**	**Fracción presente en las micelas de caseína**
Na	48	0.95	0.04
K	143	0.94	0.08
Ca	117	0.32	0.77
Mg	11	0.66	0.06
Cl	110	1	---
CO_3	10	~1	---
SO_4	10	1	---
PO_4	203	0.53	0.39
Citrato	175	0.92	0.03

2.2.1.4. Vitaminas

Las vitaminas presentes en el suero son las hidrosolubles, entre las cuales están la vitamina B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), B5 (ácido pantoténico), B6 (piridoxina) y B12 (cianocobalamina) (Goff, 2009).

2.3. Separación por membrana

La separación por membrana está definida como un proceso de separación de dos o más componentes de un líquido, basado generalmente en las diferencias de tamaños de partículas o de cargas superficiales. La membrana usada para este proceso actúa como una barrera selectiva que permite el paso de ciertos componentes y retiene los otros (Lewis, 1996; Cheryan, 1998; Pellegrino, 2000).

Para realizar la separación, es necesario aplicar una presión determinada para lograr revertir el proceso de ósmosis y así lograr la separación de las moléculas deseadas por medio de la membrana semipermeable, como se muestra en la Figura 7 (Smith, 2013).

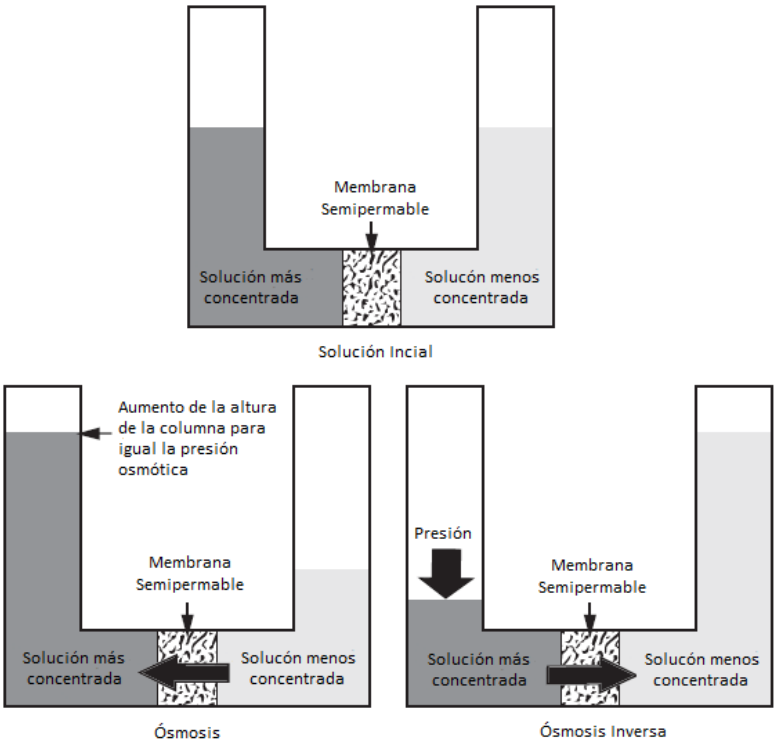


Figura 7. Proceso de ósmosis y ósmosis inversa (Smith, 2013)

Los principales métodos de separación por membrana son: microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF) y ósmosis inversa (RO). Estos métodos son similares entre sí, la principal diferencia es el grado de permeabilidad de la membrana; y por consiguiente, el tipo de partículas que se logran retener (Gutman, 1987). La MF es un proceso intermedio entre la filtración regular y la UF, el tamaño de poro de las membranas usadas es mayor a 0.2 µm y la presión aplicada es pequeña. La UF es efectiva para la separación de macromoléculas de una solución y el tamaño de poro de las membranas es de 1 a 50 nm. La NF se realiza a través de membranas permeables con carga y el tamaño de poro es entre 1 y 10 nm. La RO utiliza membranas cuyos tamaño de poro se encuentran en el orden de 0.5 a 2 nm y su operación es a grandes presiones (Walstra *et al.*, 2005; Fernandes de Carvalho y Maubois, 2009; Muthukumarappan y Marella, 2010).

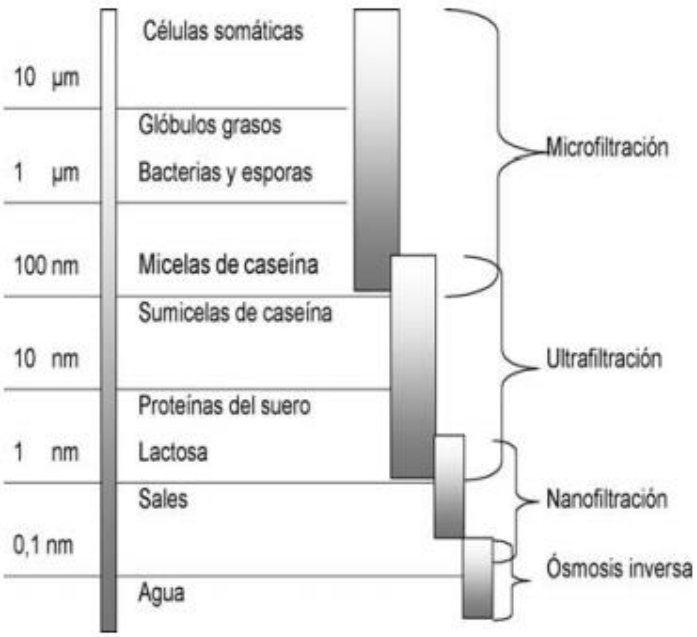


Figura 8. Selectividad de los diferentes procesos de separación por membrana aplicables a leche (Brans *et al.*, 2004)

En la Figura 8 se muestra cada uno de los procesos de separación por membrana mencionados y los componentes de la leche que son capaces de permear dependiendo del tamaño de poro de la membrana usada. Sin embargo, algunos parámetros de operación como la temperatura, velocidad de alimentación, presión y concentración en la alimentación pueden alterar la permeabilidad de las moléculas.

En las últimas dos décadas se han comercializado una gran variedad de membranas y sus propiedades térmicas, químicas y físicas se han mejorado cada vez más. Las membranas sintéticas pueden ser fabricadas de materiales orgánicos o inorgánicos, dependiendo de la aplicación y propiedades finales deseadas. Para el caso de las orgánicas, se han usado una gran cantidad de polímeros como celulosa, acetato de celulosa, poliamidas, polietileno, policarbonato, polisulfona y polipropileno; para el caso de membranas inorgánicas, se han usado materiales cerámicos, circonio, aluminio, vidrio, carbón pirolizado y otros metales (Osada y Nakagawa, 1992; Smith, 2013).

Las empresas manufactureras de membranas suelen clasificar las membranas de acuerdo a su capacidad de retener moléculas. Es muy común el uso del término Peso Molecular Límite (Molecular Weight Cut-Off, MWCO), el cual se refiere al peso molecular del soluto que es retenido en un 90% por la membrana (Smith, 2013). En las membranas usadas para UF, el MWCO es determinado probando la permeabilidad de proteínas o dextranos de diferentes pesos moleculares (Goulas y Grandison, 2008).

Otro factor importante es la polaridad de la membrana, ésta es la responsable de su carácter hidrofóbico o hidrofílico, de la humectabilidad y de la permeabilidad de los distintos componentes. La permeabilidad de un soluto también es afectada por la carga eléctrica de la membrana, debido a las interacciones electrostáticas que puedan tener; generalmente, se utilizan membranas neutras o con la misma carga de la molécula que se desea retener para evitar la atracción o ensuciamiento de la membrana (Smith, 2013).

2.3.1. Aplicaciones de separación por membrana en la industria láctea

Numerosas razones han contribuido al éxito de la tecnología de separación por membrana en la industria láctea; siendo la más importante que ha permitido la optimización de este proceso debido a el estudio de las características bioquímicas de la leche y sus productos (Fernandes de Carvalho y Maubois, 2009).

Algunas de las aplicaciones de separación por membrana que se realizan actualmente en esta industria son:

- Concentración de leche entera o descremada por RO en un factor de 2 a 3 veces, en el cual el permeado es únicamente agua (Goulas y Grandison, 2008).
- Concentración de la grasa y proteínas presentes en la leche por UF, para su posterior uso en la elaboración de yogurt, quesos y bebidas fermentadas (Kosikowski, 1986).

- Concentrados de proteínas por medio de UF y diafiltración, logrando desde un 50 hasta un 90% de proteínas en los sólidos totales, para su posterior uso como materia prima (Fernandes de Carvalho y Maubois, 2009).
- Eliminación de microorganismos por MF de la leche como alternativa al tratamiento térmico (Goulas y Grandison, 2008).
- Eliminación de células somáticas en leche cruda por MF para evitar la actividad de las enzimas termorresistentes presentes en las mismas (Fernandes de Carvalho y Maubois, 2009).
- Procesamiento del suero para obtención de WPC (concentrado de proteína de suero), WPI (aislado de proteína de suero), lactosa, entre otros; mediante varias técnicas como MF, NF y UF (Fernandes de Carvalho y Maubois, 2009).

2.3.2. Fraccionamiento de las Proteínas de Leche por MF

Las proteínas presentes en la leche pueden ser fraccionadas o concentradas por medio de la MF, las proteínas son biopolímeros que cuando están en solución acuosa se doblan de manera que se alinean los grupos hidrofóbicos hacia adentro y los grupos con cargas (positivas o negativa) hacia el exterior. Las interacciones electroestáticas que se dan tienden a incrementar el tamaño efectivo de las moléculas, siendo este mayor que su tamaño molecular (Böddeker, 2008).

Una micela de caseína tiene un volumen de 4.0 mL/g, su diámetro es de 20 a 300 nm (siendo 110 nm el valor promedio), el peso molecular de las distintas fracciones de caseína es 23, 25, 24 y 19 kDa para la αs1, αs2, β y κ–caseína respectivamente. Las micelas de caseína pueden ser concentradas con una membrana con tamaño de poro de 0.05 – 0.2 µm (Brans *et al.*, 2004). El uso de la MF de la leche para separar las micelas de caseína y así obtener un producto intermediario para la elaboración de quesos también ha sido un objetivo que se han propuesto los investigadores del área de lácteos (Marcelo y Rizvi, 2008).

La MF en la elaboración de quesos puede aplicarse de tres maneras: estandarización de la proteína, concentración de un producto intermedio o uso de pre-quesos líquidos. Para la estandarización de la proteína, la leche es microfiltrada para concentrar la cantidad de proteína, logrando un contenido de 3.7–4.5%; este método permite la estandarización de la composición de la leche (específicamente de la proteína); es usado para la elaboración de quesos como el Camembert, Cheddar y Mozzarella. Para el caso de la concentración de un producto intermediario, la leche es concentrada de 2 a 5 veces por MF y posteriormente este concentrado es usado como materia prima en la elaboración de quesos. El concepto de pre-queso líquido consiste en concentrar la leche por MF hasta lograr la composición del queso que se va a elaborar y luego se continúa con los procesos de coagulación y fermentación correspondientes (Mistry, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

Muchos métodos para el procesamiento de alimentos generan subproductos, que en el pasado, han sido tratados como desechos y han generado contaminación ambiental; hoy en día, gracias a las nuevas tecnologías tiene la posibilidad de ser convertidos en materiales que pueden ser aprovechados en otros procesos, transformándolos en productos de valor agregado. Por ejemplo, la industria quesera mexicana produjo en el 2013 alrededor de 270,000 toneladas de queso (según boletín de la SIAP), las cuales generan cerca de 2.5 millones de toneladas de suero. A pesar de que el suero es un producto rico en nutrientes como proteínas, lactosa y vitaminas, y puede utilizarse en procesos fermentativos para obtención de biomasa, elaboración de bebidas, producción de biofertilizantes, elaboración de empaques comestibles, entre otros; únicamente cerca del 15% de éste es aprovechado y el resto es descargado a los drenajes. Otro ejemplo es la industria de jugos y néctares, la cual genera grandes volúmenes de desechos agroindustriales (cáscara, huesos y pulpa) que representan un problema ambiental, debido a que actualmente no existen normativas adecuadas para su manejo y un muy poco volumen de éstos es aprovechado en la elaboración de fertilizantes o en la producción de alimento animal. Dependiendo de la fruta y del proceso, el volumen de desechos puede llegar a ser hasta del 60% del peso total de la fruta; y éste puede convertirse en una fuente aprovechable de fibra dietaria, polifenoles, carotenoides y micronutrientes, entre otros. Por otro lado, en el 2012 el mercado mexicano de bebidas funcionales fue valorado en 357 mil 460 millones de pesos según Euromonitor Internacional, reflejando un crecimiento mayor al 6% respecto al 2011 y mayor al crecimiento que tienen otros mercados de bebidas o refrescos. Por lo anterior, se propone una alternativa para aprovechar los subproductos de la industria quesera y de la industria de jugos y néctares, elaborando una bebida fermentada con propiedades funcionales que cumpla con los parámetros sensoriales y de calidad necesarios para poder formar parte de este creciente mercado de bebidas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Elaborar una bebida funcional fermentada a base del permeado obtenido de la microfiltración de leche descremada, adicionada con fibra de guayaba.

4.2. Objetivos Específicos

- Evaluar los parámetros cinéticos de crecimiento de *Lactobacillus helveticus, Saccharomyces cerevisiae y Kluyveromyces marxianus* ssp. *marxianus* usando permeado de leche descremada como medio de cultivo.
- Establecer la proporción adecuada de *Lactobacillus helveticus, Saccharomyces cerevisiae y Kluyveromyces marxianus* ssp. *marxianus* para obtener los parámetros fisicoquímicos deseados una bebida fermentada.
- Evaluar la hidrólisis de las proteínas lácteas presentes en la bebida, determinando el grado de hidrólisis durante el proceso de fermentación y la vida de anaquel de la misma.
- Estimar la vida de anaquel sensorial de la bebida formulada.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

5.1.1. Permeado de leche descremada (PLD)

El permeado se obtuvo mediante la microfiltración de leche descremada usando una membrana de PVDF con tamaño de poro de 0.3 µm, a una temperatura de 45 °C y 0 bar de presión, usando una unidad de separación por membrana SEPA CF II, marca Osmonics.

5.1.2. Fibra de guayaba

La fibra de guayaba se obtuvo de los subproductos generados en la elaboración de jugo de guayaba, por la empresa mexicana Sociedad Cooperativa de Trabajadores de Pascual, S.C.L, planta San Juan del Río, Querétaro, México; los cuales consistieron en semillas y pulpa. Los subproductos fueron lavados con agua a temperatura ambiente y secados a 60 °C durante 24 horas, posteriormente fueron triturados hasta obtener un tamaño de partículas menor a 420 µm.

5.1.3. Microorganismos

5.1.3.1. Bacteria ácido láctica

Como bacteria ácido láctica (BAL) se utilizó *Lactobacillus helveticus,* proveniente del cultivo comercial FD-DVS LH-B02 de Chr-Hansen®. La cepa se conservó en Caldo MRS adicionado de glicerol (15%) a –20 °C. La activación de la cepa se realizó transfiriendo, en condiciones asépticas, 50 µL del cultivo almacenado a –20 °C a un tubo con 3 mL de Caldo MRS e incubando a 37 °C durante 24 horas. Por cada inóculo activado se cuantificó la cantidad de microorganismos realizando un recuento en placas con agar MRS, utilizando la técnica de extensión en superficie e incubando a 37 °C durante 48 horas.

5.1.3.2. Levaduras

Se utilizaron 2 levaduras, *S. cerevisiae* marca Danstar® y *Kluyveromyces marxianus* ssp. *marxianus* del cultivo comercial Swing Yeast LAF-4 de Chr-Hansen®. Ambas cepas se conservaron en Caldo YPD adicionado de glicerol (15%) a –20 °C. La activación de cada una se realizó transfiriendo, en condiciones asépticas, 50µL del cultivo almacenado a –20°C a un tubo con 3 mL de Caldo YPD e incubando a 30 °C durante 24 horas. Por cada inóculo activado se cuantificó la cantidad de microorganismos realizando un recuento en placas con agar PDA con ácido tartárico al 10% (14 mL por litro de agar), utilizando la técnica de vaciado en placa e incubando a 30 °C por 48 horas.

5.2. Métodos

5.2.1. Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento se realizaron mediante mediciones de densidad óptica a 600 nm usando un espectrofotómetro marca Bioscreen C, para esto se colocaron 20 µL de cada inóculo en 200 µL de medio de cultivo, se incubó a 37 °C y se realizaron mediciones cada 2 horas durante 48 horas; posteriormente la biomasa fue estimada usando una curva estándar de densidad óptica vs peso seco. Para determinar los parámetros cinéticos los datos se ajustaron a un modelo logístico de cuatro parámetros:

$$Biomasa = x_0 + \frac{x_{max} - x_0}{1 + \exp\left(-\mu_{max}\left(t - t_{x_{max}}\right)\right)}$$

en donde, x_0 es la biomasa inicial, x_{max} el crecimiento máximo, μ_{max} la velocidad de crecimiento y t_{Xmax} el tiempo en alcanzar el crecimiento máximo.

5.2.2. Determinación de la mezcla de proporciones idóneas de microorganismos

Para determinar la mezcla de proporciones idóneas de bacterias ácido-lácticas y levaduras a utilizar, de manera que se obtengan las características

deseadas en la bebida, se realizó un diseño experimental de mezclas en donde los factores a evaluar fueron: concentración de *L. helveticus* (1 – 3%), concentración de *S. cerevisiae* (0 – 2%) y concentración *K. marxianus* (0 – 2%). Las variables respuesta a evaluar en cada tratamiento fueron pH, acidez titulable, etanol, dióxido de carbono, grado de hidrólisis y preferencia sensorial.

5.2.3. Elaboración de la bebida

El permeado de leche descremada se adicionó con 1.27% (m/v) de fibra de guayaba y 1.67% (m/v) de Splenda®. Posteriormente se pasteurizó a 63 °C durante 30 minutos, se enfrió a 37 °C y se inoculó al 3% con la mezcla de (*L. helveticus* y *S. cerevisiae*), según los resultados del diseño de mezcla anterior. La fermentación se llevó a cabo a 37 °C durante 24 horas, una vez terminado el proceso de fermentación se enfrió a 4 °C, se envasó en presentaciones de 220 mL, se adicionaron 5 volúmenes de CO_2 y se almacenó en cámaras refrigeradas a 4 °C.

5.2.4. Análisis proximal

Los métodos que se usaron para cada atributo a evaluar en la bebida fueron: titulación con NaOH 0.1 N para determinar la acidez titulable, potenciómetro digital para determinar el pH, métodos enzimáticos para cuantificar etanol y CO_2, método fenol-sulfúrico para cuantificar azúcares totales, método OPA para el grado de hidrólisis de proteínas, electroforesis Tricine–SDS–PAGE en gel de poliacrilamida al 16% para verificar la hidrólisis de las proteínas.

5.2.5. Análisis microbiológico

El recuento de microorganismos se realizó empleando la técnica de vaciado en placas de VRB para el recuento de coliformes totales, y placas de PDA para el recuento de levaduras. Además, se usó la técnica de extensión en superficie para el recuento de bacterias ácido lácticas usando Agar MRS.

5.2.6. Estimación de la vida de anaquel sensorial

Envases de 220 mL provenientes de diferentes días de fabricación fueron almacenados a 4 °C a manera de tener muestras con distintos tiempos de almacenamiento el día del análisis; los tiempos de almacenamiento fueron de 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 días. Para asegurar que las muestras almacenadas eran aptas para el consumo se realizaron los siguientes análisis microbiológicos: bacterias ácido lácticas, coliformes totales, mohos y levaduras.

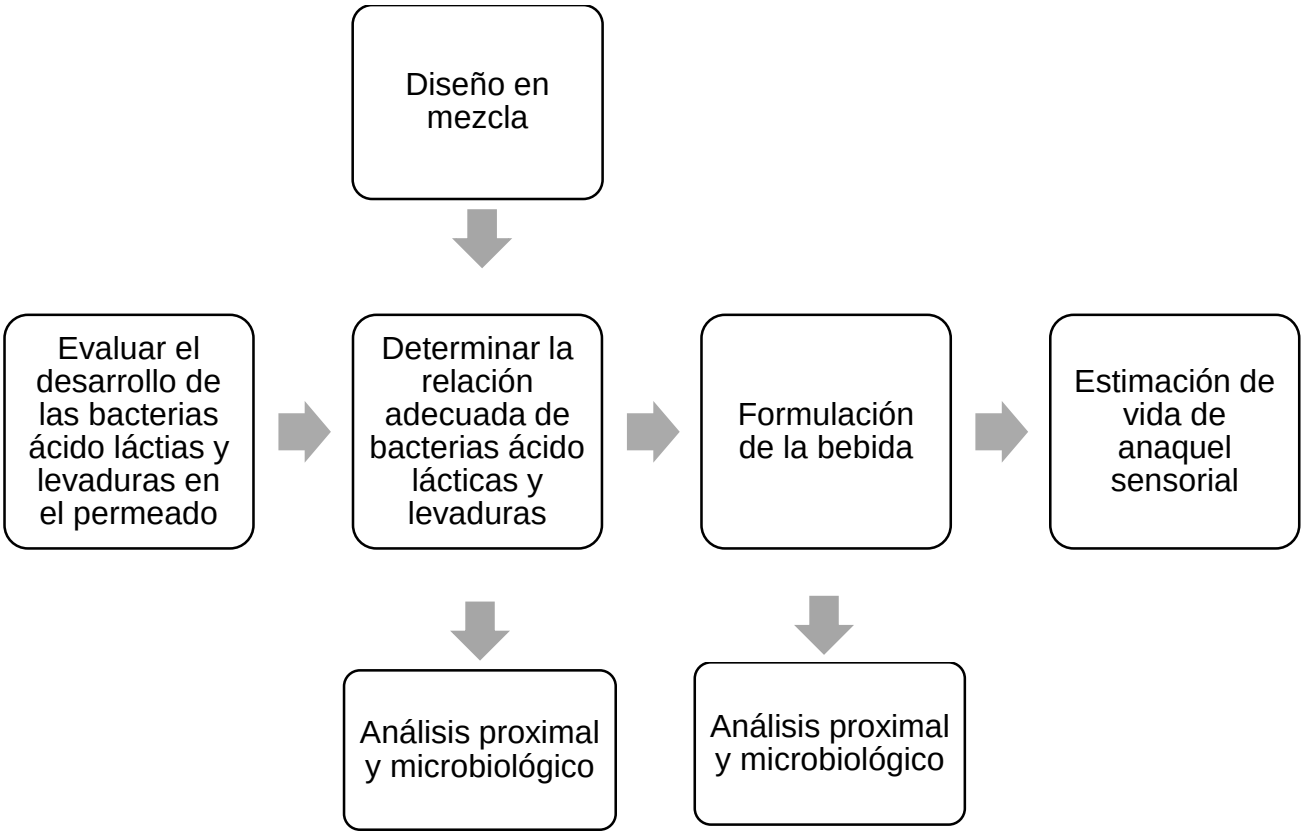
Se reclutaron 100 personas que consumieran regularmente refrescos y jugos, cada consumidor recibió 7 muestras, una muestra correspondiente a cada fecha de almacenamiento. Las muestras fueron presentadas a 4 °C usando vasos de poliestireno codificados con 3 dígitos, sirviendo 20 mL de muestra a cada consumidor. Todos los participantes recibieron instrucciones de comer una galleta sin sal y tomar agua entre cada muestra para limpiar el paladar. Para cada muestra el consumidor respondió a la pregunta ¿consumiría normalmente este producto? ¿sí o no? , y al momento de la evaluación se explicó que esto significaba que si ellos compraran este producto o si tuvieran el producto en su casa, ¿lo consumirían?

A cada muestra con diferente tiempo de almacenamiento se le evaluaron los siguientes parámetros: pH, acidez titulable, azúcares totales, etanol, CO_2, grado de hidrólisis, recuento de BAL y levaduras.

5.3. Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental usado fue un diseño de mezclas en donde los factores de estudio fueron las concentraciones de *L. helveticus* (0.33 – 1), *S. cerevisiae* (0 – 0.67) y *K. marxianus* (0 – 0.67). El análisis estadístico se realizó por medio de análisis de regresión y análisis de superficie respuesta, con el programa estadístico JMP. Cuando fue necesario realizar comparaciones entre medias se utilizó la prueba de Tukey. Todos los resultados son expresados como la media ± el error estándar.

5.4. Diagrama de Flujo



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Evaluación del desarrollo de BAL y levaduras en PLD

6.1.1. *Lactobacillus helveticus*

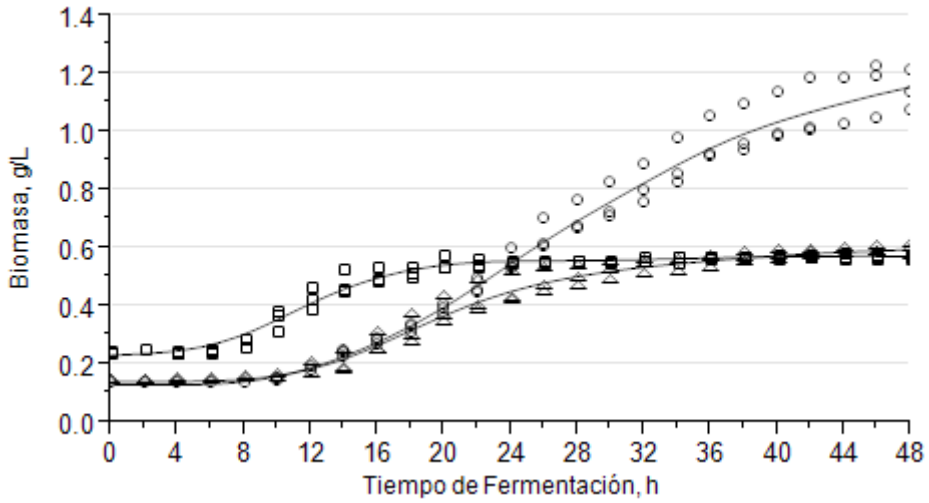


Figura 9. Curvas de crecimiento de *L. helveticus* a 37 °C en PLD; inoculando 6.7 log UFC/mL (□), 5.7 log UFC/mL (△) y 4.7 log UFC/mL (○).

En la Figura 9 se muestran las curvas de crecimiento de *L. helveticus*, inoculando diferentes concentraciones y usando PLD como medio. Se evaluaron tres concentraciones distintas de inóculo para poder determinar cómo son afectados los parámetros cinéticos en relación a la concentración inoculada. En estas curvas se observó que la duración de la fase lag depende de la concentración inoculada, la cual varió desde 7 h cuando se inoculó la mayor concentración hasta 11 h cuando se inoculó la concentración menor. Los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste del modelo logístico se muestran en el Cuadro 6, y se obtuvo que todos ellos dependen de la concentración de bacterias inoculadas. Cuando se inocularon 6.7 log UFC/mL, se obtuvo una mayor velocidad de crecimiento, se alcanzó la fase estacionaria en menor tiempo pero también se obtuvo el menor valor de crecimiento máximo; lo contrario fue obtenido cuando se inocularon 4.7 log UFC/mL, la

velocidad de crecimiento fue menor, tardó más tiempo en alcanzarse la fase estacionaria y se obtuvo el mayor valor de crecimiento máximo.

Cuadro 6. Parámetros cinéticos estimados, mediante el modelo logístico, para el crecimiento de *L. helveticus* a 37 °C usando PLD como medio de cultivo

Concentración Inoculada	x_0	x_{max}	μ_{max}	t_{Xmax}	R^2
6.7 log UFC/mL	0.23 ± 0.01	0.56 ± 0.01	0.41 ± 0.03	11.54 ± 0.23	0.979
5.7 log UFC/mL	0.12 ± 0.01	0.58 ± 0.01	0.22 ± 0.02	19.68 ± 0.39	0.977
4.7 log UFC/mL	0.08 ± 0.08	1.19 ± 0.03	0.14 ± 0.01	26.62 ± 0.51	0.983

Datos expresados como la media ± error estándar. Parámetros estimados a partir de 3 réplicas independientes. x_0: biomasa inicial (g/L), x_{max}: crecimiento máximo (g/L), μ_{max}: velocidad de crecimiento (h^{-1}) y t_{Xmax}: tiempo necesario para alcanzar el crecimiento máximo (h).

Tango y Ghaly (1999) reportan una velocidad de crecimiento de 0.21 h^{-1} cuando inocularon una concentración de 7.13 log UFC/mL e incubaron a una temperatura controlada de 37 °C, usando permeado de suero como medio de cultivo. Este valor es similar al que se obtuvo cuando se inocularon 5.7 log UFC/mL pero es más bajo que el obtenido cuando se inoculó una concentración mayor; esta diferencia puede deberse a las condiciones iniciales del permeado de suero que ellos usaron como medio de cultivo, el cual tenía un pH inicial menor (4.9) que el del PLD (6.7). Por otra parte, Torino *et al.* (2005) reportaron una velocidad de crecimiento de 0.5 h^{-1} usando leche descremada como medio de cultivo, la cual es mayor a las encontradas; y puede deberse a la diferencia de nutrientes (principalmente de nitrógeno y carbono) entre ambos medios de cultivo.

Para este medio de cultivo (PLD), la velocidad con la que disminuye el pH del medio también cambia dependiendo de la concentración inoculada; cuando se inoculó con la concentración más alta, se observó que el pH del medio disminuyó con mayor rapidez y que el valor obtenido después de 48 horas fue el más bajo (Figura 10). Al inocular la concentración mayor (6.7 log UFC/mL) la velocidad de crecimiento es mayor, y por lo tanto, se produce una mayor cantidad de ácido láctico como producto del metabolismo, haciendo que el pH disminuya con mayor rapidez; en el caso contrario, al inocular una menor concentración, la velocidad de

crecimiento es menor, se produce una menor concentración de ácido láctico y el pH del medio disminuye con mayor lentitud. También se observa en la Figura 10 que el pH final es diferente para cada concentración inoculada, lo que puede sugerir que el crecimiento de *L. helveticus* se detuvo cuando se agotaron los nutrientes presentes en el medio de cultivo, lográndose alcanzar el pH inhibitorio únicamente al inocular 6.7 log UFC/mL.

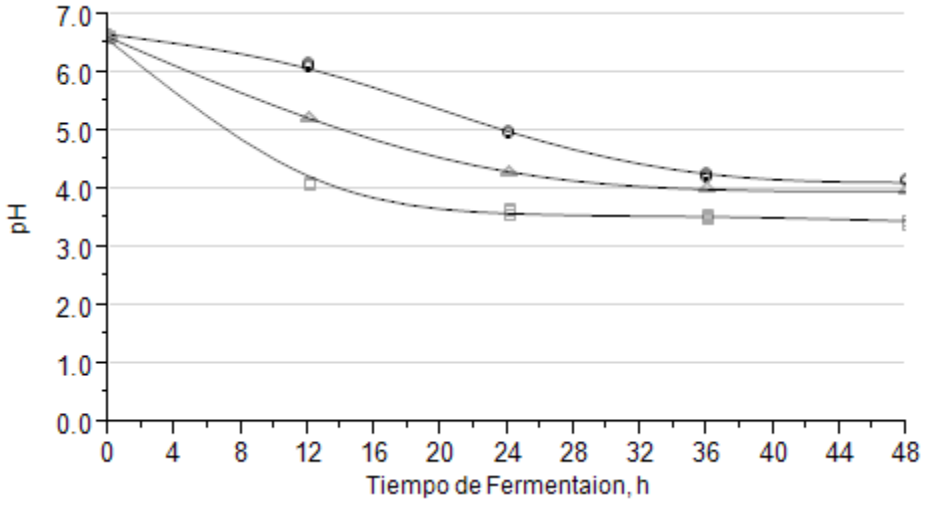


Figura 10. Disminución del pH del PLD por efecto del crecimiento de *L. helveticus* a 37 °C; inoculando 7.3 log UFC/mL (□), 6.3 log UFC/mL (△) y 5.3 log UFC/mL (○).

Para corroborar si el bajo crecimiento de *L. helveticus* observado en los resultados anteriores se debe a que el PLD no cuenta con los nutrientes necesarios para el desarrollo de esta bacteria y no a las condiciones en las que se llevó a cabo la fermentación, se evaluó el crecimiento de esta bacteria usando como medio de cultivo un medio ideal para el desarrollo de *Lactobacillus*, como lo es el caldo MRS, y manteniendo las mismas condiciones de fermentación.

En la Figura 11 se muestran las curvas de crecimiento de *L. helveticus* cuando se usa caldo MRS como medio de cultivo, inoculando diferentes concentraciones e incubando a 37 °C. La duración de la fase lag varía con las diferentes concentraciones inoculadas, observando que esta fase fue más corta cuando se inoculó la concentración más alta; esta fase tuvo una duración de 3 horas cuando se inoculó la mayor concentración (6.7 log UFC/mL), de 6 horas para la segunda concentración (5.7 log UFC/mL) y de 10 horas cuando se inoculó la más

baja (4.7 log UFC/mL). También se puede observar que la fase lag fue más corta comparada con los valores obtenidos con PLD, esto se debe a que la activación de la cepa se realizó en caldo MRS, y al volver a inocular en el mismo medio las bacterias ya se encuentran adaptadas a los nutrientes presentes. Los parámetros cinéticos obtenidos para este medio de cultivo se muestran en el

Cuadro 7, donde se puede observar que la velocidad de crecimiento y el crecimiento máximo disminuyeron cuando se aumentó la concentración de inóculo. Se obtuvo la mayor velocidad de crecimiento y el mayor crecimiento máximo cuando se inocularon 4.7 log UFC/mL, pero el tiempo en alcanzar la fase estacionaria fue mayor.

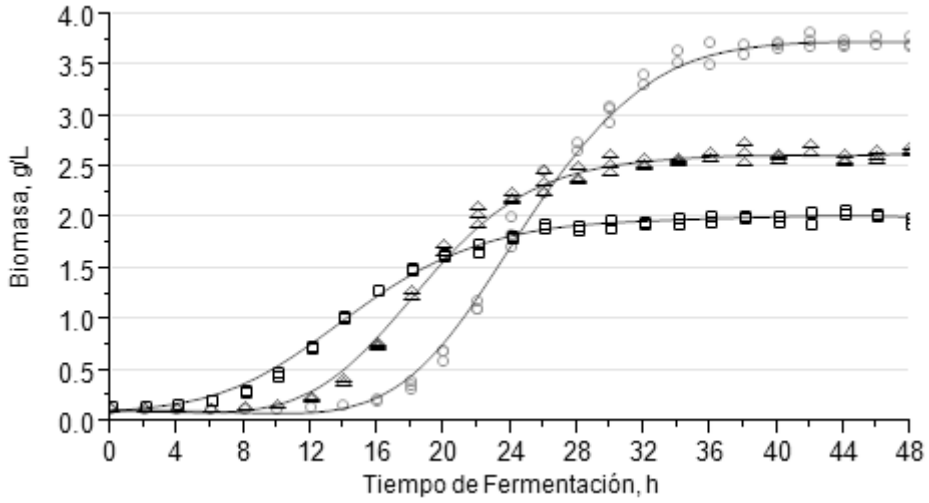


Figura 11. Curvas de crecimiento de *L. helveticus* a 37 °C en caldo MRS; inoculando 6.7 log UFC/mL (□), 5.7 log UFC/mL (△) y 4.7 log UFC/mL (○).

Cuadro 7. Parámetros cinéticos estimados mediante el modelo logístico, para el crecimiento de *L. helveticus* a 37 °C usando caldo MRS como medio de cultivo

Concentración Inoculada	x_0	x_{max}	μ_{max}	t_{Xmax}	R^2
6.7 log UFC/mL	0.07 ± 0.02	2.00 ± 0.01	0.28 ± 0.01	14.34 ± 0.18	0.996
5.7 log UFC/mL	0.08 ± 0.02	2.59 ± 0.01	0.36 ± 0.01	18.72 ± 0.11	0.996
4.7 log UFC/mL	0.07 ± 0.02	3.71 ± 0.02	0.32 ± 0.01	24.73 ± 0.10	0.997

Datos expresados como la media ± error estándar. Parámetros estimados a partir de 3 réplicas independientes. x_0: biomasa inicial (g/L), x_{max}: crecimiento máximo (g/L), μ_{max}: velocidad de crecimiento (h^{-1}) y t_{Xmax}: tiempo necesario para alcanzar el crecimiento máximo (h).

Las velocidades de crecimiento obtenidas fueron menores a las reportadas por Hebert *et al.* (2000), quienes alcanzan una velocidad de crecimiento de 0.48 h^{-1} usando caldo MRS como medio de cultivo. Esta diferencia puede deberse a que ellos usaron una temperatura mayor (40 °C), siendo ésta más cercana a la temperatura óptima de crecimiento (42 °C) de *L. helveticus*. Esto en concordancia a lo observado por Tango y Ghaly (1999), quienes encontraron que la velocidad de crecimiento es mayor cuando se usa una temperatura de 42 °C que cuando se usa una de 37 °C. Sin embargo, se eligió trabajar con la temperatura de 37 °C debido a que ésta es la temperatura óptima reportada en la ficha técnica de *L. helveticus* ATCC® 15009 publicada en el sitio web de ATCC® (American Type Culture Collection). Por otro lado, Gätje y Gottschalk (1991) reportaron una velocidad de crecimiento de 0.35 h^{-1} cuando usan caldo MRS adicionado con 2% de lactosa como medio de cultivo e incuban a una temperatura de 37 °C; resultados similares a los encontrados en este experimento cuando se inocularon 5.7 y 4.7 log UFC/mL.

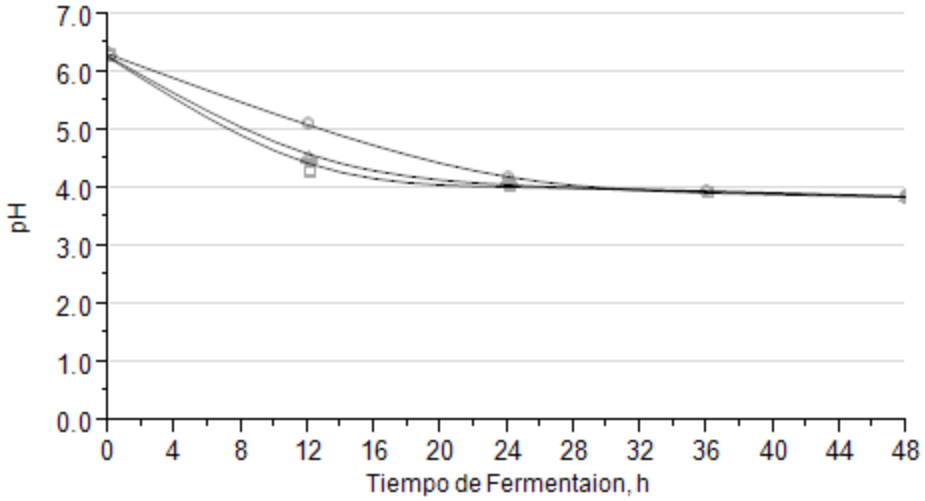


Figura 12. Disminución del pH del caldo MRS por efecto del crecimiento de *L. helveticus* a 37 °C; inoculando 7.3 log UFC/mL (□), 6.3 log UFC/mL (△) y 5.3 log UFC/mL (○).

Respecto a la velocidad de acidificación del medio, al inocular una concentración mayor, el medio de cultivo de acidifica más rápido debido a la mayor producción de ácido láctico, y por lo tanto el pH del medio disminuye con mayor rapidez, como se observa en la Figura 12. Esto implica que el pH del medio se

acerca rápidamente al pH inhibitorio para esta bacteria, haciendo que la velocidad de crecimiento disminuya y que el valor de crecimiento máximo sea menor. En la Figura 12 también se puede observar que el pH después de 48 horas de fermentación fue el mismo para las tres concentraciones inoculadas, lo cual sugiere que el crecimiento de *L. helveticus* se detuvo debido a la disminución del pH del medio y no debido al agotamiento de nutrientes, como fue en el caso de PLD. Esto concuerda con lo reportado por Venkatesh *et al.* (1993), quienes obtuvieron la máxima velocidad de crecimiento cuando el pH del medio es de 5.8 y que la misma disminuye hasta cero cuando el pH se encuentra debajo 3.5 o arriba 8.0.

Después de 48 horas de incubación, el valor de crecimiento máximo obtenido con el caldo MRS fue de 3.71 g/L y el valor obtenido con PLD fue de 1.19 g/L (Cuadro 6 y Cuadro 7); siendo el primero 3.1 veces mayor que el segundo. Esta diferencia obtenida entre ambos medios de cultivo indica que el PLD no es un buen medio de cultivo para el crecimiento de *L. helveticus*, posiblemente por la baja concentración de nitrógeno en PLD (0.59 g/L) y a que las proteínas presentes en este medio son difíciles de hidrolizar y por lo tanto la bacteria no puede usarlas como fuente de nitrógeno. Amrane y Prigent (1998) y Kulozik y Wilde (1999) reportan que el valor de crecimiento máximo aumenta al suplementar el medio con extracto de levadura; cuando suplementaron permeado de suero con 5 g/L de extracto de levadura e incubaron a 42 °C, obtuvieron valores de crecimiento máximo entre 1.8 y 4 g/L. Sin embargo, se tomó la decisión de no agregar extracto de levadura al PLD para mejorar el crecimiento de *L. helveticus* debido al fuerte sabor a levadura que aporta, el cual no es agradable al paladar y puede afectar negativamente el sabor de la bebida a formular.

Las curvas de acidificación (Figura 13) comparan como disminuye el pH y aumenta la acidez del medio en relación a las fases de crecimiento. La disminución del pH del medio está asociada a la producción de ácido láctico como producto del metabolismo de degradación de la lactosa. Después de 24 horas se obtuvo un pH de 4.01 ± 0.003 y una acidez expresada como ácido láctico de 2.75 ± 0.25 g/L, cuando se inoculó una concentración de 6.7 log UFC/mL. Gatti *et al.* (1999) reportan

que obtuvieron un pH de 3.94 cuando fermentaron leche descremada con *L. helveticus* durante 24 horas a 42 °C. Chiarini *et al.* (1992), por su parte, reportan que la concentración máxima de ácido láctico es de 2.73 g/L cuando inocularon *L. helveticus* al 1% en permeado de suero.

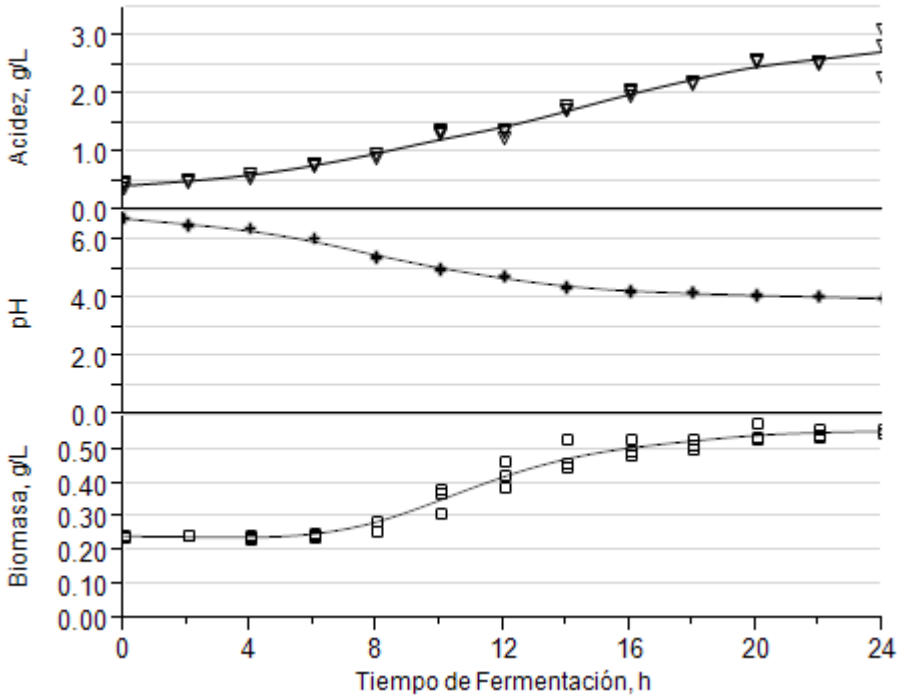


Figura 13. Curva de crecimiento de *L. helveticus* a 37 °C y su efecto sobre el pH y la acidez del PLD (□ biomasa, + pH y ▽ acidez).

Además, como se esperaba, la disminución del pH y el aumento de la acidez dependen de la fase de crecimiento de la bacteria; durante la fase de crecimiento exponencial se observó una mayor velocidad de disminución del pH, la cual disminuye cuando la bacteria alcanza la fase estacionaria. Esto concuerda con lo reportado por Luedeking y Piret (1959), quienes encontraron que la producción de ácido láctico se considera acoplada parcialmente al crecimiento. Así mismo, Tango y Ghaly (1999) reportan una taza de producción de ácido láctico diferente para cada fase de crecimiento, siendo de 0.22 g/L durante la fase lag, 3.52 g/L durante la frase de crecimiento exponencial y de 2.28 g/L durante la fase estacionaria; demostrando que el ácido láctico es producido principalmente por un

mecanismo acoplado al crecimiento, sin embargo, cuando el pH del medio es bajo éste es producido por el mecanismo de mantenimiento de las células. También, Gätje y Gottschalk (1991) reportaron que la producción de ácido láctico continúa hasta que el medio alcanza valores de pH entre 3.7 y 3.9 y la concentración de ácido láctico sin disociar es de 50 – 60 mM; encontrándose que en este caso el pH del medio continúa hasta llegar a valores de alrededor de 4.0.

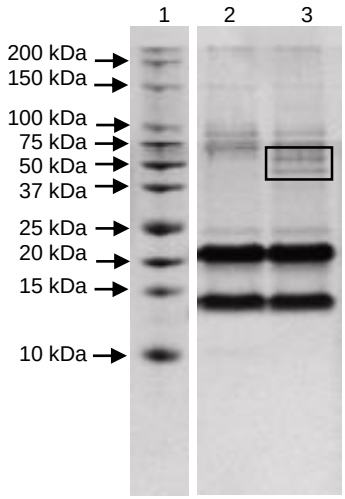


Figura 14. Electroforesis Tricine-SDS-Page, fermentación con *L. helveticus*. Línea 1: marcador de peso molecular, línea 2: PLD antes de la fermentación, línea 3: PLD después de 24 horas de fermentación.

El consumo de las proteínas lácteas presentes en PLD como fuente de nitrógeno para el crecimiento de *L. helveticus* se evaluó usando la técnica de electroforesis, y los resultados se muestran en la Figura 14. El PLD (línea 2) muestra 5 bandas correspondientes a 5 proteínas lácteas: lacfoferrina (80 kDa), seroalbúmina bovina (69 kDa), caseína (19-25 kDa), β-lactoglobulina (18 kDa) y α-lactoalbúmina (14 kDa). Las líneas 2 y 3 corresponden al PLD antes y después de 24 horas de fermentación, cuando se compraran entre sí se puede observar que en la línea 5 aparecen 2 nuevas bandas de alrededor de 48 y 57 kDa cada una. Estas dos nuevas bandas probablemente son productos de la proteólisis de las proteínas de mayor peso molecular (bandas superiores) debido a la actividad de las proteasas de *L. helveticus*.

Estos resultados demuestran que *L. helveticus* es capaz de hidrolizar las proteínas presentes en PLD pero en cantidades pequeñas, y esto podría explicar los valores bajos de crecimiento máximo observado en este medio de cultivo. Hebert et al. (2000) también estudiaron la capacidad de *L. helveticus* para hidrolizar proteínas lácteas, estudiando únicamente α-, β- 7 κ-caseína, y encontraron que las proteinasas de *L. helveticus* hidrolizan α- y β-caseína predominantemente; y que el grado de hidrólisis es menor cuando se usan medios de cultivo ricos en péptidos, como el caldo MRS y medios suplementados con 1 % de casitona (digestión pancreática de caseínas).

Cuadro 8. Grado de hidrólisis de las proteínas del PLD por efecto de la fermentación con *L. helveticus* a 37 °C

Parámetro	Cantidad
Grado de Hidrólisis, 0 horas	2.89 ± 0.45%
Grado de Hidrólisis, 24 horas	9.87 ± 0.07%

Datos expresados como la media ± error estándar. Determinaciones con tres réplicas cada uno.

Para poder cuantificar la hidrólisis de proteínas observada en la electroforesis se calculó el porcentaje de grado de hidrólisis al inicio y después de 24 horas de fermentación, obteniendo un grado de hidrólisis de 9.87% (Cuadro **8**). Este resultado es menor a los obtenidos por Guo *et al.* (2009) y Vermeirssen *et al.* (2003), quienes reportaron un grado de hidrólisis del 12% y 15% en las proteínas del suero después de fermentar con *L. helveticus*; este bajo valor obtenido puede estar relacionado con el bajo crecimiento de esta bacteria en PLD debido a la falta de nutrientes. De cualquier manera, Guo *et al.* (2009) encontraron que al tener grados de hidrólisis menores de 20% en las proteínas del suero, los péptidos formados presentaron una mayor actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina I.

6.1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

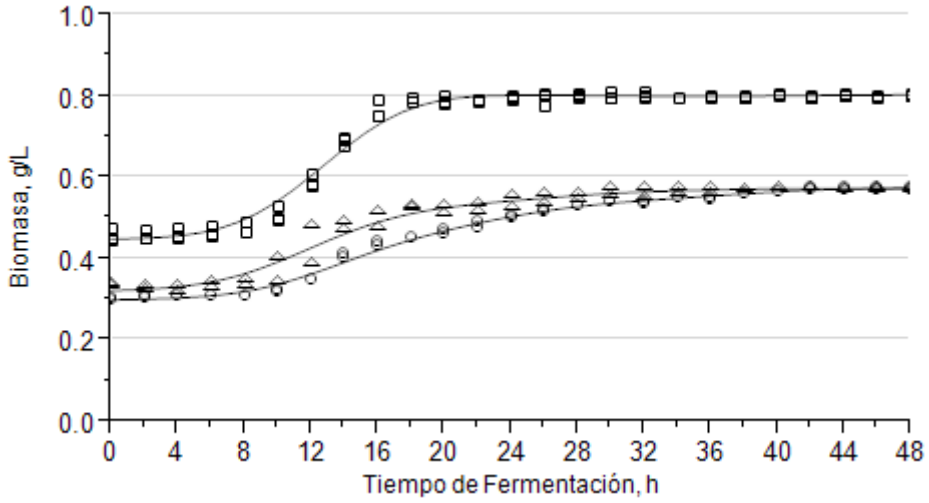


Figura 15. Curva de Crecimiento de *S. cerevisiae* a 37 °C en PLD; inoculando 6.2 log UFC/mL (□), 5.3 log UFC/mL (△) y 4.2 log UFC/mL (○).

Cuadro 9. Parámetros cinéticos estimados mediante el modelo logístico, para el crecimiento de *S. cerevisiae* a 37 °C usando PLD como medio de cultivo

Concentración Inoculada	x_0	x_{max}	μ_{max}	t_{Xmax}	R^2
6.2 log UFC/mL	0.46 ± 0.01	0.80 ± 0.01	0.63 ± 0.03	12.75 ± 0.08	0.995
5.2 log UFC/mL	0.31 ± 0.01	0.57 ± 0.01	0.30 ±0.04	12.89 ± 0.53	0.963
4.2 log UFC/mL	0.28 ± 0.01	0.57 ± 0.01	0.18 ± 0.01	16.65 ± 0.46	0.988

Datos expresados como la media ± error estándar. Parámetros estimados a partir de 3 réplicas independientes. x_0: biomasa inicial (g/L), x_{max}: crecimiento máximo (g/L), μ_{max}: velocidad de crecimiento (h^{-1}) y t_{Xmax}: tiempo necesario para alcanzar el crecimiento máximo (h).

En la Figura 15 se muestran las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* usando PLD como medio de cultivo e inoculando tres concentraciones distintas. La fase lag fue similar para las tres concentraciones inoculadas, siendo de 8 – 9 horas. Los parámetros cinéticos estimados a partir del modelo logístico se muestran en el Cuadro 9, en donde se observó que éstos dependen de la concentración inoculada. La velocidad de crecimiento aumentó al aumentar el inóculo inicial, lo cual disminuyó el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria; y además, se obtuvo un valor mayor de crecimiento máximo. El mismo crecimiento máximo se obtuvo cuando se

inocularon 4.2 y 5.2 log UFC/mL, sin embargo obtuvieron diferentes velocidades de crecimiento en cada uno y tomó más tiempo alcanzar el crecimiento máximo cuando se inocularon 4.2 log UFC/mL.

Estos parámetros cinéticos estimados muestran que *S. cerevisiae* crece en muy pequeñas cantidades en este medio de cultivo, lo cual puede deberse a que la principal fuente de carbono en este medio es lactosa. Esto corresponde con lo reportado por Dickson (1980) y Ostergaard *et al.* (2002), quienes reportan que esta levadura no es capaz de crecer en un medio cuya única fuente de carbono es la lactosa; ya que no posee el sistema necesario para permear la lactosa al interior de la célula, ni la enzima β–galactosidasa que es la responsable de hidrolizar la lactosa en glucosa y galactosa. Así mismo, Domingues *et al.* (1999) reportaron que la actividad β–galactosidasa es cero en *S. cerevisiae* cuando se usa como medio de cultivo medio YNB + 2% lactosa a una temperatura de 30 °C.

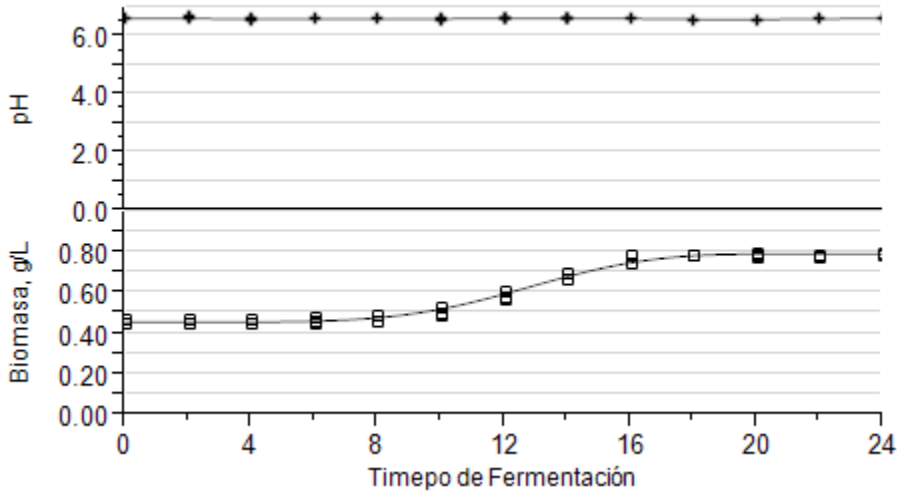


Figura 16. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* a 37 °C y su efecto sobre el pH del PLD (□ biomasa, + pH).

En la Figura 16 se muestra el valor de pH del PLD durante las primeras 24 horas de fermentación con *S. cerevisiae*, en donde se puede observar que éste se mantiene constante en un valor alrededor de 6.64. En este caso, no se observa disminución del pH debido a que esta levadura no produce ácido láctico como producto de la fermentación, ya que el piruvato es convertido a acetaldehído por la

acción de la piruvato descarboxilasa y posteriormente a etanol (Porro *et al.*, 1995). Esto concuerda con lo reportado por Vermeirssen *et al.* (2003), quienes encontraron que el pH final del medio de cultivo fue de 6.1 cuando usaron un medio compuesto por proteínas de suero y glucosa e incubaron a 37 °C.

Cuadro 10. Concentración de etanol, dióxido de carbono y grado de hidrólisis en PLD después de 24 horas de fermentación a 37 °C con *S. cerevisiae*

Parámetro	**Cantidad**
Etanol	0.81 ± 0.02 g/L
Dióxido de Carbono	0.20 ± 0.02 g/L
Grado de Hidrólisis, 0 horas	2.89 ± 0.45%
Grado de Hidrólisis, 24 horas	5.63 ± 0.65%

Datos expresados como la media ± error estándar. Determinaciones con tres réplicas cada uno.

Después de 24 horas se midió la concentración de etanol y CO_2 producido, así como el grado de hidrólisis de las proteínas presentes, obteniendo valores de 0.81 g/L, 0.20 g/L y 5.63% respectivamente (Cuadro 10); estos valores bajos se relacionan con el hecho de que *S. cerevisiae* no es capaz de metabolizar la lactosa, la cual es la única fuente de carbono en el PLD.

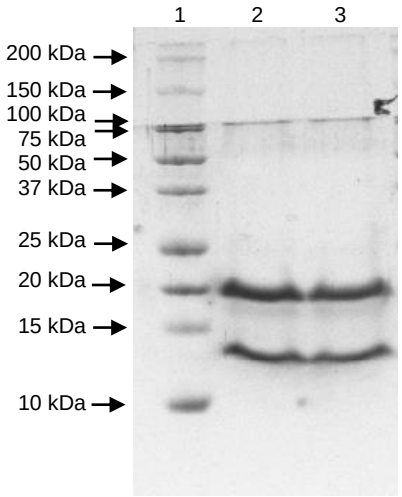


Figura 17. Electroforesis Tricine-SDS-Page, fermentación con *S. cerevisiae*. Línea 1: marcador de peso molecular, línea 2: PLD antes de la fermentación, línea 3: PLD después de 24 horas de fermentación

Para verificar la hidrólisis de las proteínas se realizó una electroforesis SDS PAGE y los resultados se muestran en la Figura 17. La línea 1 corresponde al marcador de peso molecular, y las líneas 2 y 3 al PLD andes y después de 24 horas de fermentación. Al comparar ambas líneas se observan las mismas 3 bandas en ambas líneas, la primera correspondiente a la lactoferrina (80 kDa), la segunda a la β–lactoglobulina (18 kDa) y la tercera a la α–lactoalbúmina (14 kDa). Lo cual corresponde al bajo valor de 5.63% obtenido con el método OPA para el grado de hidrólisis de las proteínas presentes.

Para corroborar si el bajo crecimiento de *S. cerevisiae* observado en los resultados anteriores se debe a que el PLD no cuenta con otra fuente de carbono además de la lactosa y no a las condiciones en las que se llevó a cabo la fermentación, se evaluó el crecimiento de esta levadura usando como medio de cultivo el caldo YDP, manteniendo las mismas condiciones de fermentación.

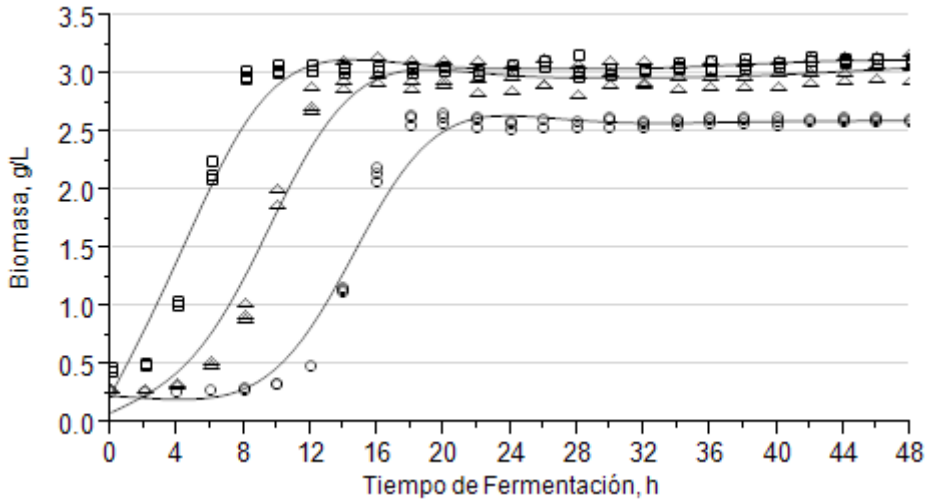


Figura 18. Curva de Crecimiento de *S. cerevisiae* a 37°C en Caldo YPD; inoculando 6.2 log UFC/mL (□), 5.3 log UFC/mL (△) y 4.2 log UFC/mL (○).

En la Figura 18 se muestras las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* cuando se usa como medio de cultivo caldo YPD, inoculando distintas concentraciones e incubando a 37 °C. La fase lag fue de 2 horas cuando se inocularon 6.2 UFC/mL, de 4 cuando se inocularon 5.2 log UFC/mL y de 9 cuando se inocularon 4.2 UFC/mL; por lo que la duración de esta fase aumenta al disminuir

la concentración de inóculo. Además, estos valores también son menores a los reportados cuando se usó PLD como medio de cultivo, esto debido a que se usó caldo YPD para la activación de la cepa, y por lo tanto, ésta ya está adaptada a los nutrientes presentes en este caldo. Los parámetros cinéticos estimados a partir del modelo logístico se muestran en el Cuadro 11, los cuales varían dependiendo de la concentración inoculada; obteniendo los mayores valores de crecimiento máximo cuando se inocularon 6.2 y 5.2 log UFC/mL, además de que se alcanzan en menor tiempo de fermentación que cuando se inocularon 4.2 log UFC/mL. Estos resultados demuestran que esta levadura si es capaz de desarrollarse bajo estas condiciones de fermentación y que el problema es que con PLD únicamente se tiene lactosa como fuente de carbono.

Cuadro 11. Parámetros cinéticos estimados mediante el modelo logístico, para el crecimiento de *S. cerevisiae* a 37 °C usando caldo YPD como medio de cultivo

Concentración Inoculada	x_0	x_{max}	μ_{max}	t_{Xmax}	R^2
6.2 log UFC/mL	0.44 ± 0.01	3.08 ± 0.02	1.00 ± 0.03	5.29 ± 0.04	0.996
5.2 log UFC/mL	0.30 ± 0.03	3.00 ± 0.01	0.82 ± 0.05	9.44 ± 0.09	0.992
4.2 log UFC/mL	0.27 ± 0.01	2.60 ± 0.01	0.97 ± 0.03	14.52 ± 0.03	0.998

Datos expresados como la media ± error estándar. Parámetros estimados a partir de 3 réplicas independientes. x_0: biomasa inicial (g/L), x_{max}: crecimiento máximo (g/L), μ_{max}: velocidad de crecimiento (h^{-1}) y t_{Xmax}: tiempo necesario para alcanzar el crecimiento máximo (h).

Garay-Arroyo *et al.* (2003) reportan un valor de crecimiento máximo de 4.2 g/L y una velocidad de crecimiento de 0.34 h^{-1} usando YDP como medio de cultivo e incubando a 30 °C. Estos valores difieren de los valores encontrados debido a que la temperatura de 30 °C es una temperatura óptima para el crecimiento de *S. cerevisiae*; sin embargo, se decidió evaluar su crecimiento a 37 °C debido a que ésta será la temperatura que se usará para elaborar la bebida, y además, está reportado por Lin *et al.* (2012) que al incubar entre 30 y 45 °C se obtienen las mayores velocidades de crecimiento y la producción de etanol más alta.

6.1.3. *Kluyveromyces marxianus* ssp. *marxianus*

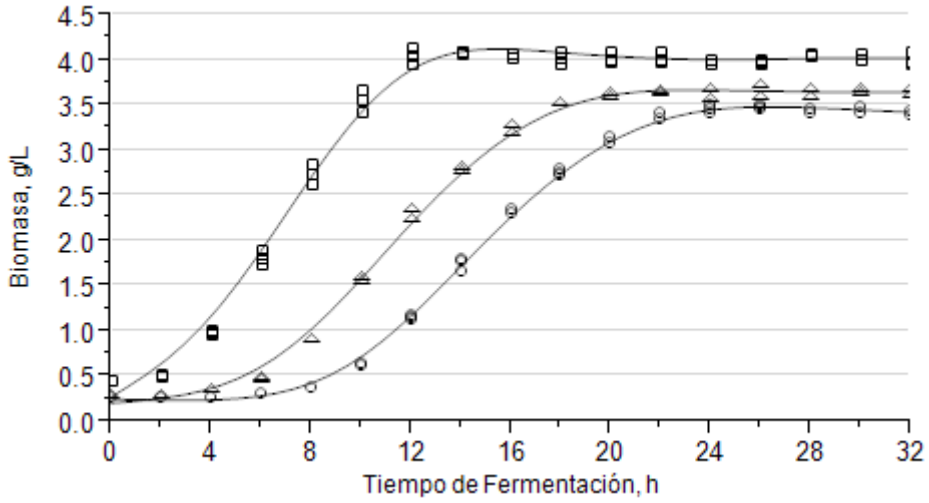


Figura 19. Curva de crecimiento de *K. marxianus* a 37 °C en PLD; inoculando 6.6 log UFC/mL (□), 5.6 log UFC/mL (△) y 4.6 log UFC/mL (○).

En la Figura 19 se muestran las curvas de crecimiento de *K. marxianus* cuando se inoculan diferentes concentraciones, usando el PLD como medio de cultivo e incubando a 37 °C. La duración de la fase lag disminuye al aumentar la concentración de inóculo, se obtuvieron valores de 1, 3 y 7 horas cuando se inocularon 6.6, 5.6 y 4.6 log UFC/mL. Los parámetros cinéticos estimados a partir del modelo logístico se muestran en el Cuadro 12, y muestran ser dependientes de la concentración inoculada. Al inocular 6.6 log UFC/mL se obtuvo una mayor velocidad de crecimiento, se alcanzó en menor tiempo la fase estacionaria y se obtuvo el mayor valor de crecimiento máximo; y el comportamiento contario se observó con la menor concentración inoculada. Esto se puede deber a que el PLD cuenta con los nutrientes necesarios para el desarrollo de esta levadura; y a que inocular una mayor concentración de células, el número de las mismas aumenta rápidamente, y por lo tanto, alcanzan un mayor de valor de crecimiento máximo antes de que se agoten los nutrientes o de ser inhibido por los metabolitos producidos.

Cuadro 12. Parámetros cinéticos estimados por medio del modelo logístico, para el crecimiento de *K. marxianus* a 37 °C usando PLD como medio de cultivo

Concentración Inoculada	x_0	x_{max}	μ_{max}	t_{Xmax}	R^2
6.6 log UFC/mL	0.38 ± 0.04	4.05 ± 0.01	0.60 ± 0.02	6.83 ± 0.08	0.996
5.6 log UFC/mL	0.21 ± 0.03	3.66 ± 0.08	0.43 ± 0.01	11.16 ± 0.08	0.998
4.6 log UFC/mL	0.21 ± 0.01	3.47 ± 0.01	0.40 ± 0.01	14.46 ± 0.06	0.998

Datos expresados como la media ± error estándar. Parámetros estimados a partir de 3 réplicas independientes. x_0: biomasa inicial (g/L), x_{max}: crecimiento máximo (g/L), μ_{max}: velocidad de crecimiento (h^{-1}) y t_{Xmax}: tiempo necesario para alcanzar el crecimiento máximo (h).

Longhi *et al.* (2004) reportan una velocidad de crecimiento de 0.60 h^{-1} cuando usan suero en polvo reconstituido suplementado con 5% de extracto de levadura e incuban a 38°C; así mismo, Belem y Lee (1999) reportan una velocidad de crecimiento de 0.63 h^{-1} cuando usan permeado de suero como medio de cultivo e incuban a 30°C. Valores similares fueron encontrados cuando se inocularon 6.6 log UFC/ml, y esto concuerda con lo reportado por Rech *et al.* (1999) quienes encontraron que no hay diferencia en los parámetros cinéticos cuando se usan temperaturas de 30 y 37°C. Silveira *et al.* (2005) reportan un crecimiento máximo de 3.64 g/L cuando usan permeado de suero como medio de cultivo e incuban a 30°C, y valores similares fueron obtenidos cuando se inocularon 5.6 log UFC/mL.

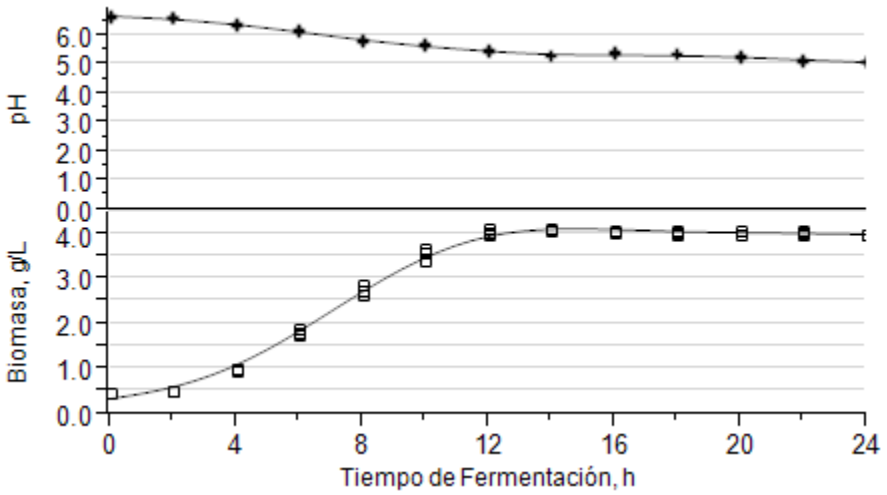


Figura 20. Curva de crecimiento de *K. marxianus* a 37°C y su efecto sobre el pH del PLD (□ biomasa, + pH).

En la Figura 20 se muestra cómo disminuye el pH del medio durante las primeras 24 horas de fermentación; en donde se observó que el pH final fue de 5.11 ± 0.02. En este caso, la disminución en el pH del medio se puede deber a la producción de ácido láctico, ácido acético y/o ácido propiónico, los cuales se forman en pequeñas cantidades, y por lo tanto, el pH disminuye levemente. Plessas *et al.* (2008) reportan una concentración de ácido láctico de 3.4 g/L después de fermentar suero diluido (36 g/L lactosa) con *K. marxianus* a una temperatura de 37°C. Así mismo, Roostita y Fleet, (1996) reportan la producción de ácido acético (0.40 mg/L) y propiónico (0.25 mg/L) además de ácido láctico cuando se usa leche como medio de cultivo y se lleva a cabo la fermentación a 25 °C.

Cuadro 13. Concentración de etanol, dióxido de carbono y grado de hidrólisis en PLD después de 24 horas de fermentación a 37 °C con *K. marxianus*

Parámetro	**24 horas**
Etanol	3.81 ± 0.07 g/L
Dióxido de Carbono	1.66 ± 0.11 g/L
Grado de Hidrólisis, 0 horas	2.89 ± 0.45%
Grado de Hidrólisis, 24 horas	6.58 ± 0.28%

Datos expresados como la media ± error estándar. Determinaciones con tres réplicas cada uno.

Se evaluaron otros productos del metabolismo de *K. marxianus*, obteniendo una concentración final de 3.81 g/L de etanol y 1.66 g/L de CO_2 (Cuadro 13). Estos compuestos son producto del metabolismo de fermentación anaeróbica de esta levadura; sin embargo, los valores encontrados son inferiores a los reportados, posiblemente debido a que el pH del medio se mantiene por encima de 6.0 durante las primas 6 horas de fermentación, lo cual disminuye la producción de etanol. Esto en concordancia con lo reportado por Kourkoutas *et al.* (2002), quienes encontraron que la producción de etanol es de 1 – 2 g/L cuando el pH del medio es de 6.0 y que aumenta hasta 6 g/L cuando el pH se mantiene en 5.5.

El grado de hidrólisis de las proteínas lácteas presentes en PLD también se evaluó, obteniendo un 6.58 % de hidrólisis después de 24 horas de fermentación (Cuadro 13). Además de se realizó una electroforesis para observar el cambio en

cada una de las proteínas presentes (Figura 21); al comparar las líneas 2 y 3 (antes y después de la fermentación) se observa que la primer banda (correspondiente a la β–lactoglobulina) disminuye de intensidad y en la línea 3 se observa una nueva banda de aproximadamente 12 kDa. Esto concuerda con lo reportado por (Hamme et al., 2009), quienes encontraron que *K. marxianus* excreta proteasas capaces de hidrolizar β–lactoglobulina y que la α–lactoalbúmina es más susceptible a degradación en pH ácido.

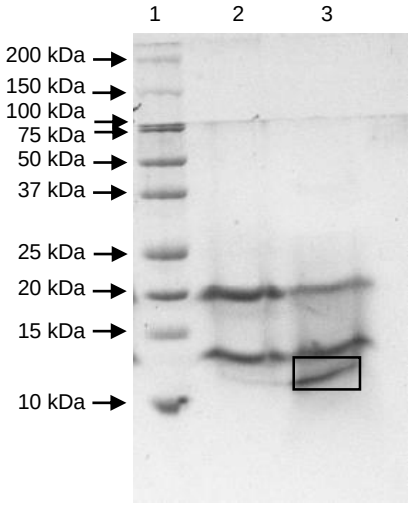


Figura 21. Electroforesis Tricine-SDS-Page, fermentación con *K. marxianus*. Línea 1: marcador de peso molecular, línea 2: PLD antes de la fermentación, línea 3: PLD después de 24 horas de fermentación.

Para determinar si el crecimiento máximo obtenido en PLD es similar al obtenido en un medio ideal para el crecimiento de *K. marxianus*, se realizaron las curvas de crecimiento de esta levadura usando caldo YDP como medio de cultivo, manteniendo las mismas condiciones de fermentación. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 22, en donde se observa que la duración de la fase lag fue similar a la obtenida en PLD para las tres concentraciones inoculadas. Se estimaron los parámetros cinéticos mediante el modelo logístico y los datos obtenidos se muestran en el Cuadro 14; se observó que el crecimiento máximo aumentó y el tiempo necesario para alcanzar éste valor disminuyó al aumentar la concentración de inóculo, sin embargo la velocidad de crecimiento no presentó ninguna tendencia.

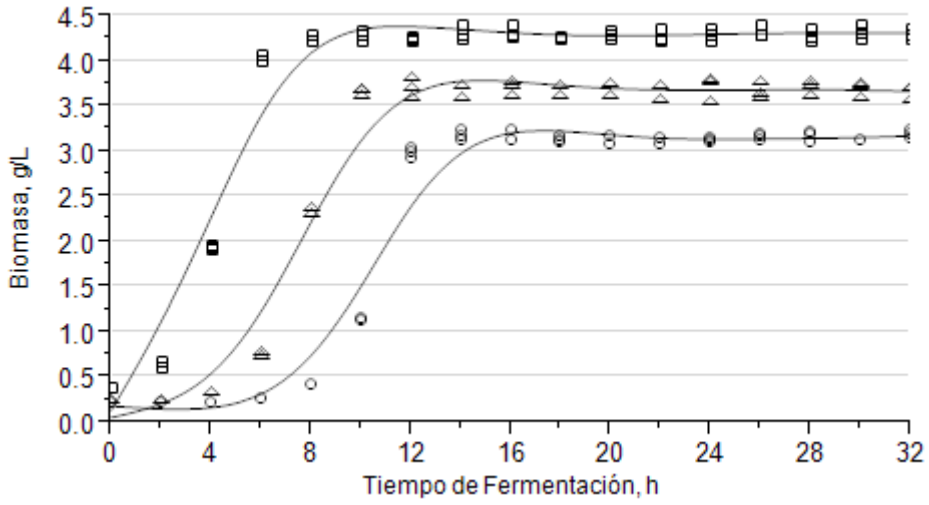


Figura 22. Curva de crecimiento de *K. marxianus* a 37 °C en Caldo YPD; inoculando 6.6 log UFC/mL (□), 5.6 log UFC/mL (△) y 4.6 log UFC/mL (○).

En comparación a los valores obtenidos cuando se usó PLD como medio de cultivo, se puede observar que los obtenidos con YPD son mayores; estos incrementos en la velocidad de crecimiento y en el crecimiento máximo se pueden deber a que el caldo YPD contiene una mayor concentración de nitrógeno (3 g/L en comparación a 0.59 g/L en PLD), además ese nitrógeno se encuentra más disponible al ser péptidos o aminoácidos y no proteínas complejas como en PLD.

Cuadro 14. Parámetros cinéticos estimados por medio del modelo logístico, para el crecimiento de *K. marxianus* a 37°C usando caldo YPD como medio de cultivo

Concentración Inoculada	x_0	x_{max}	μ_{max}	t_{Xmax}	R^2
6.6 log UFC/mL	0.45 ± 0.03	4.30 ± 0.01	1.49 ± 0.06	4.29 ± 0.03	0.998
5.6 log UFC/mL	0.27 ± 0.03	3.70 ± 0.04	1.21 ± 0.06	7.61 ± 0.03	0.997
4.6 log UFC/mL	0.26 ± 0.01	3.15 ± 0.01	1.72 ± 0.08	10.46 ± 0.03	0.998

Datos expresados como la media ± error estándar. Parámetros estimados a partir de 3 réplicas independientes. x_0: biomasa inicial (g/L), x_{max}: crecimiento máximo (g/L), μ_{max}: velocidad de crecimiento (h^{-1}) y t_{Xmax}: tiempo necesario para alcanzar el crecimiento máximo (h).

Plessas *et al.* (2008) reportan que al aumentar la concentración de lactosa y proteína en suero, el crecimiento máximo aumenta de 3.6 a 4.6 g/L. Por otra parte,

Rech *et al.* (1999) reportaron que el crecimiento máximo de *K. marxianus* en suero aumenta al suplementarlo con extracto de levadura o al hidrolizar enzimáticamente las proteínas lácteas presentes usando Alcasa®.

6.2. Establecer la mezcla de proporciones idóneas de bacterias ácido lácticas y levaduras

Para determinar la mezcla adecuada de bacterias y levaduras, para obtener los atributos fisicoquímicos deseables en una bebida se realizó un diseño experimental de mezclas, en donde los factores a evaluar fueron la concentración de cada uno de los microrganismos y las restricciones fueron las siguientes: concentración de *L. helveticus* 33 – 100%, concentración de *S. cerevisiae* 0 – 67% y concentración de *K. marxianus* 0 – 67%; los tratamientos evaluados se muestran en el Cuadro 15. Estas restricciones fueron escogidas debido a que al inocular al 3% en la medio (PLD + fibra de guayaba) equivalen a colocar 1 – 3% de bacterias ácido lácticas y 0 – 2% de levaduras; además, está reportado que con mezclas de 2.5 – 3% de bacterias ácido lácticas y 2% de levaduras se pueden producir bebidas a base de leche o de suero, con atributos sensoriales agradable (Assadi *et al.*, 2000; Assadi *et al.*, 2008).

Cuadro 15. Proporciones de cada microorganismo en cada uno de los tratamientos a evaluar en el diseño de mezclas

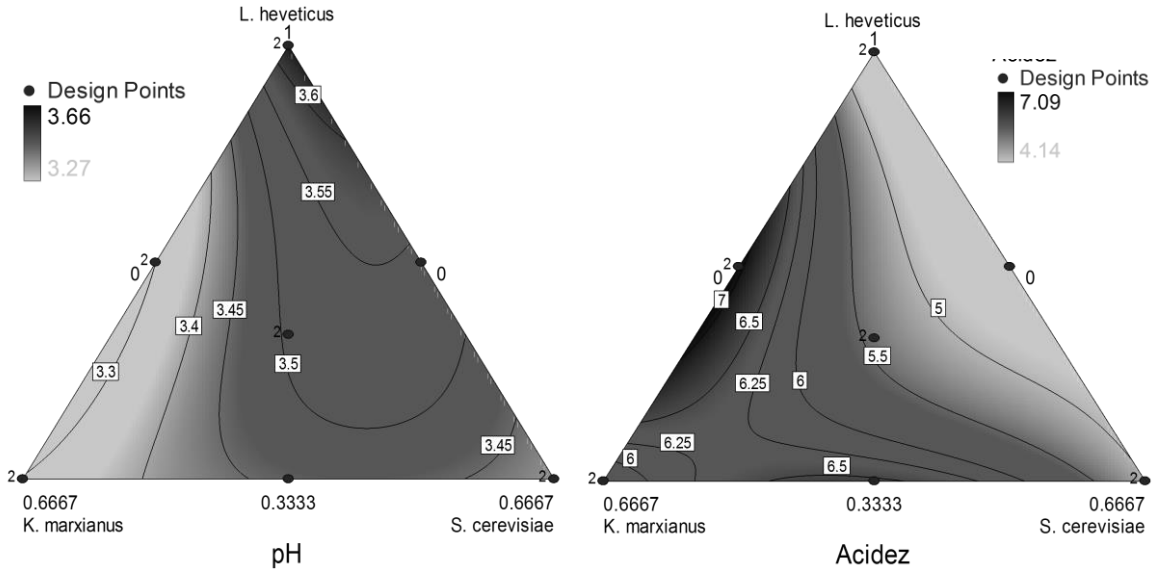
Tratamiento	***L. helveticus***	***K. marxianus***	***S. cerevisiae***
1	1/3	0	2/3
2	1/3	2/3	0
3	2/3	1/3	0
4	1	0	0
5	2/3	1/3	0
6	1/3	0	2/3
7	1/3	2/3	0
8	1/3	1/3	1/3
9	1	0	0
10	5/9	2/9	2/9
11	2/3	0	1/3
12	5/9	2/9	2/9

En cada uno de los tratamientos, las variables respuesta evaluadas fueron: pH, acidez titulable, etanol, dióxido de carbono, grado de hidrólisis de proteínas; y los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 16. Posteriormente, se ajustó y analizó un modelo de regresión a los datos obtenidos en las variables respuesta.

Cuadro 16. Resultados obtenidos para cada variable respuesta evaluada en los tratamientos con tres microorganismos en distintas proporciones

Trat.	pH	Acidez (g/L)	Etanol (g/L)	CO_2 (g/L)	%DH
1	3.51 ± 0.00	5.09 ± 0.05	0.14 ± 0.02	0.26 ± 0.02	9.74 ± 0.01
2	3.34 ± 0.02	5.74 ± 0.02	1.84 ± 0.11	1.41 ± 0.00	5.60 ± 0.00
3	3.30 ± 0.00	7.09 ± 0.07	2.18 ± 0.15	1.13 ± 0.00	5.25 ± 0.01
4	3.66 ± 0.01	4.14 ± 0.05	0.10 ± 0.01	0.32 ± 0.00	8.57 ± 0.02
5	3.30 ± 0.00	7.07 ± 0.09	2.21 ± 0.17	0.94 ± 0.00	5.50 ± 0.01
6	3.31 ± 0.01	4.97 ± 0.10	0.18 ± 0.03	0.36 ± 0.05	8.49 ± 0.00
7	3.27 ± 0.01	5.66 ± 0.02	1.90 ± 0.08	1.21 ± 0.00	5.16 ± 0.00
8	3.46 ± 0.00	6.55 ± 0.02	0.86 ± 0.04	1.12 ± 0.00	4.64 ± 0.00
9	3.62 ± 0.00	4.31 ± 0.08	0.16 ± 0.01	0.22 ± 0.03	7.76 ± 0.00
10	3.50 ± 0.00	5.40 ± 0.04	1.45 ± 0.01	1.22 ± 0.00	5.16 ± 0.00
11	3.54 ± 0.01	4.68 ± 0.06	0.15 ± 0.02	0.30 ± 0.01	10.45 ± 0.01
12	3.51 ± 0.00	5.44 ± 0.08	1.40 ± 0.03	1.44 ± 0.00	5.09 ± 0.00

Datos expresados como la media ± error estándar. Determinaciones con tres réplicas cada uno.

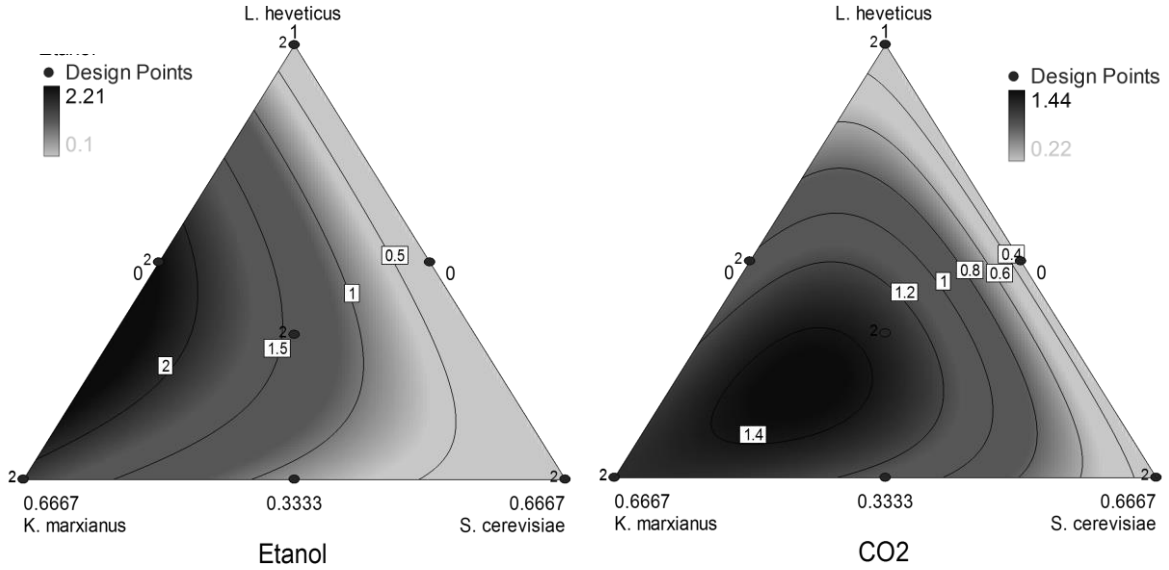


$$\mathrm{pH} = 3.64x_{Lh} + 3.31x_{Km} + 3.41x_{Sc} - 0.70x_{Lh}x_{Km}$$

$$\mathrm{Acidez} = 4.22x_{Lh} + 5.70x_{Km} + 5.02x_{Sc} + 8.46x_{Lh}x_{Km} + 4.74x_{Km}x_{Sc} - 28.46x_{Lh}x_{Km}x_{Sc}$$

Figura 23. Análisis de curvas de nivel de los modelos de regresión estimados para el pH y la acidez del PLD después de 24 horas de fermentación a 37 °C.

En la Figura 23 se muestra el análisis del modelo estimado para el pH y la acidez, observándose que cuando el pH disminuye y la acidez aumenta se debe al incremento la proporción de *K. marxianus* en la mezcla, siempre con la presencia de *L. helveticus*; obteniendo un pH mínimo de 3.27 y una acidez máxima de 7.09 g/L. Los cambios en estos atributos se deben principalmente a que *L. helveticus*, por ser una bacteria ácido láctica, es capaz de producir ácido láctico; y por lo tanto, disminuir el pH y aumentar la acidez del medio. Sin embargo, al combinar esta bacteria con *K. marxianus*, se obtienen valores aún más altos de acidez; esto se interpreta que es debido a que esta levadura también puede producir ácido láctico, ácido acético y/o ácido propiónico como productos de la fermentación.



$$\text{Etanol} = 0.13x_{Lh} + 1.87x_{Km} + 0.16x_{Sc} + 4.78x_{Lh}x_{Km} - 0.62x_{Km}x_{Sc} + 6.50x_{Lh}x_{Km}x_{Sc}$$

$$CO_2 = 0.27x_{Lh} + 1.31x_{Km} + 0.31x_{Sc} + 0.98x_{Lh}x_{Km} + 1.24x_{Km}x_{Sc}12.12x_{Lh}x_{Km}x_{Sc}$$

Figura 24. Análisis de curvas de nivel de los modelos de regresión estimados para la concentración etanol y el CO_2 obtenida después de 24 horas de fermentación a 37 °C

La concentración obtenida de etanol y CO_2 después de la fermentación de cada una de las mezclas se muestra las Figura 24. Estos compuestos son producto del metabolismo de fermentación de las levaduras presentes en la mezcla; sin embargo, se observa un mayor producción de éstos cuando se incrementa la

proporción de *K. marxianus* en la mezcla. Esto se debe a que esta levadura es capaz de utilizar la lactosa del medio como fuente de carbono, a diferencia de *S. cerevisiae*, y por lo tanto produce estos metabolitos en mayor cantidad.

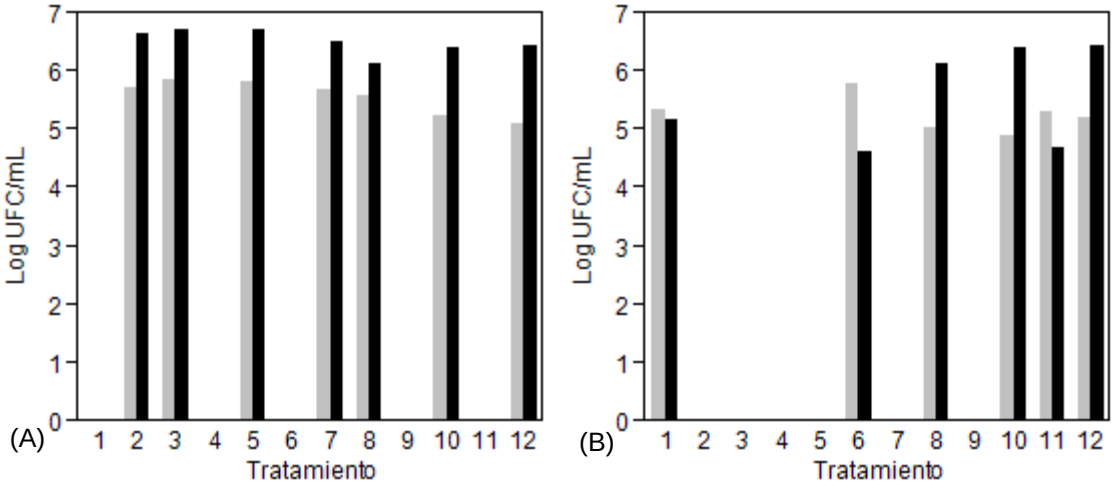
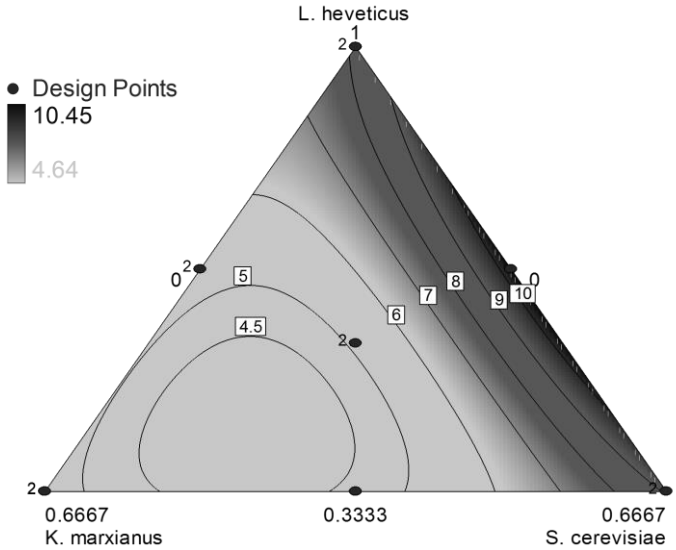


Figura 25. Concentración de *K. marxianus* (A) y *S. cerevisiae* (B) antes (■) y después (■) de 24 horas de fermentación a 37 °C.

Así mismo, se evaluó la concentración de las levaduras al inicio y al final de la fermentación (Figura 25). Se puede observar que en las mezclas fermentadas con *L. helveticus* y *S. cerevisiae* (Trat. 1, 6 y 11), la concentración de la levadura decrece en 0.5–1 log UFC/ml después de 24 horas; y en las mezclas fermentadas con *L. helveticus* y *K. marxianus* (Trat. 2, 3, 5 y 7), la concentración de la levadura aumenta en 1–1.5 log UFC/ml. Lo cual concuerda con lo observado anteriormente y que *K. marxianus* es el responsable de la producción de etanol y CO_2.

En la Figura 26 se muestra el cambio en el grado de hidrólisis de las proteínas lácteas presentes, respecto a la proporción de los microorganismos; se obtuvo que éste aumenta al reducir la proporción de *K. marxianus* en la mezcla. Estos resultados son contrarios a los esperados, ya que *K. marxianus* es capaz de degradar la β–lactoglobulina y esta proteína es la que se encuentra en mayor concentración; sin embargo, posiblemente podría haber una interacción entre estos microorganismos haciendo que *K. marxianus* disminuya su actividad proteolítica.

Por otra parte, se ha reportado que *S. cerevisiae* puede contribuir a la hidrólisis de proteínas lácteas, junto con *L. helveticus*, ya que son microorganismos que pueden liberar proteasas extracelulares (Ogrydziak, 1993; Chen *et al.*, 2014).



$$\%DH=8.16x_{Lh}+5.38x_{Km}+9.12x_{Sc}-5.59x_{Lh}x_{Km}+7.24x_{Lh}x_{Sc}-10.43x_{Km}x_{Sc}-39.22x_{Lh}x_{Km}x_{Sc}$$

Figura 26. Análisis de curvas de nivel de los modelos de regresión estimados para el grado de hidrólisis de proteínas después de 24 horas de fermentación a 37 °C

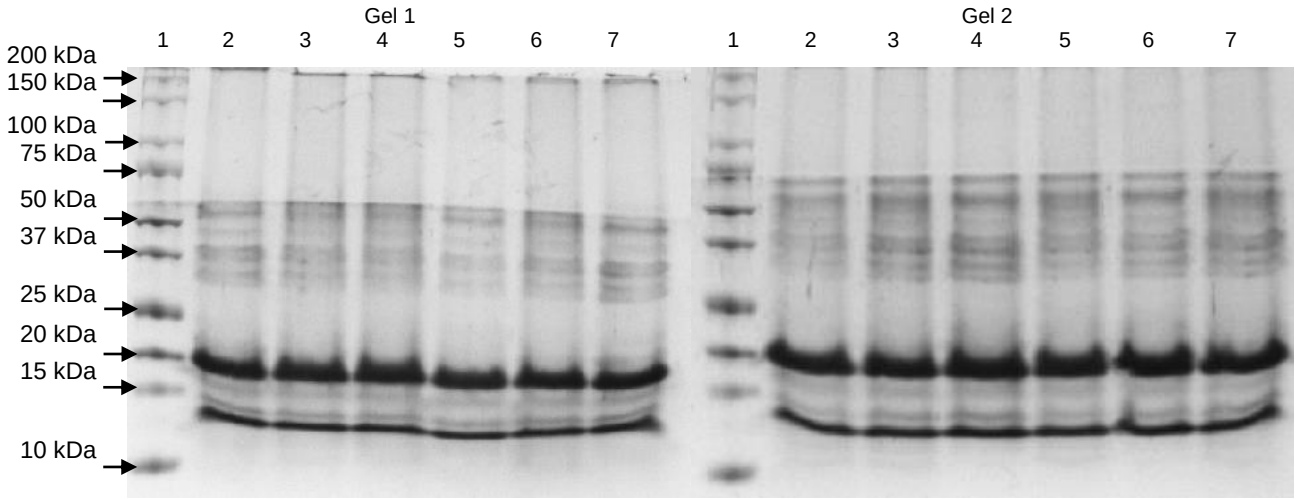


Figura 27. Electroforesis SDS-PAGE después de 24 horas de fermentación a 37 °C. Gel 1: Línea 1: marcador de peso molecular, línea 2: tratamiento 1, línea 3: tratamiento 2, línea 4: tratamiento 3, línea 5: tratamiento 4, línea 6: tratamiento 5, línea 7: tratamiento 6. Gel 2: línea 1: marcador de peso molecular, línea 2: tratamiento 7, línea 3: tratamiento 8, línea 4: tratamiento 9, línea 5: tratamiento 10, línea 6: tratamiento 11, línea 7: tratamiento 12.

Para verificar la hidrólisis de proteínas se realizaron geles de electroforesis (Figura 27), en los cuales no se pudieron observar cambios entre cada uno de los tratamientos, a diferencia de los valores reportados por el método OPA. Esto se puede deber a que la cantidad de proteínas que se hidroliza es muy pequeña y por lo tanto no es visible en el gel. Sin embargo, al compararlo contra el permeado sin fermentar se pudo observar que se generan 2 nuevas bandas de 15–17 kDa, las cuales se pueden deber a la proteólisis de proteínas de mayor peso molecular, e indicarían que sí se está llevando a cabo la proteólisis de las proteínas presentes.

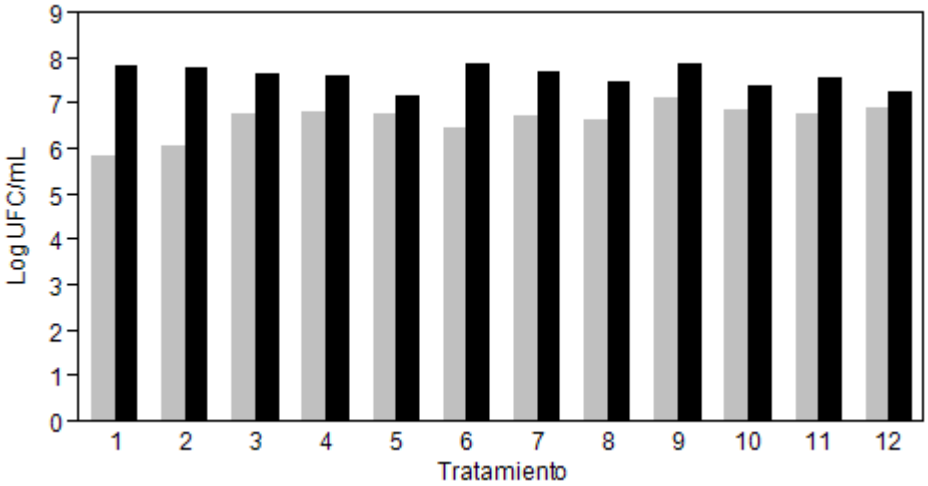


Figura 28. Concentración de *L. helveticus* antes (■) y después (■) de 24 horas de fermentación a 37 °C.

Se cuantificó la cantidad de *L. helveticus* para verificar si después de la fermentación se encontraban en una concentración adecuada para tener un efecto probiótico, y los resultados se muestran en la Figura 28. Como se puede observar, en todas las mezclas se obtuvieron concentraciones entre 7 y 8 log UFC/ml después de las 24 horas de fermentación, por lo que esta bacteria sí se encuentra en la concentración deseada.

La integración de todos los tratamientos y las variables respuestas se muestra en la Figura 29, y se puede observar que los tratamientos con mayor concentración de CO_2, etanol y acidez podrían no ser preferidos; ya que una elevada acidez puede ser desagradable en el paladar, así como altas concentraciones de

etanol no son deseadas por tratarse del desarrollo de una bebida no alcohólica. Estos tratamientos tienen en común la presencia de *K. marxianus* como parte de la mezcla de microorganismos, y esta levadura genera compuestos aromáticos que le confieren un sabor desagradable a la bebida. Los tratamientos 1, 6 y 11 son los que posiblemente tendrían una mayor aceptación sensorial, de los cuales se escogió el tratamiento 11, ya que muestra el mayor grado de hidrólisis de proteínas; sin embargo, los tratamientos 1 y 6 también podrían ser una buena opción para la elaboración de la bebida.

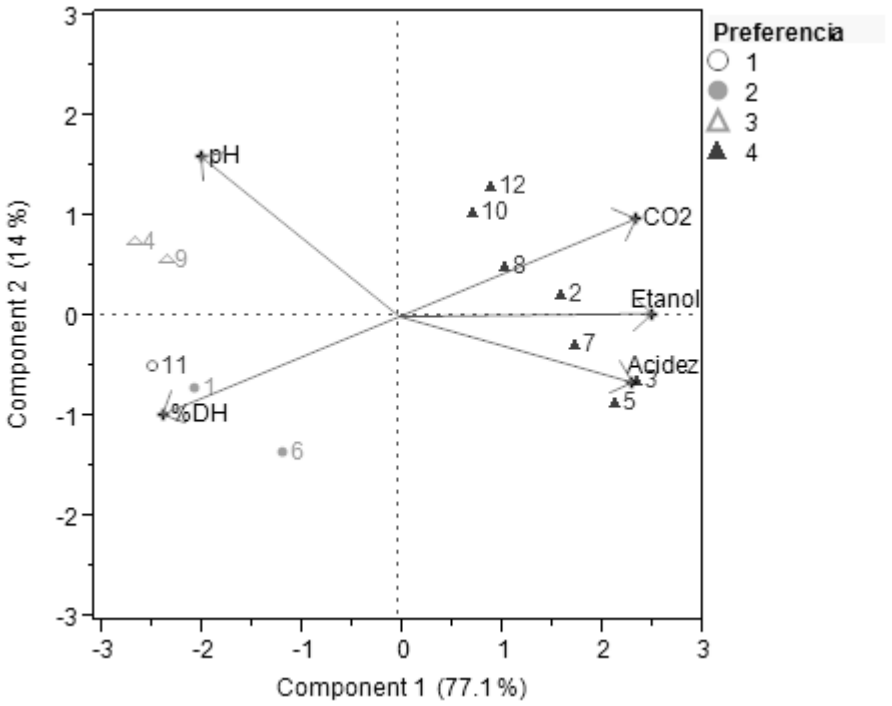


Figura 29. Análisis de las variables respuesta por la técnica multivariada de componentes principales.

La mezcla de microorganismos seleccionada (tratamiento 11) posee los siguientes microorganismos en las siguientes proporciones: *L. helveticus* (67%) y *S. cerevisiae* (33%); y los resultados obtenidos en cada variable respuesta fueron: pH = 3.54 ± 0.01, acidez = 4.68 ± 0.06 g/L, etanol = 0.15 ± 0.02 g/L, CO_2 = 0.30 ± 0.01 g/L y grado de hidrólisis de proteínas = 10.45± 0.01%. Además, se considera que se podría mejorar la aceptación de la bebida, si ésta tuviera una mayor concentración de CO_2, por lo que para la formulación final gasificó la bebida con CO_2 grado alimenticio.

6.3. Elaboración de la bebida

Para definir la formulación final de la bebida, se evaluó la adición de distintos edulcorantes, con la finalidad de obtener una bebida dulce; esto debido a que está reportado que el consumidor mexicano prefiere este tipo de bebidas, el mercado de refrescos saborizados abarca cerca del 50% del mercado total de bebidas, el cual también incluye agua mineral, naranjadas, agua natural, jugos y néctares, bebidas en polvo, aguas saborizadas, té y cervezas (Nielsen, 2010). Además, la adición de un edulcorante que contenga cierto porcentaje de dextrosa podría mejorar el crecimiento de *S. cerevisiae* durante la fermentación y así aumentar la concentración de CO_2 en la bebida. Los edulcorantes evaluados fueron MultiSweet® Stevia de Döhler y Splenda®; los cuales se escogieron debido a su bajo aporte calórico. Splenda® cuenta con 5% sucralosa y 95% dextrosa, y la MultiSweet® Stevia está compuesta por >95% de stevia.

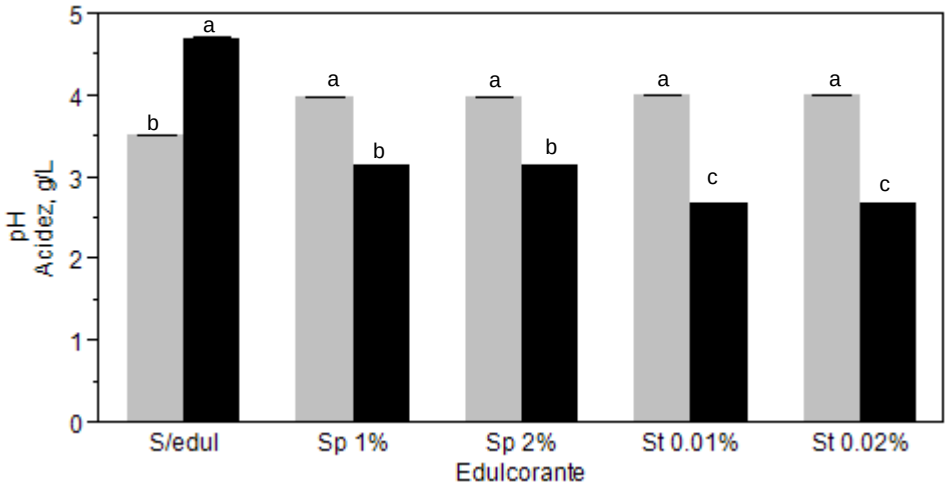


Figura 30. Resultados de pH (■) y acidez (■) de la bebida fermentada durante 24 horas a 37 °C, empleando dos edulcorantes distintos. S/edul: sin edulcorante, Sp: Splenda® y St: MultiSweet® Stevia. Datos expresados como la media ± error estándar. Determinaciones con tres réplicas cada uno. Columnas del mismo color con diferente letra indican diferencia significativa ($p < 0.05$, Prueba de Tukey-Kramer).

En la Figura 30 se compara la acidez y pH obtenido usando dos concentraciones distintas de cada edulcorante contra la bebida sin edulcorante, en donde se puede observar que la bebida sin edulcorante posee un pH de 3.54 y una

acidez de 4.68 g/L, la bebidas con stevia tienen un pH de 4.02 y una acidez de 2.7 g/L y las bebidas con Splenda® tienen un pH final de 4.00 y una acidez de 3.15 g/L. Estos resultados concuerdan con lo reportado con Roy *et al.* (1987), quienes encontraron que la producción de ácido láctico depende del medio de cultivo, cuando el medio tiene únicamente glucosa como fuente de carbono se produce una menor concentración de ácido láctico (alrededor de 20 g/L después de 24 horas) y su producción es mayormente acoplada al crecimiento; mientras que en un medio con lactosa, el ácido láctico se produce por ambos mecanismos, acoplado al crecimiento y no acoplado al crecimiento, y por lo tanto, se obtiene una mayor concentración de éste (aproximadamente 45 g/L después de 24 horas).

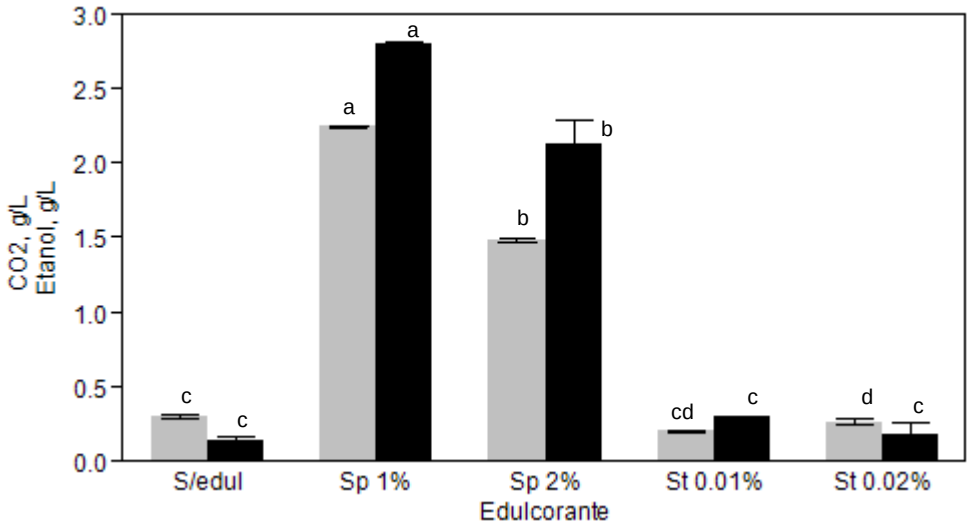


Figura 31. Concentración de etanol (■) y CO_2 (■) en la bebida fermentada por 24 horas a 37 °C, empleando dos edulcorantes distintos. S/edul: sin edulcorante, Sp: Splenda® y St: MultiSweet® Stevia. Datos expresados como la media ± error estándar. Determinaciones con tres réplicas cada uno. Columnas del mismos color con diferente letra indican diferencia significativa ($p < 0.05$, Prueba de Tukey-Kramer).

En la Figura 31 se muestra la concentración de etanol y CO_2 cuando se adiciona edulcorante a la bebida, en donde se obtuvo una mayor concentración de estos productos en las bebidas adicionadas con Splenda® en comparación con las bebidas adicionadas con stevia o sin edulcorante. Esto se puede deber a que al adicionar un edulcorante con mayor cantidad de dextrosa, como lo es Splenda®, se adiciona una nueva fuente de carbono que puede ser utilizada por *S. cerevisiae*

para convertirla en metabolitos de fermentación, como lo son el etanol y el CO_2. El crecimiento de esta levadura se observa en la Figura 32, las bebidas adicionadas con Splenda® poseen entre 6.3–6.5 log UFC/ml después de 24 horas de fermentación, mientras que las adicionadas con stevia poseen entre 5.3–5.5 log UFC/ml, y las que no poseen edulcorante tienen únicamente 4.7 log UFC/ml.

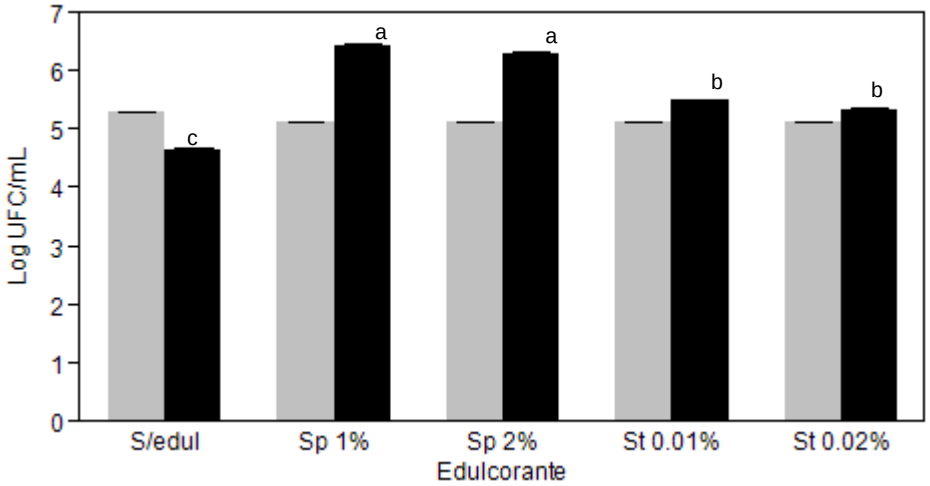


Figura 32. Concentración de *S. cerevisiae* antes (■) y después (■) después de 24 horas de fermentación a 37 °C, empelando dos edulcorantes distintos en el medio de cultivo. S/edul: sin edulcorante, Sp: Splenda® y St: MultiSweet® Stevia. Datos expresados como la media ± error estándar. Determinaciones con tres réplicas cada uno. Columnas con diferente letra indican diferencia significativa ($p < 0.05$, Prueba de Tukey-Kramer).

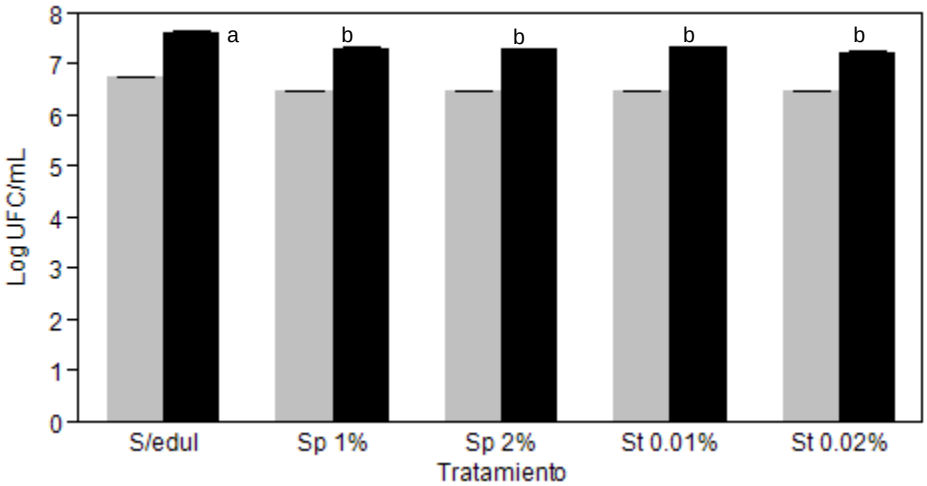


Figura 33. Concentración de *L. helveticus* antes (■) y después (■) después de 24 horas de fermentación a 37 °C, empleando dos edulcorantes distintos. S/edul: sin edulcorante, Sp: Splenda® y St: MultiSweet® Stevia. Datos expresados como la media ± error estándar. Determinaciones con tres réplicas cada uno. Columnas con diferente letra indican diferencia significativa ($p < 0.05$, Prueba de Tukey-Kramer).

Finalmente, también se evaluó la concentración final de *L. helveticus* las bebidas adicionadas con los edulcorantes (Figura 33), encontrando que la concentración final de esta bacteria no es afectada por la adición de éstos, concordando con lo reportado por Weber y Hekmat (2013) quienes reportan que la adición de stevia o de sucralosa no afecta el crecimiento de probióticos, como *L. rhamnosus,* durante el proceso de elaboración de yogurt.

Para la formulación final de la bebida, se utilizó Splenda® como edulcorante; debido a que con este edulcorante se obtuvo la mayor concentración final de etanol y CO_2, lo cual mejoró el sabor de la bebida. Además, se consideró que el sabor que proporciona Splenda® es más aceptado por los consumidores en comparación con el sabor de stevia, principalmente debido a que la mayoría de productos bajos en calorías están adicionados con Splenda®.

Cuadro 17. Formulación final de la bebida funcional fermentada

Ingrediente	**% ($^m/_m$)**
Permeado de leche descremada	97.06
Fibra de Guayaba	1.27
Splenda®	1.67
L. helveticus	2
S. cerevisiae	1

Cuadro 18. Análisis proximal y microbiológico realizado a la bebida formulada

Atributo	**Cantidad**
pH	3.66 ± 0.03
Acidez, g/L	4.86 ± 0.06
Etanol, g/L	1.05 ± 0.03
CO_2, g/L	12.06 ± 0.07
Grado de hidrólisis, %	9.31 ± 0.15
Azúcares totales, g/L	69.66 ± 0.24
L. helveticus, log UFC/ml	7.32 ± 0.06
S. cerevisiae, UFC/ml	5.30 ± 0.09

Datos expresados como la media ± error estándar. Determinaciones con tres réplicas cada uno.

La formulación final de la bebida se muestra en el Cuadro 17, como se observó que la cantidad de CO_2 producido por *S. cerevisiae* era muy baja comparada contra la cantidad presente en los refrescos, se añadió CO_2 grado

alimenticio, adicionando el equivalente a 5 volúmenes de CO_2 (10 g/L). Por último, se realizó el análisis proximal y microbiológico de la bebida, los datos obtenidos se muestran en el Cuadro 18. Al comparar con los resultados anteriores, se puede observar un ligero aumento en la acidez y disminución del pH de la bebida, lo cual se debe a que al adicionar CO_2, éste se disuelve en forma de ácido carbónico.

6.4. Estimación de la vida de anaquel sensorial de la bebida

Para determinar la vida de anaquel de la bebida formulada se reclutaron 100 consumidores de refrescos y jugos para analizar muestras con distintos tiempos de almacenamiento. Posterior a la evaluación se descartaron los resultados de 33 consumidores debido a que indicaron que no aceptaban la bebida fresca o debido a que los resultados fueron incongruentes. Los 67 resultados restantes se muestran en la Figura 34, donde la línea continua indica que el consumidor acepta la bebida con ese tiempo de almacenamiento, la línea punteada indica que el consumidor puede o no aceptar la bebida durante cierto intervalo de días.

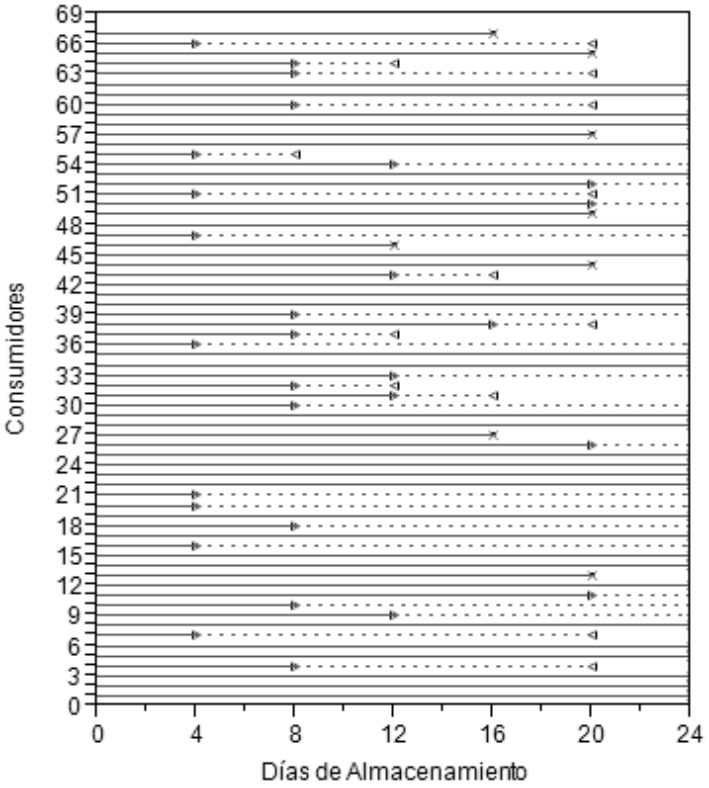


Figura 34. Resultados de aceptación/rechazo de la bebida con diferentes tiempos de almacenamiento

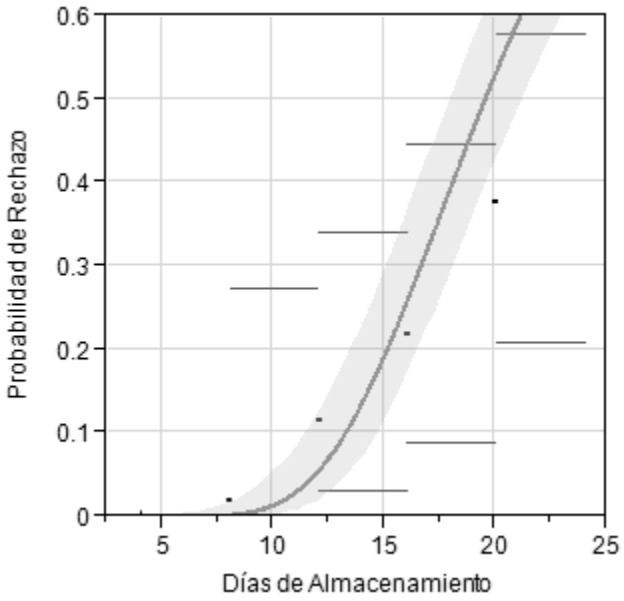


Figura 35. Modelo LEV ajustado a los datos para obtener la probabilidad de rechazo

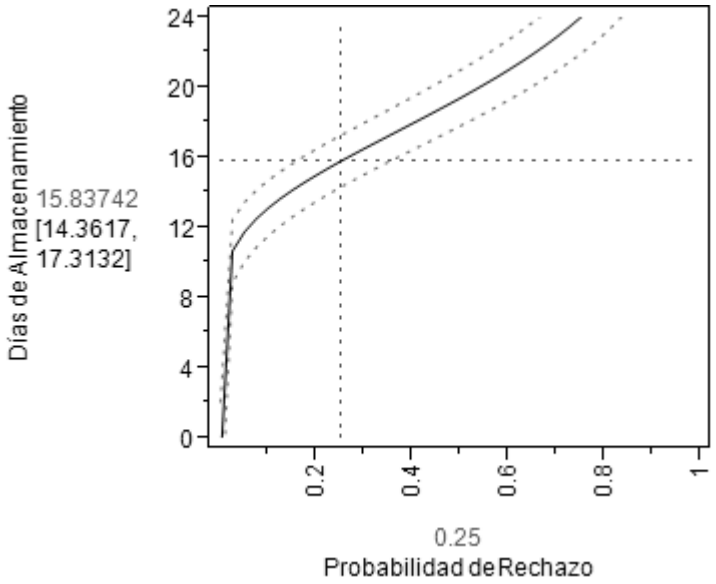


Figura 36. Vida de anaquel estimada a partir de la probabilidad de rechazo

Con los resultados obtenidos del análisis sensorial, se calculó la probabilidad de rechazo por parte de los consumidores para cada día de almacenamiento a partir de ajustar un modelo de probabilidad LEV (Largest Extreme Value, siglas en inglés) a los datos (Figura 35). Este modelo de probabilidad permitió estimar la vida de anaquel de la bebida, en donde si se toma como

aceptable una probabilidad de rechazo de 0.25, la bebida se induce que tendría una vida de anaquel de 14–17 días (Figura 36).

Para poder determinar el factor por el cual los consumidores ya no aceptan la bebida después de 14–17 días, se monitorearon los atributos fisicoquímicos y microbiológicos de la bebida durante los 24 días de almacenamiento evaluados sensorialmente. Los valores obtenidos se muestran en los Cuadro 19 yCuadro **20**; donde se puede observar un incremento en la acidez, CO_2, etanol, grado de hidrólisis de proteínas; así como una disminución en el pH y en la concentración de azúcares. Esto podría sugerir que los microorganismos siguen utilizando los nutrientes del medio para obtener la energía necesaria para el mantenimiento celular, y por lo tanto, continúan produciendo metabolitos como ácidos orgánicos, etanol y CO_2. Esto concuerda con los resultados obtenidos de BAL y levaduras, en donde no se observan cambios de menores de 0.5 log UFC/ml durante los 24 días.

Cuadro 19. Análisis proximal de la bebida almacenada durante 24 días a 4 °C

Día	**pH**	**Acidez g/L**	**CO_2 g/L**	**Etanol g/L**	**%DH**	**Azúcares g/L**
0	3.64 ± 0.01	4.59 ± 0.06	12.06 ± 0.07	1.05 ± 0.03	9.31 ± 0.15	69.66 ± 0.24
4	3.65 ± 0.01	5.29 ± 0.10	11.38 ± 0.08	1.57 ± 0.02	9.61 ± 0.04	67.35 ± 0.78
8	3.66 ± 0.02	5.19 ± 0.06	10.96 ± 0.09	1.71 ± 0.06	9.88 ± 0.38	64.05 ± 0.39
12	3.62 ± 0.01	5.59 ± 0.06	11.16 ± 0.11	1.84 ± 0.04	10.30 ± 0.15	58.28 ± 0.39
16	3.61 ± 0.01	5.66 ± 0.07	12.08 ± 0.09	2.45 ± 0.08	10.67 ± 0.30	60.15 ± 0.78
20	3.57 ± 0.01	5.79 ± 0.06	11.25 ± 0.06	2.79 ± 0.05	11.39 ± 0.11	58.74 ± 0.81
24	3.47 ± 0.01	5.82 ± 0.07	9.79 ± 0.18	3.08 ± 0.06	11.69 ± 0.02	55.85 ± 0.77

Datos expresados como la media ± error estándar. Determinaciones con tres réplicas cada uno.

Cuadro 20. Análisis microbiológico de la bebida almacenada durante 24 días a 4 °C

Día	**BAL Log UFC/mL**	**Levaduras Log UFC/mL**
0	7.04 ± 0.04	5.30 ± 0.02
4	7.18 ± 0.10	5.48 ± 0.04
8	7.11 ± 0.23	5.54 ± 0.03
12	7.26 ± 0.01	5.85 ± 0.03
16	7.10 ± 0.02	5.56 ± 0.03
20	6.74 ± 0.01	5.22 ± 0.01
24	6.77 ± 0.09	5.18 ± 0.01

Datos expresados como la media ± error estándar. Determinaciones con dos réplicas cada uno.

Así mismo, se realizó un análisis de correlación entre los atributos fisicoquímicos, microbiológicos y la probabilidad de rechazo (Cuadro 21). Donde se pudo observar una fuerte correlación entre la probabilidad de rechazo y el grado de hidrólisis de proteínas; esto se puede deber a que posiblemente se generen sabores amargos causados por los péptidos formados, principalmente debido a que éstos poseen un residuo hidrofóbico en el C–terminal (Leksrisompong *et al.*, 2010). También se observó una fuerte correlación entre la probabilidad de rechazo y la concentración de etanol; y esto puede deberse a que al ser una bebida no alcohólica, la percepción del sabor a alcohol o a fermentación puede no ser aceptado por el consumidor. A pesar de que el sabor a alcohol es detectado cuando la concentración de éste es mayor a 8.8 ± 1.5 g/L (Mattes, 1994), y en la bebida se encuentra en concentraciones menores, es importante resaltar que junto con la producción de etanol se producen otros metabolitos de la fermentación como acetaldehído, ésteres y otros alcoholes, los cuales también pueden generar sabores pungentes o a fermentado (Magalhães *et al.*, 2011), los cuales contribuyen a la mala aceptación por parte del consumidor.

Cuadro 21. Análisis de correlación entre las variables respuesta y la probabilidad de rechazo

	pH	**Acidez**	**CO_2**	**Etanol**	**%DH**	**Azucares**	**BAL**	**Levaduras**	**Prob. Rechazo**
pH	1	-0.646	0.715	-0.843	-0.881	0.743	0.769	0.563	-0.967
Acidez	-0.646	1	-0.509	0.905	0.879	-0.916	-0.388	-0.001	0.709
CO_2	0.715	-0.509	1	-0.572	-0.598	0.593	0.456	0.281	-0.646
Etanol	-0.843	0.905	-0.572	1	0.984	-0.881	-0.705	-0.376	0.921
DH	-0.881	0.879	-0.598	**0.984**	1	-0.907	-0.745	-0.392	0.942
Azucares	0.743	-0.916	0.593	-0.881	-0.907	1	0.425	-0.012	-0.753
BAL	0.769	-0.388	0.456	-0.705	-0.745	0.425	1	0.880	-0.864
Levaduras	0.563	-0.001	0.281	-0.376	-0.392	-0.012	0.880	1	-0.634
Prob. Rechazo	-0.967	0.709	-0.646	**0.921**	**0.942**	-0.753	-0.864	-0.634	1

En la Figura 37, además, se puede observar una fuerte relación entre la concentración de etanol en la bebida y el grado de hidrólisis de proteínas. Ogrydziak (1993) indica que *S. cerevisiae* es capaz de producir proteasas extracelulares en

pequeñas cantidades, y además, pueden liberarse proteasas intracelulares durante la autolisis de las células muertas; estas enzimas pueden actuar sobre las proteínas presentes en el medio. Esto podría explicar la correlación entre el grado de hidrólisis de proteínas y la concentración de etanol, el grado de hidrólisis aumenta ya que *S. cerevisiae* libera las proteasas necesarias para usar los aminoácidos liberados como fuente de nitrógeno, y el etanol es generado como producto del metabolismo de esta misma levadura.

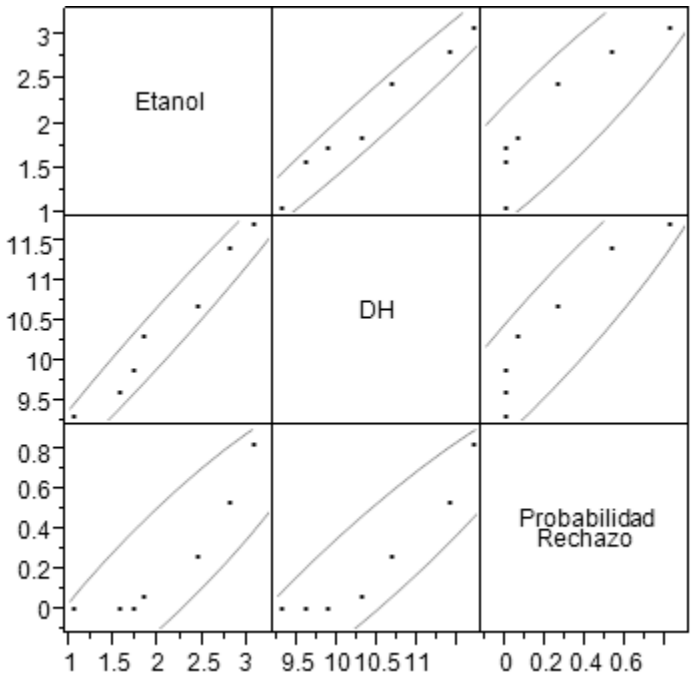


Figura 37. Diagrama de dispersión de las variables etanol, grado de hidrólisis y probabilidad de rechazo

Se logró desarrollar una bebida funcional con características sensoriales agradables al consumidor, la cual podría ser una alternativa adecuada para promover la disminución en el consumo de bebidas con alto contenido calórico, como son los refrescos. Esto es de gran importancia debido a que el factor de riesgo que más se asocia a la obesidad en niños y adultos en México es el patrón de alimentación, ya que se consumen dietas compuestas de un alto valor calórico acompañadas de una disminución de la actividad física. De acuerdo con las Encuestas Nacionales de Ingreso y Gasto de Hogares (ENIGH) durante los últimos 14 años se ha mostrado una disminución del 29.3% en la compra de frutas y

verduras, a la vez que la compra de alimentos ricos en carbohidratos refinados y bebidas con alto aporte calórico ha aumentado. Es por eso que se debe de fomentar el consumo de alimentos y bebidas que han demostrado tener compuestos capaces de ejercer efectos benéficos sobre la salud.

7. CONCLUSIONES

- *K. marxianus* es el microorganismo que mejor crece en el PLD (4.05 g/L), alcanzando un crecimiento máximo de 4.05 g/L; además de producir etanol (3.81 g/L) y CO_2 (1.66 g/L) como metabolitos de la fermentación y ser capaz de degradar la proteína presente.
- El bajo crecimiento de *L. helveticus* (1.19 g/L) puede deberse a la poca cantidad de proteína presente en el PLD, además de que este nitrógeno no se encuentra completamente disponible debido a la estructura de la proteína. Sin embargo, es capaz de disminuir el pH del medio a valores adecuados para el desarrollo de una bebida fermentada.
- El bajo crecimiento de *S. cerevisiae* (0.80 g/L) en el PLD se puede deber a que la única fuente de carbono en este medio es lactosa y esta levadura no posee el sistema necesario para usarlo como nutriente.
- La desarrollo de acidez en el medio, durante la fermentación de las mezclas de microorganismo, se debe principalmente a la presencia de *L. helveticus* y *K. marxianus*, el aumento en el etanol y CO_2 a la presencia de *K. marxianus*, y el aumento en el grado de hidrólisis a la presencia de *L. helveticus* y *S. cerevisiae*.
- La mezcla de *L. helveticus* y *S. cerevisiae* 0.67:0.33 presenta los mejores atributos fisicoquímicos para formular una bebida (acidez moderada, baja producción de etanol y alto grado de hidrólisis de proteínas).
- La vida de anaquel de la bebida formulada es de 14–17 días a 4 °C, considerando una probabilidad de rechazo por parte de los consumidores del 25%, según el modelo LEV ajustado a los datos obtenidos en el análisis de vida de anaquel sensorial.
- El aumento en el grado de hidrólisis de proteínas y en la concentración de etanol pueden generar sabores desagradables en la bebida, y por lo tanto, deja de ser aceptada por los consumidores.

8. BIBLIOGRAFÍA

Amrane, A. y Y. Prigent. 1998. Lactic acid production rates during the different growth phases of *Lactobacillus helveticus* cultivated on whey supplemented with yeast extract. Biotechnol. Lett. 20:379–383.

Assadi, M. M., F. Abdolmaleki y R. R. Mokarrame. 2008. Application of whey in fermented beverage production using kefir starter culture. Nutr. Food Sci. 38:121–127.

Assadi, M. M., R. Pourahmad y N. Moazami. 2000. Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. World J. Microbiol. Biotechnol. 16:541–543.

Balancereal. 2009. Fruity whey beverage bases. Disponible en: http://balancereal.com/fruity-whey.php [Último acceso: 03 de diciembre de 2013]

Belem, M. A. F. y B. H. Lee. 1999. Fed-batch fermentation to produce oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. Process Biochem. 34:501–509.

Böddeker, K. W. 2008. An Introduction to Barrier Separation. In: Liquid Separations with Membranes. Springer Berlin Heidelberg. p. 1–16.

Bolthouse Farms. 2010. Protein Plus. Disponible en: http://www.bolthouse.com/products/beverages/proteinplus [Último acceso: 03 de diciembre de 2013]

Brans, G., C. G. P. H. Schroën, R. G. M. van der Sman y R. M. Boom. 2004. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. J. Membr. Sci. 243:263–272.

Broadbent, J. R., D. J. McMahon, C. J. Oberg y D. L. Welker. 2001. Use of exopolysaccharide-producing cultures to improve the functionality of low fat cheese. Int. Dairy J. 11:433–439.

Bylund, G. 1995. Dairy processing handbook. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund, Sweden.

Castillo, F. J. 1989. Lactose metabolism by yeasts. In: H. Verachtert and R. De Mot, editors. Yeast Biotechnology and Biocatalysts. CRC Press, New York. p. 297–320.

Chamorro, A. M. y E. C. Mamani. 2010. Importancia de la fibra dietética, sus propiedades funcionales en la alimentación humana y en la industria alimentaria. Rev. Investig. En Cienc. Tecnol. Aliment. 1.

Champagne, C. P. y J. Goulet. 1988. Growth of bakers' yeast (*Saccharomyces cerevisiae)* in lactose-hydrolyzed cheese whey ultrafiltrate. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 21:545–548.

Champagne, C. P. y H. Møllgaard. 2008. Production of probiotic cultures and their addition in fermented foods. In: E. R. Farnworth, editor. Handbook of Fermented Functional Foods. Segunda. CRC Press. p. 513–532.

Chaves-López, C., R. Tofalo, A. Serio, A. Paparella, G. Sacchetti y G. Suzzi. 2012. Yeasts from Colombian Kumis as source of peptides with Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk. Int. J. Food Microbiol. 159:39–46.

Chen, Y., W. Liu, J. Xue, J. Yang, X. Chen, Y. Shao, L. Kwok, M. Bilige, L. Mang y H. Zhang. 2014. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of *Lactobacillus helveticus* strains from traditional fermented dairy foods and antihypertensive effect of fermented milk of strain H9. J. Dairy Sci. 97:6680–6692.

Cheryan, M. 1998. Ultrafiltration and Microfiltration Handbook. CRC Press.

Chiarini, L., L. Mara y S. Tabacchioni. 1992. Influence of growth supplements on lactic acid production in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36:461–464.

Dickson, R. C. 1980. Expression of a foreign eukaryotic gene in *Saccharomyces cerevisiae*: β-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. Gene 10:347–356.

Diplock, A. T., P. J. Aggett, M. Ashwell, E. B. Fern y M. B. Roberfroid. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. Br. J. Nutr. 81 Suppl 1:S1–27.

Djurić, M., M. Carić, S. Milanović, M. Tekić y M. Panić. 2004. Development of whey-based beverages. Eur. Food Res. Technol. 219:321–328.

Domingues, L., J. A. Teixeira y N. Lima. 1999. Construction of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* fermenting lactose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51:621–626.

Dunne, C., L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan y J. K. Collins. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. Am. J. Clin. Nutr. 73:386s–392s.

Escudero Álvarez, S. y P. González Sánchez. 2006. La fibra dietética. Nutr. Hosp. 21:61–72.

Espeche Turbay, M. B., A. de Moreno de LeBlanc, G. Perdigón, G. Savoy de Giori y E. M. Hebert. 2012. β-Casein hydrolysate generated by the cell envelope-associated proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. lactis CRL 581 protects against trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. J. Dairy Sci. 95:1108–1118.

Fallourd, M. J. y L. Viscione. 2009. Ingredient selection for stabilisation and texture optimisation of functional beverages and the inclusion of dietary fibre. In: P.

Paquin, editor. Functional and Speciality Beverage Technology. Woodhead Publishing. p. 3–38.

FAO/WHO. 2001. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk with live lactic acid bacteria.

FAO/WHO. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.

Fernandes de Carvalho, A. y J. Maubois. 2009. Applications of membrane technologies in the dairy industry. In: Engineering Aspects of Milk and Dairy Products. CRC Press. p. 33–56.

Fitzgerald, R. J. y H. Meisel. 2003. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In: P. F. Fox and P. L. H. McSweeney, editors. Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins. Springer US. p. 675–698.

Fonseca, G. G., E. Heinzle, C. Wittmann y A. K. Gombert. 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 79:339–354.

Fortina, Nicastro, Carminati, Neviani y Manachini. 1998. *Lactobacillus helveticus* heterogeneity in natural cheese starters: the diversity in phenotypic characteristics. J. Appl. Microbiol. 84:72–80.

Fortitech. 2011. New Innovations in Functional Beverages.

Fuhrman, E. 2011. Whey protein builds on success. Disponible en: http://www.bevindustry.com/articles/83231-whey-protein-builds-on-success?v=preview [Último acceso: 03 de diciembre de 2013]

Gallardo-Escamilla, F. J., A. L. Kelly y C. M. Delahunty. 2005. Influence of starter culture on flavor and headspace volatile profiles of fermented whey and whey produced from fermented milk. J. Dairy Sci. 88:3745–3753.

Garay-Arroyo, A., A. A. Covarrubias, I. Clark, I. Niño, G. Gosset y A. Martinez. 2003. Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63:734–741.

García-Tejedor, A., L. Sánchez-Rivera, M. Castelló-Ruiz, I. Recio, J. B. Salom y P. Manzanares. 2014. Novel antihypertensive lactoferrin-derived peptides produced by *Kluyveromyces marxianus*: Gastrointestinal stability profile and In Vivo Angiotensin I-Converting enzyme (ACE) inhibition. J. Agric. Food Chem. 62:1609–1616.

Gätje, G. y G. Gottschalk. 1991. Limitation of growth and lactic acid production in batch and continuous cultures of *Lactobacillus helveticus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34:446–449.

Gatti, M., G. Contarini y E. Neviani. 1999. Effectiveness of chemometric techniques in discrimination of *Lactobacillus helveticus* biotypes from natural dairy starter

cultures on the basis of phenotypic characteristics. Appl. Environ. Microbiol. 65:1450–1454.

Goff, D. 2009. The Dairy Science and Technology eBook. Disponible en: https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/dairy-science-and-technology-ebook [Último acceso: 25 de noviembre de 2013]

Goffeau, A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin y S. G. Oliver. 1996. Life with 6000 genes. Science 274:546, 563–567.

Goulas, A. y A. S. Grandison. 2008. Applications of membrane separation. In: T. J. Britz y R. K. Robinson, editors. Advanced Dairy Science and Technology. Blackwell Publishing Ltd. p. 35–74.

Guo, Y., D. Pan y M. Tanokura. 2009. Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology. Food Chem. 114:328–333.

Gutman, R. G. 1987. Membrane filtration: the technology of pressure-driven crossflow processes. A. Hilger.

Halliwell, D. 2002. Hand up for probiotics! The mechanism for health benefits in unclear, but interest remains strong. World Food Ingred. March:46–50.

Hamme, V., F. Sannier, J.-M. Piot, S. Didelot y S. Bordenave-Juchereau. 2009. Crude goat whey fermentation by *Kluyveromyces marxianus* and *Lactobacillus rhamnosus*: contribution to proteolysis and ACE inhibitory activity. J. Dairy Res. 76:152–157.

Hebert, E. M., G. Mamone, G. Picariello, R. R. Raya, G. Savoy, P. Ferranti y F. Addeo. 2008. Characterization of the pattern of αs1- and β-casein breakdown and release of a bioactive peptide by a cell envelope proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. Appl. Environ. Microbiol. 74:3682–3689.

Hebert, E. M., R. R. Raya y G. S. D. Giori. 2000. Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062. Appl. Environ. Microbiol. 66:5316–5321.

Hebert, E. M., L. Saavedra y P. Ferranti. 2010. Bioactive peptides derived from casein and whey proteins. In: F. Mozzi, R. R. Raya y G. M. Vignolo, editors. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Wiley-Blackwell. p. 233–249.

Heino, A. 2010. Microfiltration in cheese and whey processing [Doctoral dissertation (article-based)]. University of Helsinki.

Hilliam, M. 2004. Healthier dairy. World Food Ingred. September:52–54.

Homayouni, A., M. Alizadeh, H. Alikhah y V. Zijah. 2012. Functional Dairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. In: E. Rigobelo, editor. Probiotics. InTech.

Inchaurrondo, V. A., O. M. Yantorno y C. E. Voget. 1994. Yeast growth and β-galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. Process Biochem. 29:47–54.

Industria Alimentaria. 2010. Jugo de Suero de leche. Disponible en: http://www.industriaalimenticia.com/articles/jugo-de-suero-de-leche [Último acceso: 02 de diciembre de 2013]

Industria Alimentaria. 2013. Hidra de Batavo: Suero de leche con zumo de frutas. Disponible en: http://www.industriaalimenticia.com/articles/86297-article-headline [Último acceso: 02 de diciembre de 2013]

Jakobsen, M. y J. Narvhus. 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. Int. Dairy J. 6:755–768.

Jelen, P. 1992. Whey cheeses and beverages. In: J. G. Zadow, editor. Whey and lactose processing. Springer Netherlands. p. 157–193.

Jeličić, I., R. Božanić y L. Tratnik. 2008. Whey based beverages - new generation of dairy products. Mljekarstvo 58:257, 257–274, 274.

Jiménez-Escrig, A., M. Rincón, R. Pulido y F. Saura-Calixto. 2001. Guava fruit (*Psidium guajava*) as a new source of antioxidant dietary fiber. J. Agric. Food Chem. 49:5489–5493.

Joshi, D. V. K. y A. Pandey. 1999. Biotechnology: Food fermentation : Microbiology, biochemistry, and technology. Educational Publishers & Distributors.

Kearney, N., C. Stanton, C. Desmond, M. Coakley, J. K. Collins, G. Fitzgerald y R. P. Ross. 2008. Challenges associated with the development of probiotic-containing functional foods. In: E. R. Farnworth, editor. Handbook of Fermented Functional Foods. Segunda. CRC Press. p. 25–69.

Kellog's. 2013. Special K™ Protein Water Mix | Bebida de sabores combinados. Disponible en: http://www.specialk.com/content/spk/usa/es_us/products/water-mix.html [Último acceso: 03 de diciembre de 2013]

Kilara, A. 2008. Whey and whey products. In: R. C. C. P. D. C. E. Consultant, editor. Dairy Processing & Quality Assurance. Wiley-Blackwell. p. 337–355.

Kosikowski, F. V. 1986. Membrane separations in food processing. In: W. C. McGregor, editor. Membrane separations in biotechnology. Marcel Dekker, Inc. p. 201–254.

Kourkoutas, Y., S. Dimitropoulou, M. Kanellaki, R. Marchant, P. Nigam, I. M. Banat y A. A. Koutinas. 2002. High-temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material. Bioresour. Technol. 82:177–181.

Kulozik, U. y J. Wilde. 1999. Rapid lactic acid production at high cell concentrations in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. Enzyme Microb. Technol. 24:297–302.

Kunji, E. R. S., I. Mierau, A. Hagting, B. Poolman y W. N. Konings. 1996. The proteotytic systems of lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 70:187–221.

Lee, B. H., B. H. Lee y J. Lee. 1996. Fundamentals of food biotechnology. John Wiley & Sons, New York.

Lee, Y. K. y S. Salminen. 1995. The coming of age of probiotics. Trends Food Sci. Technol. 6:241–245.

Lee, Y. K. y S. Salminen. 2009. Handbook of probiotics and prebiotics. John Wiley & Sons.

Leksrisompong, P. P., R. E. Miracle y M. Drake. 2010. Characterization of flavor of whey protein hydrolysates. J. Agric. Food Chem. 58:6318–6327.

Lewis, M. J. 1996. Pressure-activated membrane process. In: A. S. Grandison and M. J. Lewis, editors. Separation Processes in the Food and Biotechnology Industries. Woodhead Publishing. p. 65–96.

Lin, Y., W. Zhang, C. Li, K. Sakakibara, S. Tanaka y H. Kong. 2012. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. Biomass Bioenergy 47:395–401.

Longhi, L. G. S., D. J. Luvizetto, L. S. Ferreira, R. Rech, M. A. Z. Ayub y A. R. Secchi. 2004. A growth kinetic model of *Kluyveromyces marxianus* cultures on cheese whey as substrate. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 31:35–40.

Luedeking, R. y E. L. Piret. 1959. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. 1:393–412.

Magalhães, K. T., D. R. Dias, G. V. de Melo Pereira, J. M. Oliveira, L. Domingues, J. A. Teixeira, J. B. de Almeida e Silva y R. F. Schwan. 2011. Chemical composition and sensory analysis of cheese whey-based beverages using kefir grains as starter culture. Int. J. Food Sci. Technol. 46:871–878.

Manning, T. S., G. Gibson y R. Rastall. 2004. Prebiotics and lactic acid bacteria. In: Lactic Acid Bacteria. CRC Press.

Marcelo, P. y S. Rizvi. 2008. Applications of membrane technology in the dairy industry. In: Handbook of Membrane Separations. CRC Press. p. 635–669.

Mattes, R. D. 1994. Influences on acceptance of bitter foods and beverages. Physiol. Behav. 56:1229–1236.

Mistry, V. V. 2013. Cheese. In: A. Y. Tamime, editor. Membrane Processing. Blackwell Publishing Ltd. p. 176–192.

Morris, P. E. y R. J. Fitzgerald. 2008. Whey proteins and peptides in human health. In: C. I. O. Ph.D and P. J. Huth, editors. Whey Processing, Functionality and Health Benefits. Wiley-Blackwell. p. 285–343.

Muthukumarappan, K. y C. Marella. 2010. Membrane Processing. In: Mathematical Modeling of Food Processing. CRC Press. p. 735–758.

Nair, B. y J. Prajapati. 2003. The history of fermented foods. In: Handbook of Fermented Functional Foods. CRC Press. p. 1–25.

Nelson, A. L. 2001. High-fiber ingredients. American Association of Cereal Chemists.

Nielsen, P. M. 2009. Enzymes in protein modification. In: R. J. Whitehurst and arten van Oort, editors. Enzymes in Food Technology. Wiley-Blackwell. p. 292–319.

Ogrydziak, D. M. 1993. Yeast extracellular proteases. Crit. Rev. Biotechnol. 13:1–55.

Osada, Y. y T. Nakagawa. 1992. Membrane Science and Technology. CRC Press.

Ostergaard, S., L. Olsson y J. Nielsen. 2002. Metabolic pathway analysis of *Saccharomyces cerevisiae*. In: A. Durieux and J. P. Simon, editors. Applied Microbiology. Springer Netherlands. p. 75–85.

Owusu-Apenten, R. 2010. Bioactive Peptides. CRC Press.

Özer, B. H. y H. A. Kirmaci. 2010. Functional milks and dairy beverages. Int. J. Dairy Technol. 63:1–15.

Pellegrino, J. 2000. Filtration and ultrafiltration equipment and techniques. Sep. Amp Purif. Rev. 29:91–118.

Pescuma, M., E. M. Hébert, F. Mozzi y G. Font de Valdez. 2008. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. Food Microbiol. 25:442–451.

Plessas, S., L. Bosnea, C. Psarianos, A. A. Koutinas, R. Marchant y I. M. Banat. 2008. Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. Bioresour. Technol. 99:5951–5955.

Porro, D., L. Brambilla, B. M. Ranzi, E. Martegani y L. Alberghina. 1995. Development of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells for the production of lactic acid. Biotechnol. Prog. 11:294–298.

PROFECO. 2004. No Todo lo que Parece Leche lo es.

Rech, R., C. F. Cassini, A. Secchi y M. a. Z. Ayub. 1999. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 23:91–96.

Roostita, R. y G. H. Fleet. 1996. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. Int. J. Food Microbiol. 31:205–219.

Roy, D., A. Leduy y J. Goulet. 1987. Kinetics of growth and lactic acid production from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. Can. J. Chem. Eng. 65:597–603.

Saxelin, M., R. Korpela y A. Mäyrä-Mäkinen. 2003a. Functional dairy products. In: G. Smit, editor. Dairy Processing. Woodhead Publishing. p. 229–245.

Saxelin, M., R. Korpela y A. Mäyrä-Mäkinen. 2003b. Introduction: classifying functional dairy products. In: T. Mattila-Sandholm and M. Saarela, editors. Functional Dairy Products. Woodhead Publishing. p. 1–16.

Sendra, E., P. Fayos, Y. Lario, J. Fernández-López, E. Sayas-Barberá y J. A. Pérez-Alvarez. 2008. Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. Food Microbiol. 25:13–21.

Silveira, W. B., F. J. V. Passos, H. C. Mantovani y F. M. L. Passos. 2005. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. Enzyme Microb. Technol. 36:930–936.

Siró, I., E. Kápolna, B. Kápolna y A. Lugasi. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. Appetite 51:456–467.

Smith, K. 2013. Development of membrane processes. In: A. Y. Tamime, editor. Membrane Processing. Blackwell Publishing Ltd. p. 1–16.

Tango, M. S. A. y A. E. Ghaly. 1999. Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions. Biomass Bioenergy 16:61–78.

Torino, M. I., F. Mozzi, and G. F. de Valdez. 2005. Exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807. Appl. Microbiol. Biotechnol. 68:259–265.

Tunick, M. H. 2008. Whey protein production and utilization: A brief history. In: C. I. O. Ph.D and P. J. Huth, editors. Whey Processing, Functionality and Health Benefits. Wiley-Blackwell. p. 1–13.

Venkatesh, K. V., M. R. Okos y P. C. Wankat. 1993. Kinetic model of growth and lactic acid production from lactose by *Lactobacillus bulgaricus*. Process Biochem. 28:231–241.

Vermeirssen, V., J. Van Camp, K. Decroos, L. Van Wijmelbeke y W. Verstraete. 2003. The impact of fermentation and *In Vitro* digestion on the formation of Angiotensin-I-Converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein. J. Dairy Sci. 86:429–438.

De Verse, M. y J. Schrezenmeir. 2001. Pro and Prebiotics. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. May/June:40–55.

Walstra, P., P. Walstra, J. T. M. Wouters y T. J. Geurts. 2005. Dairy Science and Technology, Second Edition. CRC Press.

Water, J. V. de. 2003. Yogurt and immunity. In: Handbook of Fermented Functional Foods. CRC Press. p. 113–144.

Webb, B. H. y E. O. Whittier. 1970. Byproducts from milk. 2nd edition. Avi Publishing Co Inc., Westport, Conn.

Weber, A. y S. Hekmat. 2013. The effect of *Stevia rebaudiana* on the growth and survival of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and sensory properties of probiotic yogurt. J. Food Res. 2:p136.

Whey Up. 2013. Pre-workout whey protein drink with caffeine | WheyUP. Available from: http://www.wheyup.com/productinfo [Último acceso: 03 de diciembre de 2013]

Wollowski, I., G. Rechkemmer y B. L. Pool-Zobel. 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. Am. J. Clin. Nutr. 73:451s–455s.