



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

Desarrollo de un yogur bebible enriquecido con péptidos bioactivos obtenidos de la hidrólisis enzimática de proteínas de suero lácteo utilizando papaína

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.B.Q. Araceli Vera Valle

Dirigido por:

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre



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

Desarrollo de un yogur bebible enriquecido con péptidos bioactivos obtenidos de la hidrólisis enzimática de proteínas de suero lácteo utilizando papaína

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:
I.B.Q. Araceli Vera Valle

Dirigido por:
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Presidente

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Secretario

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Vocal

Dra. Minerva Ramos Gómez
Suplente

Dra. Beneranda Murúa Págola
Suplente

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

Firma
Firma
Firma
Firma
Firma

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

RESUMEN

La hipertensión arterial es una enfermedad con alta prevalencia en México. Uno de los sistemas más importantes para la regulación de la presión arterial es el sistema renina-angiotensina-aldosterona. Existen péptidos bioactivos capaces de inhibir a la enzima convertidora de angiotensina (ECA) logrando una disminución en la presión arterial. Dentro de las proteínas precursoras de péptidos antihipertensivos más estudiadas están las de origen lácteo destacando las proteínas de suero. Por otro lado, los productos lácteos se consideran funcionales, teniendo mayor demanda en el mercado el yogur. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y determinar la vida de anaquel sensorial de un yogur bebible enriquecido con péptidos inhibidores de ECA obtenidos a partir de la hidrólisis enzimática de proteínas de suero lácteo utilizando papaína. Para estudio de la producción de tales péptidos se realizó un diseño con 4 factores (concentración de proteína, relación enzima/sustrato, temperatura de reacción y pH), 2 niveles cada uno y con puntos centrales. La variable respuesta la actividad inhibitoria de ECA, se determinó *in vitro*. El resultado fue con [Proteína]=16g/L, relación (E/S)=5, a 75 °C y pH de 5, logrando cerca del 70 % de inhibición de ECA. Posteriormente se fraccionó el hidrolizado mediante ultrafiltración con ayuda de una membrana de 10 kDa, a cada fracción se les determinó el IC₅₀, resultando menor el de la fracción ≤10 kDa. Se procedió a formular tres yogures bebibles enriquecidos con tres distintas dosis de péptidos, las cuales fueron evaluadas sensorialmente por 60 consumidores, resultando con mayor preferencia la que contenía 748 mg de péptidos para 250 ml de yogur. Esta formulación fue caracterizada fisicoquímicamente y se le determinó la vida de anaquel sensorial (VAS), para esto, el yogur se almacenó durante 0, 7, 14, 21 y 28 días a 4 °C, transcurrido ese tiempo se realizó una prueba sensorial con 81 consumidores, resultando un tiempo de VAS de 15 días considerando un rechazo sensorial del 17% - 35% con una confianza del 95%. Finalmente a cada lote se le determinó el porcentaje de inhibición de ECA, observando que la actividad se mantiene constante durante el tiempo de almacenamiento.

(Palabras clave: *proteínas de suero lácteo, hidrólisis enzimática, yogur bebible, actividad inhibitoria de ECA, análisis sensorial*)

SUMMARY

Hypertension is a disease with high prevalence in Mexico. One of the most important systems for regulating blood pressure is the renin-angiotensin-aldosterone system. Bioactive peptides can inhibit angiotensin converting enzyme (ACE) and reach lower blood pressure. Among the most studied antihypertensive peptide precursor proteins are those of dairy origin highlighting whey proteins. In the other hand, dairy products are considered functional and within these, the one that presents a major demand in the national market is yogurt. Therefore, the objective of this work is to develop and to determine the sensory shelf life of a sugar-reduced drinkable yogurt enriched with ACE inhibitor peptides obtained from the process of enzymatic hydrolysis of whey protein isolate (WPI) using papain. For the study of the production of such peptides, a design to 4-factor, (protein concentration, enzyme/substrate ratio, reaction temperature and pH) and 2-level with central points each, was performed in response to ACE inhibitory activity, which was determined *in vitro*. The result was with protein concentration equal to 16 g/L, ratio (E/S) equal to 5, at 75 °C and pH of 5, reaching about 70% inhibition of ECA. Subsequently, the hydrolysate was fractionated using ultrafiltration with the aid of a membrane of 10 kDa, to each fraction was determine the IC₅₀, resulting smaller than the fraction ≤ 10 kDa. We proceeded to formulate three drinking yogurts enriched with 3 different levels of peptides. These formulations were evaluated sensorially by 60 consumers, the result of most preferably yogurt was that containing 748 mg of peptides in 250 ml. This formulation was physicochemically evaluated and its sensory shelf life was evaluated, for which, the yogurt was stored for 0, 7, 14, 21 and 28 days at 4 °C, after these stored times, were evaluated sensorially by 81 consumers. It's applied a survival analysis and resulting in a sensory shelf life of 15 days considering a sensory rejection of 17% to 35% with a confidence of 95%. Finally for each storage batch, the percentage of ACE inhibition was determined, as a result we observed that the activity remains constant during the storage time.

(Keywords: *Whey proteins, enzymatic hydrolysis, yoghurt, ACE inhibitory activity, sensory analysis*).

A Dios.

*Porque todas las cosas proceden de Él y existen
por Él y para Él. ¡A Él sea la gloria por siempre!*

Romanos 11:36

A mis padres

María de la Paz Valle y Manuel Vera.

*Por su amor incondicional y ser mi
impulso a seguir adelante. Los amo*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios, porque gracias a Él estoy viva y he llegado hasta donde estoy; además de la hermosa familia que me dio.

A mi familia, especialmente a mis padres por el apoyo incondicional, la motivación, consejos brindados y sobre todo por creer y confiar en mí.

A mi asesora la Dra. Silvia Lorena Amaya Llano, por confiar en mí y guiarme para la realización y culminación de este proyecto. Quien con su experiencia, consejos y conocimientos me ha ayudado a mi formación como investigadora.

A mis sinodales, el Dr. Eduardo Castaño, la Dra. Rosalía Reynoso, Dra. Minerva Ramos y la Dra. Beneranda Murúa por sus conocimientos, tiempo y consejos aportados a este proyecto y por ser un pilar fundamental para mi formación.

A mis amigas Caro, Lili, Ale y Diana por hacer cada momento especial y divertido, porque sin ustedes estos años no hubiera sido lo mismo. Las quiero mucho.

A mis compañeros de laboratorio por su disposición para ayudarme siempre y por sus conocimientos brindados, por su ayuda, consejos y su amistad.

A la MC. Lucia Abadía, por su apoyo que me dio siempre, por guiarme y por creer en mí, por su confianza, tiempo y sobre todo por su amistad. Gracias por tus consejos y por ayudarme a crecer como persona. Te quiero mucho.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para poder financiar mis estudios del posgrado de Maestría en Ciencias y Tecnología de los Alimentos.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, principalmente a la Facultad de Química, al Posgrado de Alimentos y a la Planta de Productos Lácteos del Parque Biotecnológico por los equipos y las instalaciones prestadas para el cumplimiento de los objetivos de éste proyecto.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
2.1 Bebidas funcionales	2
2.2 Bebidas lácteas en México	3
2.2.1 Leches fermentadas	3
2.2.1.1 Yogur	5
2.3 Suero de Leche	6
2.3.1 Proteínas de Suero de Leche	7
2.4 Hidrólisis proteica	9
2.4.1 Hidrólisis enzimática	10
2.4.1.1 Papaína (EC 3.4.22.2)	10
2.4 Péptidos bioactivos	10
2.4.1 Péptidos con propiedades antihipertensivas	11
2.5 Hipertensión arterial	14
2.5.1 Epidemiología de la hipertensión	14

2.5.2 Tratamiento para prevención y control	15
2.6 Sistema Renina – Angiotensina	15
2.6.1 Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)	16
JUSTIFICACIÓN	17
OBJETIVOS	18
4.1 Objetivo general	18
4.2 Objetivos específicos	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1 Materia prima	19
5.1.1 Péptidos antihipertensivos	19
5.1.2 Leche	19
5.1.3 Endulzantes y estabilizantes	19
5.1.4 Cultivos lácticos	20
5.2 Métodos	20
5.2.1 Estudio de las condiciones de la hidrólisis enzimática	20
5.2.1.1 Determinación de la actividad inhibitoria de ECA.	21
5.2.1.2 Fraccionamiento de los hidrolizados	22
5.2.2 Formulación de yogur bebible	23
5.2.3 Prueba sensorial de preferencia	26
5.2.4 Caracterización de la formulación de yogur seleccionada	26
5.2.4.1 pH	26
5.2.4.2 Acidez titulable	26
5.2.4.3 Sólidos totales y humedad	27

5.2.4.4 Cenizas	27
5.2.4.5 Proteína	28
5.2.4.6 Grasa	29
5.2.4.7 Carbohidratos	29
5.2.5 Estudio de vida de anaquel sensorial del yogur	29
5.2.5.1 Análisis microbiológicos.	30
5.2.5.2 Prueba sensorial de aceptación o rechazo.	31
5.2.5.3 Obtención del extracto soluble del yogur	31
5.2.5.4 Estabilidad de los péptidos en el yogur	31
5.2.6 Análisis estadístico	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
6.1 Estudio de las condiciones de hidrólisis enzimática	34
6.2 Selección de la formulación de yogur de mayor preferencia	38
6.3 Caracterización de la formulación de yogur seleccionada	39
6.4 Vida de anaquel sensorial	40
6.4.1 Análisis microbiológicos	40
6.4.2 Estimación de la vida de anaquel sensorial	40
6.4.3 Estabilidad de los péptidos durante la vida de anaquel	43
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	49
APENDICE	57

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación de las leches fermentadas	4
Cuadro 2. Especificaciones fisicoquímicas para el yogur	5
Cuadro 3. Contenido de proteínas presentes en el suero dulce	8
Cuadro 4. Actividad biológica de las proteínas de suero lácteo	9
Cuadro 5. Péptidos antihipertensivos inhibidores de ECA derivados de proteínas de suero de leche	13
Cuadro 6. Diseño experimental para la optimización de las condiciones de hidrólisis.	21
Cuadro 7. Formulación de yogur bebible	24
Cuadro 8. Comportamiento de los porcentajes de inhibición de ECA de acuerdo a la interacción de la relación (E/S) y concentración de proteína utilizada para la hidrólisis enzimática con papaína.	35
Cuadro 9. Comparación de la concentración mínima requerida para inhibir el 50% de la actividad de la enzima (IC_{50}) del hidrolizado total y de las dos fracciones obtenidas.	37
Cuadro 10. Composición porcentual de la caracterización fisicoquímica del yogur natural enriquecido con péptidos	39
Cuadro 11. Información nutrimental por porción del yogur	39
Cuadro 12. Comparación de la concentración mínima requerida para inhibir el 50% de la actividad de la enzima (IC_{50}) del yogur enriquecido con péptidos a los 0, 14 y 28 días de almacenamiento a 4 °C.	46

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Suero lácteo dulce	7
Figura 2. Acción y componentes del Sistema renina-angiotensina-aldosterona.	16
Figura 3. Esquema general de la metodología empleada	20
Figura 4. Equipo de ultrafiltración	23
Figura 5. Diagrama general de las dos etapas para la elaboración del yogur bebible.	25
Figura 6. Comportamiento del porcentaje de inhibición de ECA respecto a la temperatura (T), pH e interacción [Proteína]*(E/S)	34
Figura 7. Porcentaje de inhibición de ECA de los productos obtenidos bajo diferentes condiciones de hidrólisis de suero dulce con papaína.	36
Figura 8. Color del hidrolizado total y de la fracción ≤ 10 kDa	37
Figura 9. Preferencia de los consumidores de yogur bebible para cada una de las formulaciones.	38
Figura 10. Comparaciones de modelos ajustados y resumen de los datos de la evaluación sensorial.	41
Figura 11. Ajuste del modelo SEV a los datos de la evaluación sensorial del yogur.	42
Figura 12. Perfil de distribución para la estimación del tiempo de vida de anaquel sensorial	43
Figura 13. Cromatograma obtenido por RP-HPLC de las muestras de la reacción del HHL más ECA	44
Figura 14. Comparación del porcentaje de inhibición de ECA entre el tratamiento y el control durante 28 días de almacenamiento a 4 °C	45
Figura 15. Comportamiento del porcentaje de inhibición de ECA del yogur enriquecido con péptidos durante 28 días de almacenamiento a 4 °C	45

INTRODUCCIÓN

Debido a que la hipertensión arterial es una enfermedad que tiene una alta prevalencia en México, situándose sus complicaciones dentro de las principales causas de mortalidad en este país (Campos Nonato *et al.*, 2013), existen alternativas que coadyuvan al tratamiento de esta enfermedad.

Unos de estos coadyuvantes son los péptidos que tienen la capacidad de inhibir a la enzima convertidora de angiotensina (ECA), la cual forma parte del sistema renina-angiotensina-aldosterona, siendo uno de los principales sistemas reguladores de la presión arterial.

Existen diferentes fuentes proteicas capaces de generar péptidos de interés biológico, siendo de las más importantes las proteínas de origen lácteo, destacando el suero de leche, ya que es un subproducto generado por la industria quesera que tiene un alto valor nutrimental principalmente por su contenido de proteínas (β -lactoglobulina, α -lactoalbumina y el glicomacropéptido). La hidrólisis de este tipo de proteínas a través de enzimas vegetales, que se encuentran comercialmente disponibles, es una opción para la obtención de péptidos de interés, los cuales se pueden utilizar como ingredientes funcionales para ser incorporados en el desarrollo de alimentos y/o bebidas.

Dentro de las bebidas consideradas como funcionales, de acuerdo a su valor nutrimental se encuentran los derivados lácteos. Siendo la industria del yogur la más dinámica y con mayor demanda.

ANTECEDENTES

2.1 Bebidas funcionales

Un alimento funcional está definido como aquel que tiene apariencia similar a un alimento convencional, pero sus ingredientes tienen un efecto benéfico, fisiológico o de prevención para reducción de riesgos de enfermedades crónicas de quien lo consume, más allá de la nutrición básica que debe proporcionar (Roberfroid, 2002).

El consumo de bebidas funcionales se ha incrementado a través de los años en todo el mundo, debido a que son un buen vehículo para incorporar nutrientes y compuestos bioactivos, por lo que logran satisfacer la demanda del mercado y de los consumidores (Corbo *et al.*, 2014).

Las bebidas lácteas fermentadas y la leche fortificada con ingredientes funcionales, fueron parte de la primera generación de bebidas funcionales; siendo los productos que incluyen probióticos un éxito en el mercado, dando pie para el nuevo desarrollo de productos funcionales derivados de subproductos de lácteos (Seyhan *et al.*, 2016).

El mercado de alimentos funcionales se encuentra en constante crecimiento, debido a que se ha aumentado el interés de los consumidores en el aspecto nutricional y el bienestar que les pueden proveer este tipo de productos. Los derivados lácteos ocupan el 43% de los alimentos funcionales que existen en el mercado, dentro de éstos la mayoría corresponden a productos fermentados (Özer y Kirmaci, 2010).

2.2 Bebidas lácteas en México

La leche y sus derivados son considerados como alimentos básicos en la dieta de los mexicanos, por lo que su consumo se incrementa junto con la tasa de crecimiento de la población. En 2015 se observó un aumento de un 9% en volumen de venta y un 14% en valor actual, en el consumo de bebidas lácteas con sabores de frutas. Considerándose la industria de bebidas lácteas, una de las más dinámicas y con mayor potencial para innovar y satisfacer las necesidades del mercado. (Euromonitor, 2015).

Mundialmente el consumo de leche per cápita se puede clasificar en tres niveles (FAO, 2016):

- Elevado; cuando es mayor a 150 kg *per cápita/año*.
- Medio; con un consumo de 30 a 150 kg *per cápita/año*
- Bajo; consumo menor a 30 kg *per cápita/año*.

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) establece que el consumo recomendable de leche y productos lácteos debe ser mayor a 150 kg *per cápita / año*. Actualmente el consumo promedio de leche y productos lácteos en México es de 131 kg *per cápita / año* (USDA, 2017).

2.2.1 Leches fermentadas

El consumo de alimentos fermentados data desde épocas muy antiguas, sin embargo, fue a inicios del siglo XX donde se conocieron sus beneficios. Actualmente se sabe que los microorganismos confieren características organolépticas y nutricionales a los productos, además de que pueden aumentar la biodisponibilidad de algunos nutrientes y metabolitos (Quirós del Bosque, 2007).

Las leches fermentadas se definen como un producto lácteo obtenido por fermentación de la leche, por diversos cultivos de microorganismos, lo que resulta

en una reducción en el pH, ya sea con o sin coagulación. Se pueden clasificar por el tipo de cultivo utilizado para la fermentación (CODEX STAN 243-2003):

Cuadro 1. Clasificación de las leches fermentadas

LECHE FERMENTADA	CULTIVO UTILIZADO
Yogur	<i>Streptococcus salivarius</i> subesp. <i>thermophilus</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i> .
Yogur en base a cultivos alternativos	<i>Streptococcus thermophilus</i> y toda especie de <i>Lactobacillus</i>
Leche acidófila	<i>Lactobacillus acidophilus</i> .
Kefir	<i>Lactobacillus kefir</i> , especies de genero <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> y <i>Acetobacter</i> . Levaduras: <i>Kluiveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces unisporus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces exiguus</i> .
Kumys	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i> y <i>Kluiveromyces marxianus</i> .

(CODEX STAN 243-2003)

2.2.1.1 Yogur

Se define como el producto obtenido de la fermentación de leche, por medio de la acción de microorganismos (*Streptococcus salivarius* subesp *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*), teniendo como resultado la reducción del pH; puede estar adicionado con otros cultivos alternativos del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Se clasifica por sus componentes en natural y con fruta, este último puede contener hasta 50% (m/m) de ingredientes no lácteos como edulcorantes, frutas, cereales, entre otros. (NOM-181-SCFI-2010).

Cuadro 2. Especificaciones fisicoquímicas para el yogur

	Contenido	Método de Prueba
Proteína Láctea. (% m/m)	Mínimo 2.9% ^{1,2}	Determinación de Proteína por Micro-Kjedahl conforme a la NOM-155-SCFI-2003, numeral 8.5
Grasa Butírica. (% m/m)	Máximo 15%	Método de Caracterización de ácidos grasos conforme a la NMX-F-490-NORMEX-1999, Método para grasa butírica conforme a la NOM-086-SSA1-1994 Apéndice normativo C inciso 1.2 Hidrólisis alcalina
Acidez titulable expresada como porcentaje de Ácido Láctico (% m/m)	Mínimo 0,5%	Método de prueba de bacterias que fermentan los productos, del numeral 8 de la NMX-703-COFOCALEC-2004 o NOM-185-SSA1-2002 Apéndice normativo A inciso 1
Sólidos Lácteos no grasos	Mínimo 8,25%	Determinación de Sólidos no grasos conforme a la NOM-155-SCFI-2003, numeral 8.4

¹ La relación de la caseína proteína láctea presente en el producto final debe ser al menos de 70% (m/m).

² La proporción de proteína láctea respecto a los sólidos lácteos no grasos totales contenidos en el yogurt, no debe disminuir respecto de la proporción de proteína láctea presente originalmente en la leche.

(NOM-181-SCFI-2010)

En 2015 el consumo de yogur en México fue de 8.5Kg *per cápita/año*, incrementándose sus ganancias económicas hasta en un 6% anual, por lo que, la industria del yogur se considera como una de las áreas con mayor potencial de crecimiento, pues se puede ver a este producto como una alternativa saludable (Euromonitor, 2015).

Yogur bebible

El yogur bebible se define como un yogur a base de leche pasteurizada, entra en la categoría de yogur batido con baja viscosidad, por lo que se caracteriza por ser líquido; además de que puede o no incluir fruta (Thompson *et al.*, 2007; Allgeyer *et al.*, 2010).

La demanda de yogur bebible está en constante crecimiento, En 2015 se produjeron 370, 962 toneladas, con un valor de \$7, 639, 922 (SIAP, 2016). Por tanto, se considera una categoría competitiva en la industria láctea.

La preferencia de los consumidores hacia este tipo de yogur está dada por sus características sensoriales, sus beneficios nutricionales y su presentación, ya que sus empaques son individuales y de fácil transporte, lo que resulta conveniente para los consumidores (Thompson *et al.*, 2007).

2.3 Suero de Leche

El suero es un subproducto generado por la industria quesera, resulta de la coagulación de la leche y por cada kilogramo de queso producido se obtienen aproximadamente 9 litros de suero; una pequeña cantidad es destinada como alimento (suplemento) para cerdos u otros animales y como fertilizante. Sin embargo, en su mayoría se desecha, por lo que genera un grave problema ambiental ya que tienen una demanda biológica de oxígeno (dBO) = 35 – 45 Kg/L (Tunick, 2008).

El suero es de gran importancia biotecnológica, ya que se le atribuyen una gran variedad de propiedades funcionales. Se caracteriza por presentar un alto contenido de lactosa, minerales y proteínas (Kabašinskienė *et al.*, 2014). Sin embargo, la composición del suero depende del método utilizado para la producción del queso; de tal manera que se puede obtener suero dulce y suero ácido (Onwulata y Huth., 2009).



Figura 1. Suero lácteo dulce

2.3.1 Proteínas de Suero de Leche

Las proteínas contenidas en el suero representan aproximadamente el 20% de las proteínas totales de la leche, éstas se caracterizan por tener una gran digestibilidad y un alto porcentaje de aminoácidos de cadena ramificada como leucina, isoleucina y valina; por lo que se consideran con un excelente valor nutricional (Kabašinskienė *et al.*, 2014).

Estas proteínas de suero son de gran importancia para aumentar el valor nutricional en diversos productos que presentan propiedades funcionales (Seyhan *et al.*, 2016), por lo que son ampliamente utilizadas, principalmente como suplementos alimenticios y en la creación de nuevos productos alimenticios que presenten un alto valor biológico (Onwulata y Huth., 2009).

Dentro de las proteínas mayoritarias presentes en el suero lácteo se encuentran la β -lactoglobulina (β -LG), la α -lactoalbúmina (α -La) y el glicomacropéptido (GMP), sin embargo, existen en menor proporción otro tipo de proteínas. En Cuadro 3, se observan el tipo y cantidad de proteínas presentes en el suero dulce (Onwulata y Huth., 2009).

Cuadro 3. Contenido de proteínas presentes en el suero dulce

Proteína	Contenido (%)	Peso molecular (Kg/mol)
β – Lactoglobulina (β -LG)	48 – 58	18
α – Lactoalbúmina (α -La)	13 – 19	14
Glicomacropéptido (GMP)	12 – 20	8.6
Seroalbúmina Bovina (BSA)	6	66
Inmunoglobulina (Igs)	8 – 12	150
Lactoferrina (LF)	2	77
Lactoperoxidasa	0.5	78

(Onwulata y Huth., 2009).

Diversos estudios han mostrado efectos biológicos de proteínas de suero tanto en animales y en humanos; por otro lado, estas proteínas al ser hidrolizadas liberan una gran variedad de péptidos con diversas actividades biológicas (Baró *et al.*, 2001). Además de que son una fuente muy importante de nitrógeno y de aminoácidos esenciales y contienen en su estructura primaria secuencias de péptidos que son capaces de inhibir a la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (FitzGerald y Meisel 1999).

En el Cuadro 4 se muestran diversas actividades biológicas que se le atribuyen a algunas de las proteínas presentes en el suero de leche.

Cuadro 4. Actividad biológica de las proteínas de suero lácteo

Proteína	Actividad biológica
Proteína de suero total	Anticarcinogénico, inmunoestimulador e hipocolesterolémico
β – lactoglobulina, β- lactorfina	Función digestiva, agonista opioide
α – lactoalbumina, α - lactorfina	Anticarcinogénico, agonista opioide
Lactoferrina	Antimicrobiano, inmunoestimulador, antiinflamatorio, antihipertensivo y anticarcinogénico
Lactoferricina	Antimicrobiano
Inmunoglobulinas	Inmunidad pasiva
Lactoperoxidasa	Antibacteriano

(Baró *et al.*, 2001)

Por ello actualmente, el suero de leche es utilizado para la elaboración de numerosos productos, en los que se aprovechan las propiedades funcionales que proporciona.

2.4 Hidrólisis proteica

Para aumentar el rendimiento de las proteínas se utilizan tecnologías de membrana, como la ultrafiltración o nanofiltración, las cuales permiten separar la proteína de los demás componentes del suero lácteo (Parra, 2009). Al aplicar un tratamiento de hidrólisis, se generan diversos péptidos con actividades biológicas, generalmente esta hidrólisis ocurre *in vivo*, por acción de enzimas gastrointestinales (Aleixandre *et al.*, 2008).

2.4.1 Hidrólisis enzimática

El empleo de enzimas específicas durante la hidrólisis proteica, puede mejorar la actividad biológica de los hidrolizados, las enzimas mayormente utilizadas son las de origen animal y microbiano; sin embargo, como una alternativa natural se encuentran las enzimas vegetales, las cuales presentan una alta actividad proteolítica y se encuentran disponibles comercialmente (Aleixandre *et al.*, 2008). Estos hidrolizados enzimáticos de proteínas de suero lácteo, son utilizados dentro de dietas especiales para lactantes y adultos enfermos principalmente (Tello *et al.*, 1994). Además estos hidrolizados enzimáticos son ricos en oligopéptidos (dipéptidos y tripéptidos), los cuales son completamente absorbidos a nivel digestivo, por lo que se utilizan en varios países como suplementos en la dieta (Parra, 2009).

2.4.1.1 Papaína (EC 3.4.22.2)

Es una enzima proteolítica de origen vegetal, proviene de la papaya tropical (*Carica papaya*) y pertenece al grupo de las cisteinproteasas. Está compuesta por una cadena polipeptídica plegada de 212 residuos con un peso molecular de 23 KDa y su sitio activo contiene un residuo de cisteína, actúa sobre aminoácidos hidrofóbicos como Val y Leu (Benítez *et al.*, 2008; Nie *et al.*, 2007; Drenth *et al.*, 1971; Drenth *et al.*, 1968).

Esta enzima presenta una alta estabilidad, ya que puede tener actividad en un intervalo de temperatura de 40 a 75°C y un intervalo de pH de 5 a 8, por lo cual, tiene diversas aplicaciones, resaltando su uso la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria (Benítez *et al.*, 2008; Nie *et al.*, 2007).

2.4 Péptidos bioactivos

Son secuencias de aminoácidos que se encuentran inactivos en la proteína precursora, pero ya que ésta es sometida a una hidrólisis enzimática o química, se liberan y ejercen diversas actividades biológicas. Son pequeños, por lo general

constan de 3 a 20 aminoácidos, aunque hay excepciones de péptidos más grandes (Meisel *et al.*; 1989).

Los péptidos provenientes de fuentes animales, poseen diversas actividades biológicas como antihipertensivas, antioxidantes, antimicrobianas y antiproliferativas. La leche es uno de los alimentos que posee estos péptidos bioactivos, siendo de gran impacto pues se encuentra de manera abundante en la dieta de los seres humanos (Kadam *et al.*, 2015). Cabe mencionar que los péptidos bioactivos más estudiados son los provenientes de productos lácteos (Korhonen H *et al.*; 2003).

Se han descrito una gran cantidad de péptidos bioactivos derivados de la leche, algunos de los más importantes con efectos sobre el sistema cardiovascular son los antihipertensivos y antitrombóticos; los primeros principalmente actúan sobre la enzima convertidora de angiotensina, siendo tres péptidos de la α – S1 caseína y la β – caseína los que poseen esta actividad (Baró *et al.*, 2001).

Actualmente se han desarrollado diversos productos funcionales que contienen péptidos, sin embargo, diversos estudios muestran que dependiendo del tipo y la fuente de donde se aislaron es la actividad que presentan (Baró *et al.*, 2001).

2.4.1 Péptidos con propiedades antihipertensivas

Esta clase de péptidos son los más estudiados en el área de alimentos, pues muestran una gran actividad por la inhibición de la ECA. (Wang *et al.*, 2005).

Se sabe que actúan mediante una inhibición competitiva. Esta clase de péptidos bioactivos particularmente tienen una secuencia de 2 a 12 aminoácidos, exceptuando algunos péptidos que han demostrado tener actividad con secuencias de hasta 27 aminoácidos. Diversos estudios muestran que la actividad inhibitoria de ECA está regida principalmente por residuos de aminoácidos hidrofóbicos como

Pro, siendo mayor la actividad de estos péptidos antihipertensivos si está presente en cada una de las tres posiciones C-terminales, también la presencia de Lys y de Arg aumenta la potencia inhibitoria (López-Fandiño *et al.*, 2006).

Estudios en el área de la ciencia y la tecnología de alimentos asocian péptidos bioactivos derivados de caseína y de proteínas de suero de leche con una actividad inhibitoria de ECA (Brandelli *et al.*, 2015).

Los péptidos con capacidad de inhibir a ECA, se han vuelto de gran interés, ya sea como agentes preventivos para el control de la hipertensión y como ingredientes activos en la formulación de alimentos funcionales (Power *et al.*, 2014)

Hata y colaboradores (1996), evaluaron un placebo controlado de un producto fermentado japonés (Calpis™) con cepas de *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae* sobre la presión sanguínea de 30 individuos que padecía hipertensión, se encontró que a la octava semana con el tratamiento de Calpis su presión disminuyó en 14.1 mm/Hg y la presión sanguínea diastólica disminuyó en 6.9 mm/Hg. Esto se atribuye a que se encontraron dos tripéptidos con actividad antihipertensiva Val-Pro-Pro (VPP) e Ile-Pro-Pro (IPP).

Sipola y colaboradores (2001), mostraron el efecto antihipertensivo de péptidos de VPP e IPP en ratas SHR; mostrando que estos péptidos se encontraban en una leche fermentada con *Lactobacillus helveticus* un efecto antihipertensivo. La ingesta que se dio fue de 150 ml/día durante varias semanas, ocasionando una disminución de la presión arterial. Este producto fue comercializado en Finlandia con el nombre de “Evolus” por la empresa Valio.

En el Cuadro 5 se presentan la secuencia de diversos péptidos obtenidos a partir de la hidrólisis de proteínas de suero lácteo de origen bovino y caprino, utilizando enzimas de origen animal y microbiano.

Cuadro 5. Péptidos antihipertensivos inhibidores de ECA derivados de proteínas de suero de leche

Origen	Tratamiento enzimático	Secuencia de aminoácidos	Referencia
Bovino β-LG	Pepsina y tripsina	IIAEK	Power, Fernández <i>et al.</i> , (2014)
		IPAVFK	
	Proteínasa K	IPA	Abubakar, Saito, Kitazawa, Kawai, and Itoh (1998)
	Tripsina	ALPMHIR	Mullally, Meisel, and FitzGerald (1997)
	Pepsina, después tripsina y quimiotripsina	CMENSA	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> , (2000)
	Proteasa de <i>Cynara cardunculus</i>	DAQSAPLRVY	Tavares, Contreras <i>et al.</i> , (2011), Tavares, Monteiro <i>et al.</i> , (2011)
Bovino α-LA	Proteínasas crudas de <i>Lactobacillus helveticus</i> LB10	RLSFNP	Pan and Guo (2010)
	Pepsina y tripsina	LAHKAL	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> , (1998)
	Microbiota de queso	WLAHK	Didelot <i>et al.</i> , (2006)
	Tripsina	WLAHK	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> , (2000)
	Proteasa de <i>Cynara cardunculus</i>	RELKDL	Tavares, Contreras <i>et al.</i> , (2011), Tavares, Monteiro <i>et al.</i> , (2011)

Adaptado de Brandelli *et al.*, 2015.

Chen y colaboradores (2010), mostraron que la leche fermentada (koumiss), es rica en péptidos con actividad inhibitoria de la ECA. Se encontraron diversas secuencias de aminoácidos (YQDPRLGPTGELDPATQPI-VAVHNPVIV, PKDLREN, LLLAHL, y NHRNRMMD-HVH) por medio de la hidrólisis con pepsina, tripsina y quimotripseína. Calificando al koumiss como una bebida con efectos benéficos a la salud.

2.5 Hipertensión arterial

Se presenta cuando la tensión sistólica es igual o superior a 140 mmHg y la tensión diastólica igual o superior a 90 mmHg. Algunas de las consecuencias de la hipertensión arterial es que puede causar insuficiencia renal, ceguera y ruptura de los vasos sanguíneos, entre otros (OMS 2013).

Esta enfermedad es considerada como uno de los principales problemas de salud pública. Se tiene registrado que las complicaciones de esta enfermedad son la causa de muerte de 9.4 millones de personas por año en el mundo, siendo aproximadamente el 45% de éstas por cardiopatías y el 51% por accidente cerebrovascular (Lim *et al.*, 2012).

De igual manera se reporta mundialmente mayor prevalencia en hombres que en mujeres (Wong *et al.*, 2014).

Estudios del 2008 mostraron que el 40% de los adultos mayores a 25 años padecían hipertensión arterial, observando un aumento considerable de 600 millones en 1980 a 1000 millones en 2008, siendo algunos de los factores los cambios de vida en la dieta, el consumo de alcohol y tabaco, el sedentarismo, el estrés y el aumento de la población (OMS 2013).

En México se sabe que aproximadamente un cuarto de la población padece hipertensión arterial (ENSANUT 2016)

2.5.1 Epidemiología de la hipertensión

En Latinoamérica, el 13% de decesos se atribuye a esta enfermedad (Bendersky *et al.*, 2013).

En México 30.7 % de mujeres y 32.3 % de hombres padecen hipertensión. Las personas mayores de 60 años muestran una prevalencia de 3.4 veces más que individuos jóvenes entre 20 a 29 años. De igual manera la prevalencia es 1.3 veces

más alta en adultos obesos y 1.4 veces más alta en personas que padecen diabetes (Campos-Nonato *et al.*, 2013).

2.5.2 Tratamiento para prevención y control

La principal forma de prevenir esta enfermedad es adoptando estilos de vida saludables: dejar el consumo de tabaco; dieta baja en grasas saturadas, trans, colesterol y sodio, y con alto consumo de verduras, cereales y lácteos; además de realizar alguna actividad física.

Para su tratamiento se utiliza un grupo de fármacos antihipertensivos, los cuales en su mayoría actúan sobre el sistema renina-angiotensina-aldosterona, inhibiendo a la enzima convertidora de angiotensina. Dentro de este grupo de fármacos se encuentran captopril, enalapril, lisinopril y ramipril; además de que son de gran importancia por su efecto nefroprotector (Chobanian *et al.*, 2003).

2.6 Sistema Renina – Angiotensina

Existen diferentes mecanismos encargados de regular la presión arterial en nuestro cuerpo, sin embargo, el más importante es el sistema renina angiotensina aldosterona.

Este sistema es un regulador de las funciones cardiovascular y renal, siendo su función principal la regulación de la presión arterial. Para esto se comienza con la liberación de la renina, la cual es secretada por el riñón, por otro lado, el hígado secreta el angiotensinógeno para que la renina actúe sobre este y libere la angiotensina I (Ang-I) que por acción de la ECA se convertirá en angiotensina II (Ang-II). La angiotensina II, es reconocida por dos receptores, conocidos como AT1 y AT2, siendo el primero el encargado de la vasoconstricción en las arterias, lo que provoca el aumento de la presión arterial (Contra *et al.*; 2008).

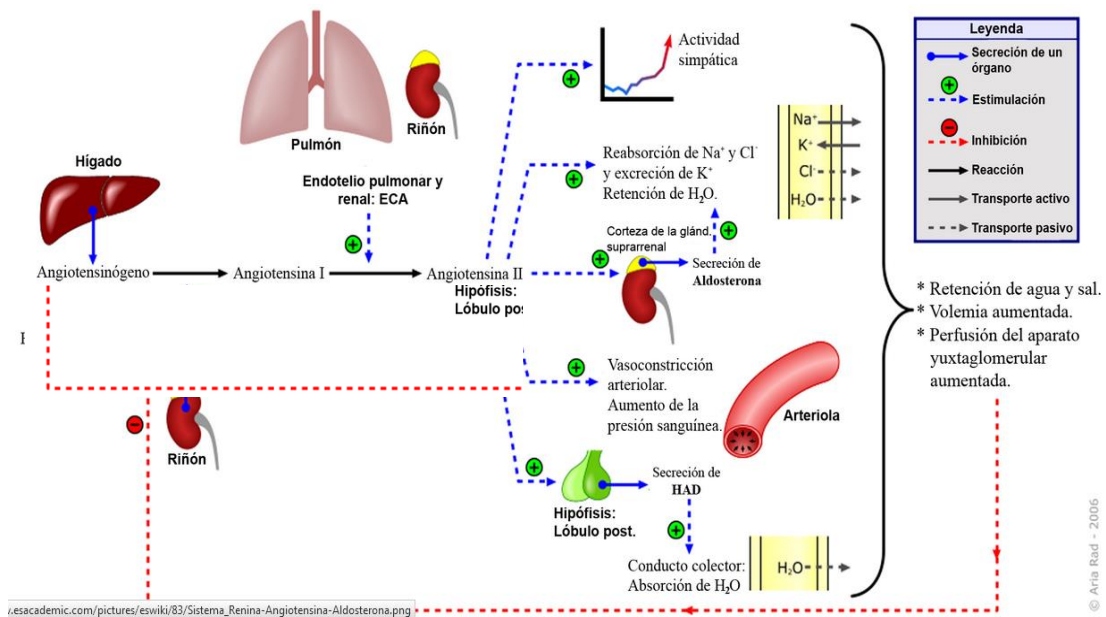


Figura 2. Acción y componentes del Sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Aria-Rad, 2006.

(<http://www.esacademic.com/dic.nsf/eswiki/84935>).

2.6.1 Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)

La ECA (3.4.15.1) es una glicoproteína formada por 1278 aminoácidos y pertenece a la familia de las metalopeptidasas siendo dependiente de zinc. Su principal función biológica recae en catalizar la hidrólisis de una gran cantidad de oligopéptidos, jugando un papel sumamente importante en la regulación de la presión arterial pues se encarga de la conversión de Ang-I por hidrólisis del C-terminal de His-Leu para dar Ang-II (vasopresor); de igual manera se encarga de la inactivación de la bradiquinina (vasodilatador) (Sturrock *et al.*, 2004). Una de las condiciones óptimas para ECA es a pH entre 7 y 8 y se sabe que disminuye su actividad drásticamente con la disminución del pH (Contra *et al.*, 2008).

JUSTIFICACIÓN

Los productos lácteos por su naturaleza, son considerados como productos funcionales, principalmente por las proteínas y minerales que presentan. Dentro de la industria láctea, una de las más importantes y con mayor demanda en México es la del yogur. Por otro lado, la industria quesera genera en gran medida suero lácteo, que es un subproducto con gran impacto ambiental, sin embargo, es una fuente importante de proteínas y de péptidos bioactivos.

México en el segundo lugar a nivel Latinoamérica en el consumo de lácteos, siendo el yogur bebible uno de los preferidos por los consumidores, en 2015 se produjeron 370, 962 toneladas, con un valor de \$7, 639, 922. Actualmente los consumidores prefieren productos con menor contenido energético, menor cantidad de grasa y que adicionalmente tengan un efecto benéfico en la salud, por lo que se ha incrementado la demanda hacia los productos funcionales.

Por otro lado, las enfermedades cardiovasculares son un problema grave de mortalidad en México, siendo la hipertensión arterial el primer factor de riesgo, además de que la población mexicana tenga una alta predisposición a padecer hipertensión, por lo que actualmente un cuarto de la población mexicana la padece. Resaltando dentro de su etiología el estilo de vida, en donde se pueden modificar los hábitos en la alimentación.

Se propone formular un yogur, que además de proporcionar los aportes nutricionales característicos, esté enriquecido con compuestos bioactivos, en este caso, péptidos obtenidos a partir de hidrolizados de proteínas de suero de leche que sean capaces de inhibir a ECA y por consecuencia lograr una disminución y posible regulación en la presión arterial.

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Desarrollar un yogur bebible reducido en azúcar enriquecido con péptidos bioactivos obtenidos a partir del estudio del proceso de hidrólisis enzimática de proteínas de suero lácteo utilizando papaína y determinar su vida de anaquel sensorial.

4.2 Objetivos específicos

1. Estudiar las condiciones de hidrólisis enzimática de la proteína de suero lácteo con papaína y fraccionar utilizando la tecnología de membrana.
2. Formular yogures bebibles reducidos en azúcar enriquecidos con tres niveles de péptidos bioactivos y seleccionar la mejor formulación empleando un análisis sensorial.
3. Determinar la actividad de los péptidos en el yogur durante su vida de anaquel sensorial.

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materia prima

5.1.1 Péptidos antihipertensivos

Estos péptidos se obtuvieron mediante hidrólisis enzimática de una solución a 16 g/L de concentrado de proteínas de suero de leche (WPI) disueltas con agua purificada, la enzima utilizada fue papaína de grado alimenticio de la marca ENZECO®. Posterior a la hidrólisis, los hidrolizados fueron fraccionados para finalmente pasteurizarlos para la incorporación en el yogur.

5.1.2 Leche

Se empleó leche entera proveniente del rancho de la Universidad Autónoma de Querétaro, que se encuentra en el Campus Amazcala ubicado en la Carretera a Chichimequillas s/n km 1, El Marqués, Querétaro. Para el yogur el 50 % de la leche a utilizar fue descremada utilizando una descremadora de la marca Elecrem Modelo 1 (Elecrem, Vanves, France); posteriormente, se prosiguió a homogenizar la leche entera y la descremada, estandarizarla y pasteurizarla. Todo ello se llevó a cabo en la Planta Piloto de Productos Lácteos ubicada en el Parque Biotecnológico de la Universidad Autónoma de Querétaro.

5.1.3 Endulzantes y estabilizantes

Se utilizó como endulzante una mezcla de azúcar y Splenda® (5 %), reduciendo el nivel de azúcar en un 30 %. Como estabilizantes se emplearon almidón de maíz (0.8 %) y grenetina de la marca Duche® (0.3 %)

5.1.4 Cultivos lácticos

Se emplearon cultivos lácticos comerciales para yogur líquido de la marca Bioprox®, los cuales contienen cepas liofilizadas de *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius spp. thermophilus* adquiridos de IKA-LAC de América S.A. de C.V.

5.2 Métodos

La Figura 3 muestra en manera resumida la metodología que se utilizó para el cumplimiento de los objetivos planteados.

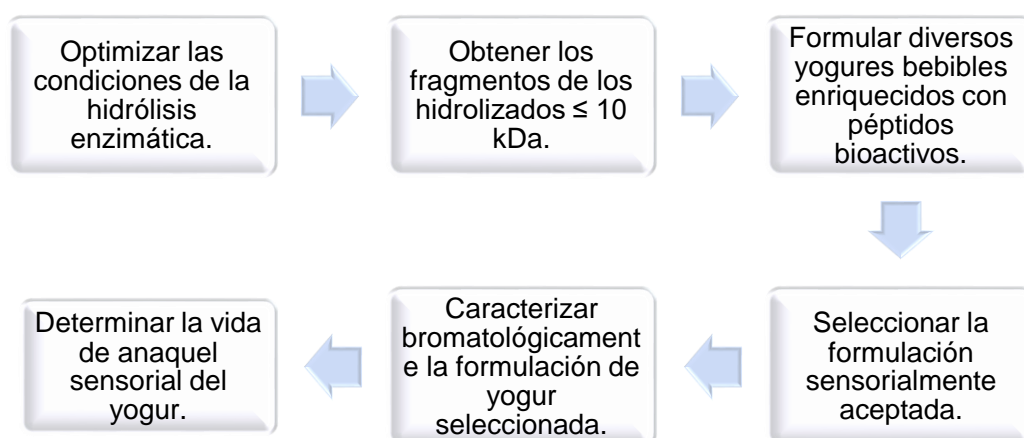


Figura 3. Esquema general de la metodología empleada

5.2.1 Estudio de las condiciones de la hidrólisis enzimática

Se llevó a cabo el estudio de las condiciones de hidrólisis mediante un diseño experimental 2^4 con puntos centrales (Cuadro 6), donde la variable respuesta fue el porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

Para la hidrólisis enzimática con papaína, el concentrado de proteína de suero lácteo se colocó en un reactor enchaquetado con agitación, controlando la temperatura y el pH (con la adición de NaOH 0.1 N y HCl 0.1 N) con la ayuda de un potenciómetro HANNA Instruments (Woonsocket, Rhode Island, Estados Unidos) previamente calibrado con amortiguador a pH 7 y 4. Cada tratamiento se llevó a cabo durante 60 min, se tomaron 4 muestras, en el tiempo 0 (antes de agregar la enzima), a los 15, 37.5 y 60 min; posterior a la hidrólisis se llevó a cabo la inactivación de la enzima por calentamiento a 95 °C durante 10 min. Las muestras se almacenaron a -18 °C hasta sus posteriores análisis.

Cuadro 6. Diseño experimental para la optimización de las condiciones de hidrólisis.

FACTOR	NIVELES		
	Inferior	Punto central	Superior
Concentración de proteína (g/L)	16	24	32
Relación Enzima / Sustrato	2.5	3.75	5
Temperatura (°C)	40	57.5	75
pH	5	6.5	8

5.2.1.1 Determinación de la actividad inhibitoria de ECA.

La determinación de la actividad inhibitoria de ECA se realizó mediante el método reportado por Cushman y Cheung (1971) con modificaciones de Wu *et al*; (2002). Esta metodología consiste en hacer reaccionar al hipuril-histidil-leucina (HHL) con la ECA durante 30 min deteniendo la reacción con HCl 1 N. La acción de la ECA es hidrolizar el HHL en su C-terminal, liberando ácido hipúrico (AH). La inhibición se muestra con una reducción en la formación del ácido hipúrico, éste se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC) para ello se utilizó un sistema Agilent 1200 (columna Zorbax C18; flujo de 0.6 mL/min; temperatura de 25 °C; se utilizaron dos fases, A = H₂O con 0.1 % TFA

y B = Acetonitrilo con 0.1 % TFA, en proporciones 70 % de A y 30 % de B; detector UV visible a $\lambda = 228$ nm).

La actividad inhibitoria de ECA se expresó mediante el porcentaje de inhibición de ECA, el cual se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición de ECA} = \frac{(B - A)}{(B - C)} * 100$$

Donde:

- A = Área obtenida en el RP-HPLC del pico del AH de la muestra analizada
- B = Área obtenida en el RP-HPLC del pico del AH del control (reacción sin el inhibidor, mayor área de AH)
- C = Área obtenida en el RP-HPLC del pico del AH del blanco (reacción sin enzima y sin inhibidor, menor área de AH)

Se seleccionó el tratamiento que presentó el porcentaje de inhibición más alto, para la obtención del ingrediente funcional. Se realizaron hidrólisis con las condiciones del tratamiento que presentó mayor porcentaje de inhibición con una solución de aislado de proteína de suero (WPI), para validar los resultados.

5.2.1.2 Fraccionamiento de los hidrolizados

Se prosiguió a fraccionar utilizando tecnología de membrana por medio de una unidad de ultrafiltración de la marca General Electric (Figura 4) utilizando una membrana de la marca Sterlitech modelo YMPWSP1905 (PW), de polietersulfona (PES) y con un corte de 10 000 Da. A cada fracción resultante y al hidrolizado sin fraccionar se les determinó la actividad inhibitoria de ECA de acuerdo a la metodología descrita anteriormente y se calculó el IC₅₀ para cada una.



Figura 4. Equipo de ultrafiltración

5.2.2 Formulación de yogur bebible

Se utilizó una formulación desarrollada por Murúa-Pagola y Vera-Valle (2017) de yogur bebible semidescremado y reducido en azúcar.

La elaboración del yogur se llevó a cabo en dos etapas: en la primera etapa, se realizó la estandarización de la leche, aquí se añadieron los endulzantes y estabilizantes para proceder a pasteurizarla, después se enfrió a 42 °C y se inoculó con el cultivo e incubó por aproximadamente 4.5 h, hasta alcanzar un pH de 4.2 posteriormente se refrigeró a 4 °C. La segunda etapa consistió en la elaboración de un jarabe que actúa como diluyente para formar el yogur bebible, para la preparación de éste se requirió de agua, grenetina y endulzante. En esta segunda etapa se le añadieron los hidrolizados, por lo que se realizaron tres formulaciones, cada una con diferentes dosis de péptidos la dosis más pequeña se estableció de acuerdo a lo reportado por Alvarado (2012), de 374 mg de péptidos para un yogur de 250 g, partiendo de esta dosis se propuso utilizar otras dos más altas, de 748 mg y 1122 mg. Posteriormente, se mezclaron tres partes de yogur y una parte de jarabe, se batió hasta que estuvo completamente homogéneo y se envasó en

contenedores de polietileno de 250 mL los cuales fueron previamente lavados y esterilizados con luz UV. Finalmente, el producto se almacenó a 4 °C hasta la aplicación de la prueba sensorial de preferencia.

En el Cuadro 7 se muestra la formulación utilizada para la elaboración del yogur bebible reducido en azúcar.

Cuadro 7. Formulación de yogur bebible

YOGUR (Primera etapa)		JARABE DILUYENTE (Segunda etapa)	
Leche entera y descremada	-	Hidrolizados	374 mg/250 g
			748 mg/250 g
			1122 mg/250 g
Endulzante	5 %	Agua	-
Grenetina	0.3 %	Endulzante	5 %
Almidón modificado	0.8 %	Grenetina	0.3 %
Cultivos lácticos bioprox®	-		

Formulación para yogur bebible Múrua-Pagola & Vera-Valle, 2017

Toda la producción de yogur se llevó a cabo en la Planta Piloto de Productos Lácteos de la Facultad de Química UAQ, aplicando buenas prácticas de manufactura para asegurar la inocuidad del producto.

En la Figura 5 se muestra el esquema general para la elaboración del yogur bebible.

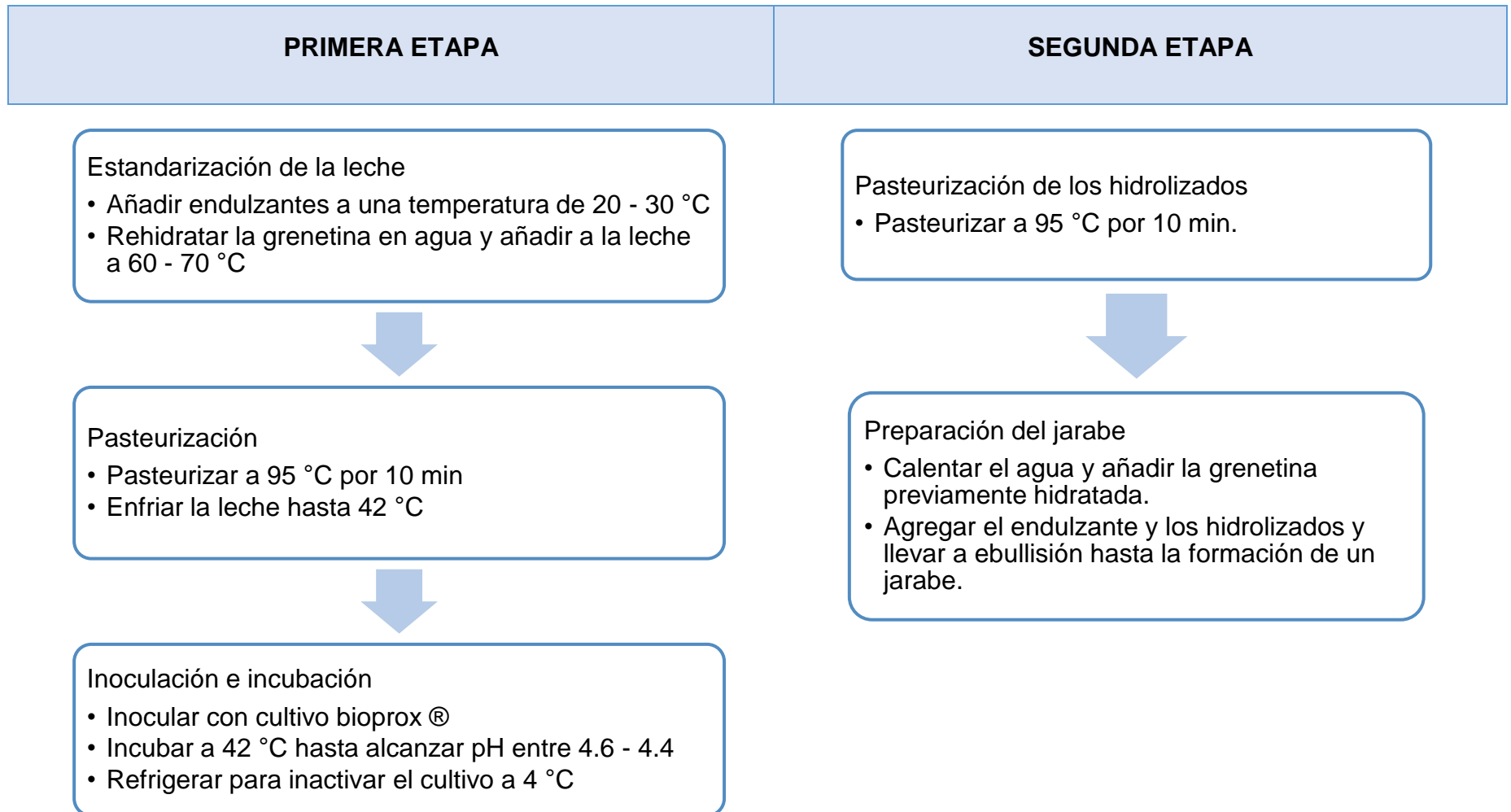


Figura 5. Diagrama general de las dos etapas para la elaboración del yogur bebible.

5.2.3 Prueba sensorial de preferencia

La evaluación sensorial se realizó con la ayuda de 60 consumidores habituales de yogur, los cuales evaluaron de manera general las tres formulaciones para seleccionar la formulación de mayor aceptación. Para ello, se presentaron a cada consumidor las tres formulaciones y se les pidió que las ordenaran de forma decreciente de acuerdo a su nivel de agrado.

5.2.4 Caracterización de la formulación de yogur seleccionada

Todas las mediciones instrumentales realizadas para la caracterización del yogur seleccionado se realizaron por triplicado, obteniendo así el promedio y las desviaciones estándar de cada una de ellas.

5.2.4.1 pH

Se utilizó un potenciómetro digital HANNA Instruments, el cual se calibró con amortiguador a pH 4 y pH 7. Para la determinación, se introdujo el electrodo directamente a la muestra de yogur.

5.2.4.2 Acidez titulable

Consistió en colocar 5 mL de yogur en un matraz Erlenmeyer y diluirlo con 10 mL de agua destilada, se agitó vigorosamente. Posteriormente se añadió 0.5 mL de fenofaleína y se prosiguió a titular con NaOH 0.1 N hasta la aparición de un color rosado que persistió de 15 a 30 segundos. Finalmente se prosiguió a calcular el porcentaje de acidez en el yogur mediante la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Acidez} = ((mL \text{ de NaOH})(N \text{ de NaOH})(9)) / (\text{Peso de la muestra})$$

El porcentaje de acidez se expresó como ácido láctico (Método 16.023 A.O.A.C., 1984)

5.2.4.3 Sólidos totales y humedad

Para esta determinación, se utilizaron crisoles de porcelana a peso constante, a los cuales se les agregó 2 mL de muestra registrando el peso de la muestra. Posteriormente se colocaron los crisoles en la estufa a 60°C durante 24 h, pasado este tiempo se sacaron a un desecador hasta que se enfriaran para posteriormente pesarlos.

La determinación del porcentaje de sólidos totales y del porcentaje de humedad se realizó mediante las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{Sólidos Totales} = \left(\frac{\text{Peso del crisol con muestra seca} - \text{Peso del crisol}}{\text{Peso de la muestra}} \right) * 100$$

$$\% \text{Humedad} = 100 - \% \text{Sólidos Totales}$$

(NMX-F-426-1982).

5.2.4.4 Cenizas

Se utilizó el residuo que quedó en los crisoles para la determinación de sólidos totales. Se prosiguió a calcinar la muestra hasta carbonizarla para después incinerarla en la mufla a 500 °C durante 3 horas. Transcurrido el tiempo se sacaron los crisoles y se dejaron enfriar en un desecador por aproximadamente 30 minutos y finalmente se pesaron. El porcentaje de cenizas y de materia orgánica se calculó mediante las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{Cenizas} \left(\frac{\text{Peso del crisol con las cenizas} - \text{Peso del crisol}}{\text{Peso de la muestra}} \right) * 100$$

$$\% \text{ Materia Orgánica} = 100 - \% \text{ Cenizas}$$

(Método 923.03 A.O.A.C., 2005)

5.2.4.5 Proteína

Se realizó mediante el método Kjeldahl. Se pesaron aproximadamente 5 g de muestra en los tubos de ensaye, se les añadió a cada uno los catalizadores (3.5 g de sulfato de sodio anhidro y 0.4 g de sulfato de cobre pentahidratado) y 25 mL de ácido sulfúrico concentrado; los tubos se colocaron en el digestor Kjeldahl en donde se fue aumentando la temperatura gradualmente de 150°C a 400°C, cuando alcanza la temperatura se deja por 30 minutos o hasta que la digestión este completa. Posteriormente se dejan enfriando las muestras durante unos minutos, ya fríos se agregan 50 mL de agua destilada y se procede a destilar con la adición de NaOH al 40 %. El destilado se recibe en una solución preparada con ácido bórico, verde de bromocresol y rojo de metilo y finalmente se titula con ácido clorhídrico 0.1N.

Para la determinación del porcentaje de proteína primero se calculó el porcentaje de nitrógeno mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Nitrógeno} = \frac{V * N * 0.014 * 100}{m}$$

Donde:

V = volumen del HCl gastado en la titulación (mL)

N = Normalidad del HCl

0.014 = miliequivalente del nitrógeno

M = masa de la muestra (g)

Finalmente se calculó el porcentaje de proteína multiplicando el resultado de obtenido del porcentaje de nitrógeno por 6.38, que es la relación nitrógeno/proteína en la leche (Método 12.1.07 A.O.A.C., 2000. Con modificaciones).

5.2.4.6 Grasa

Este método se basa en la ruptura de la emulsión por la acción del ácido sulfúrico concentrado. La grasa libre puede separarse por centrifugación y por la adición de alcohol isoamílico que actúa como agente tenso activo que permite la separación nítida de las capas de grasa acuosa. Para ello se colocaron en los butirómetros 10 mL de ácido sulfúrico, 11 mL de muestra y finalmente se le añadió 1 mL de alcohol isoamílico. Se taparon los butirómetros y se agitaron vigorosamente hasta que se logró disolver la proteína, posteriormente se invirtieron y se prosiguió a centrifugar durante 5 min a velocidad máxima. Finalmente se colocaron los butirómetros en un baño maría a 65 °C durante 5 min para después de este tiempo leer el porcentaje de grasa (Método Gerber A.O.A.C., 2000.18)

5.2.4.7 Carbohidratos

El contenido de carbohidratos se realizó por diferencia.

5.2.5 Estudio de vida de anaquel sensorial del yogur

Se llevó a cabo un estudio de vida de anaquel sensorial de la formulación seleccionada en la prueba sensorial de preferencia, mediante un diseño en reversa para determinar en qué momento el consumidor rechaza el producto. Fue una prueba de aceptación o rechazo por el producto de los diferentes lotes elaborados a los tiempos 0, 7, 14, 21 y 28 días, los cuales se almacenaron en una cámara de refrigeración a 4 °C. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de supervivencia calculando el tiempo de falla, esto es, el tiempo en el que los

consumidores comienzan a rechazar el yogur formulado considerando un 25 % de rechazo de parte de los consumidores (Hough, 2010).

5.2.5.1 Análisis microbiológicos.

Previo a la prueba sensorial se realizaron los análisis microbiológicos para asegurar la inocuidad de las muestras.

Para la cuantificación de mohos y levaduras se utilizó el método descrito en la NOM-111-SSA1-1994. Se utilizó como medio agar papa-dextrosa, el cual fué esterilizado en autoclave a 121 °C por 15 min y acidificado con ácido tartárico estéril al 10 %. Se mezcló 1 ml de muestra en 9 ml de agua peptonada. Se tomó 1 ml de la dilución y se colocó en una caja Petri a la cual posteriormente se le añadió 20 ml de medio. Se mezclaron con movimientos de arriba abajo, de izquierda a derecha y en sentido de las manecillas del reloj y de lado contrario. Finalmente, ya que estaban solidificadas, se prosiguió a incubarlas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 días. Se realizó conteo de las colonias a los 3, 4 y 5 días.

Para la cuantificación de coliformes totales en placa se utilizó el método descrito en la NOM-113-SSA1-1994. Se utilizó como medio agar de bilis y rojo violeta-lactosa a un pH de 7.4 el cual fue hervido durante 2 min y enfriado a 45 °C. Se mezcló 1 ml de muestra en 9 ml de agua peptonada. Se tomó 1 ml de la dilución y se colocó en una caja Petri a la cual posteriormente se le añadió 20 ml de medio. Se mezclaron con movimientos de arriba abajo, de izquierda a derecha y en sentido de las manecillas del reloj y de lado contrario. Finalmente, ya que estaban solidificadas, se prosiguió a incubarlas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 2 días. Transcurrido ese tiempo se realizó el conteo de coliformes presentes.

5.2.5.2 Prueba sensorial de aceptación o rechazo.

Esta prueba se realizó con la ayuda de 81 consumidores de yogur, a los cuales se les entregó una copia del formato de consentimiento informado, de la misma manera que se realizó para la prueba de preferencia.

A cada uno de los consumidores se les proporcionaron cuatro muestras codificadas aleatoriamente de los distintos tiempos de almacenamiento (0, 7, 14 y 21 días). Se les pidió que evaluaran cada una de las muestras y entre cada muestra limpiaran su paladar con un poco de agua y galleta, finalmente respondieron a la pregunta ¿Comprarían el producto?, con los datos obtenidos se realizó un análisis de supervivencia para determinar el tiempo de vida de anaquel sensorial del yogur.

5.2.5.3 Obtención del extracto soluble del yogur

Se obtuvo un extracto soluble de cada uno de los tiempos de almacenamiento del yogur con péptidos y del control. Para su obtención se utilizó la metodología descrita por Abadía *et al;* (2013) con algunas modificaciones, la cual consiste en centrifugar a 6000 rpm durante 30 min a 4 °C. La fracción soluble se encontró entre la capa superior (grasa) y el precipitado (caseína). Finalmente, la fracción soluble se filtró a través de papel Whatman no 4.

5.2.5.4 Estabilidad de los péptidos en el yogur

Para poder medir la estabilidad de los péptidos, primero se tuvo que determinar a cada uno de los extractos solubles del yogur el contenido de proteína, para poder realizar las diluciones necesarias para la determinación de la actividad inhibitoria de ECA. El contenido de proteína se determinó mediante la técnica descrita por Lowry *et al;* (1951), se utilizó como estándar sero-albúmina bovina (BSA), debido a que es el estándar universalmente aceptado para la cuantificación de proteínas; se preparó una curva estándar de la concentraciones de 1, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/ml se tomaron 100 µL de estándar o de muestra y se le añadió 100 µL de NaOH 2 N. Esta mezcla se incubó para su hidrólisis por 10 min a 100 °C;

transcurrido el tiempo se colocó en un baño de agua fría. Cuando la mezcla estuvo a temperatura ambiente se le adicionó 1 ml del reactivo formado por la mezcla de las soluciones de 2 % de carbonato de sodio (Na_2CO_3), 1 % de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y 2 % de tartrato de sodio y potasio, en proporciones 100:1:1 (por volumen) respectivamente; se mezcló con ayuda de un vortex y se dejó a temperatura ambiente durante 10 min. Finalmente, se añadieron 100 μL de reactivo de Folin 1 N, se mezcló con ayuda de un vortex y se dejó reposar a temperatura ambiente de 30 – 60 min para que se llevara a cabo la reacción; transcurrido el tiempo se procedió a leer la absorbancia a $\lambda = 750 \text{ nm}$ en un espectrómetro Perkin-Elmer Lambda 40 UV/VIS.

Posteriormente, se realizaron las diluciones necesarias para la determinación de la actividad inhibitoria de ECA por el método descrito en la sección 5.2.1.1. En esta ocasión, el ácido hipúrico liberado se cuantificó por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC) para ello se utilizó un sistema Agilent 1200 (columna Zorbax C18; flujo de 0.5 ml/min; temperatura de 30 °C; se utilizaron dos fases, A = H_2O con 0.1 % trifluoroacético (TFA) y B = Acetonitrilo con 0.1 % TFA, se aplicó un gradiente de 5 a 60 % de B durante 10 min, llegando al 60 % de B se mantuvo constante por 2 min, trascurrido el tiempo se llevó hasta 95 % de A; detector UV visible a $\lambda = 228 \text{ nm}$).

Los resultados para cada tratamiento se muestran como el porcentaje de inhibición de ECA, determinado por la misma ecuación mostrada en la sección 5.2.1.1.

5.2.6 Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron en el software JMP versión 11. Para los resultados que se expresaron en la optimización de la hidrólisis enzimática, se tomó como variable respuesta el porcentaje de inhibición de ECA y los resultados se analizaron mediante un ANOVA con 95 % de confianza y $\alpha = 0.05$, aplicando la prueba de Tukey.

Para la selección de la mejor formulación se realizó una distribución para cada una de las formulaciones evaluadas en la prueba sensorial de preferencia, en la cual se seleccionó aquella que presentó un nivel de preferencia mayor.

En la caracterización fisicoquímica del yogur todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se calcularon las medias y sus desviaciones estándar.

En el estudio de vida de anaquel sensorial se realizó un análisis de supervivencia con los datos obtenidos por los 81 consumidores, ajustando un modelo paramétrico y estimando el tiempo de falla del yogur considerando una probabilidad de rechazo por parte de los consumidores del 25 %.

Para la estabilidad de los péptidos durante la vida de anaquel, el porcentaje de inhibición se analizó mediante un ANOVA con 95 % de confianza y $\alpha = 0.05$ y se aplicó la prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Estudio de las condiciones de hidrólisis enzimática

Para el estudio de la actividad enzimática de papaína sobre la proteína de suero de leche se evaluaron diferentes concentraciones de proteína y de enzima, además de distintas condiciones de pH y de temperatura; a cada tratamiento se le determinó la actividad inhibitoria de ECA. Los resultados se muestran en la Figura 3, donde se observa que los factores significativos son la temperatura ($p = 0.0001$), el pH ($p = 0.0173$) y la interacción de concentración de proteína con la relación E / S ($p < 0.0001$).

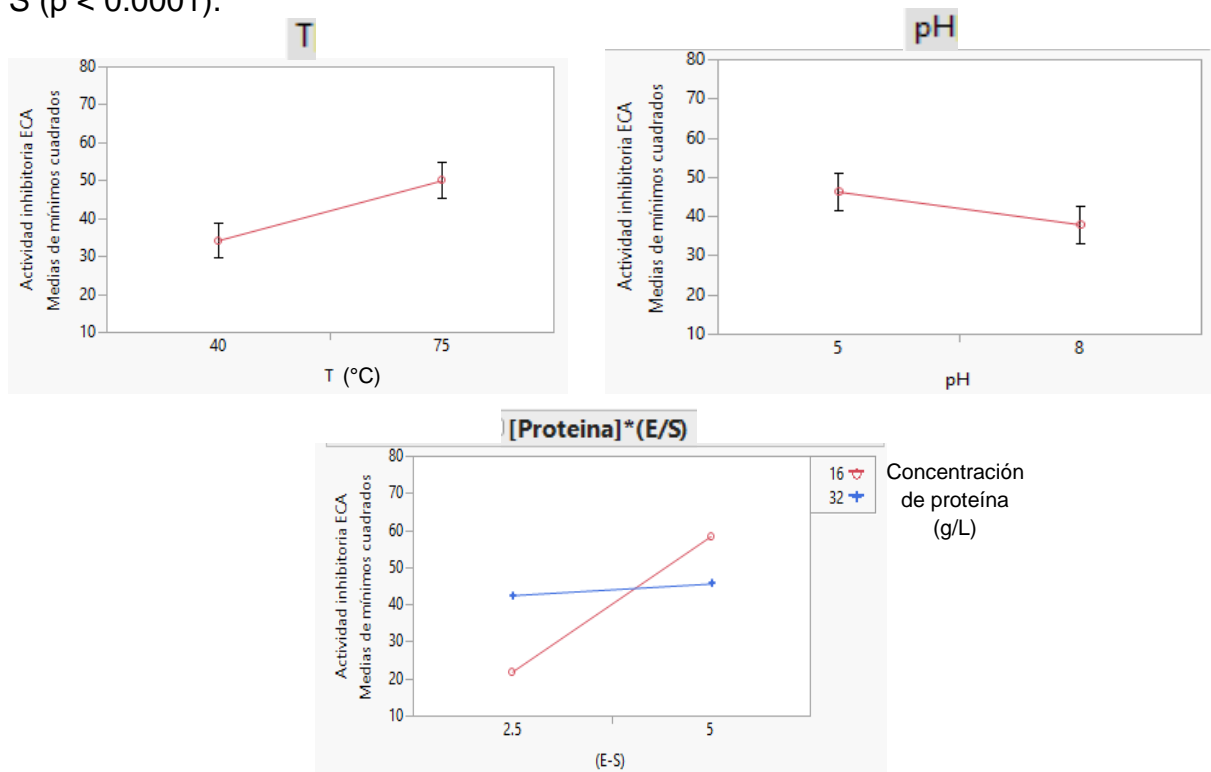


Figura 6. Comportamiento del porcentaje de inhibición de ECA respecto a la temperatura (T), pH e interacción [Proteína]*(E/S)

Los resultados representan los promedios del porcentaje de inhibición de ECA y la relación de cada factor significativo ($n=3$). El modelo se analizó en el software estadístico JMP 11.0.

La temperatura y el pH son factores que influyen en la hidrólisis enzimática de proteínas, Cheison, y Kulozik, (2015) consideran a estos dos factores importantes debido a que interfieren en la estructura tanto de la enzima como de las proteínas a hidrolizar, lo que puede llegar a desnaturalizarla y de esta manera dejar expuestos más sitios catalíticos para que la enzima los hidrolice. Por otro lado, en pH muy ácidos y muy alcalinos aumenta la solubilidad de las proteínas.

Cuadro 8. Comportamiento de los porcentajes de inhibición de ECA de acuerdo a la interacción de la relación (E/S) y concentración de proteína utilizada para la hidrólisis enzimática con papaína.

Relación (E/S)	Concentración de proteína (g/L)	% de inhibición de ECA
2.5	16	21.91 ^c
5	16	58.43^a
2.5	32	42.51 ^b
5	32	45.65^b

Los resultados representan los promedios de los porcentajes de inhibición de ECA para la relación entre la concentración de enzima y proteína de los tratamientos (n=3) ± la DE. Letras diferentes indican que hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Podemos resaltar el efecto de la interacción entre la relación E/S y la concentración de proteína en el Cuadro 8, donde se puede observar que esta interacción es significativa solamente cuando la concentración de proteína es baja y que al tener altas concentraciones de proteína esta interacción resulta no significativa. No se ha reportado el efecto de la interacción entre estos dos factores, sin embargo, este comportamiento puede deberse a algún tipo de inhibición de la enzima debido a la alta concentración de proteína, por algún impedimento estérico causado por el mismo sustrato, impidiendo el acceso de los sustratos a los sitios catalíticos de la enzima (Bode y Huber., 1992).

En la Figura 3 se presenta el porcentaje de inhibición de ECA para cada tratamiento de hidrólisis con papaína. Se alcanzaron porcentajes mayores al 50% de inhibición. El mejor tratamiento presentó un 68 % de inhibición de ECA, las

condiciones de hidrólisis para éste fueron una concentración de proteína de 16 g/L, la relación E/S de 5, temperatura de 75 °C y pH de 5.

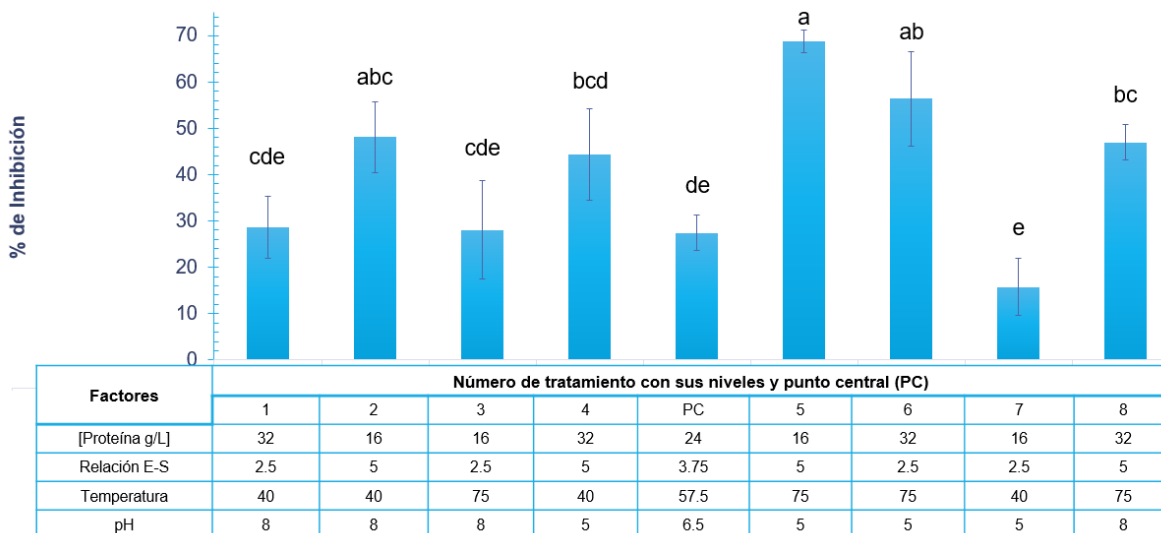


Figura 7. Porcentaje de inhibición de ECA de los productos obtenidos bajo diferentes condiciones de hidrólisis de suero dulce con papaína.

Los resultados representan los promedios de cada tratamiento realizado por triplicado \pm DE del porcentaje de inhibición de ECA. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre los tratamientos de acuerdo a la prueba de Tukey Kramer ($\alpha = 0.05$).

El porcentaje de inhibición que se obtuvo en el mejor tratamiento realizado en este trabajo fue mayor al reportado por Lafarga *et al*; (2016) quienes realizaron hidrolizados de sero-albúmina bovina utilizando papaína, obteniendo porcentajes de inhibición de 40 % para el hidrolizado total y de hasta un 70 - 75 % para las fracciones de 1, 3 y 10 kDa; debido a que para este proyecto se trabajó con aislado de proteína de suero, el cual contiene en mayor cantidad β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, representando de un 70 – 80 % de las proteínas totales del suero y en menor proporción inmunoglobulinas, glicomacropéptidos y sero-albúmina bovina.

Se seleccionó el tratamiento que presentó un mayor porcentaje de inhibición de ECA para elaborar los hidrolizados y fraccionarlos, tanto al hidrolizado

antes de fraccionar y a las dos fracciones obtenidas, se les determinó la actividad inhibitoria de ECA y se calculó el IC₅₀. Los resultados se muestran en el Cuadro 9 y se puede observar que el mejor IC₅₀ lo presenta el hidrolizado total, seguido de la fracción ≤ 10 kDa, sin embargo no existe diferencia estadística significativa entre estos dos. Por otro lado, la fracción > 10 kDa presenta un mayor IC₅₀, lo que indica que la actividad que presenta el hidrolizado total está dada mayormente por la fracción ≤ 10 kDa. Además, se observó que el hidrolizado total presentó un color amarillo opaco y la fracción ≤ 10 kDa un color traslucido (Figura 8), por todo esto y para fines de incorporar péptidos al yogur se decidió trabajar con la fracción ≤10 kDa.

Cuadro 9. Comparación de la concentración mínima requerida para inhibir el 50% de la actividad de la enzima (IC₅₀) del hidrolizado total y de las dos fracciones obtenidas.

Muestra	IC ₅₀ (mg/mL)
Hidrolizado total	335.6 ± 0.0002 ^b
Fracción ≤ 10 kDa	352.7 ± 0.0106 ^b
Fracción > 10 kDa	444.9 ± 0.0350 ^a

Los resultados representan los promedios de cada tratamiento (n=2) ± la DE del IC₅₀. Donde letras iguales indican que no hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos ($\alpha = 0.05$).

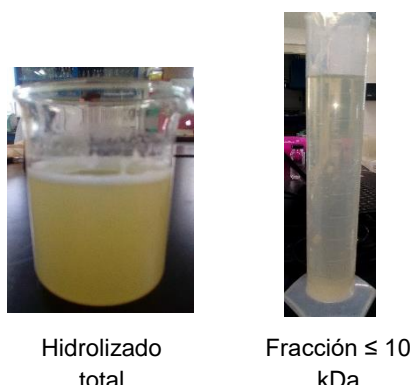


Figura 8. Color del hidrolizado total y de la fracción ≤ 10 kDa

6.2 Selección de la formulación de yogur de mayor preferencia

Se realizó una prueba sensorial de preferencia, en donde se evaluaron tres niveles de péptidos en el yogur bebible. En la Figura 9, se muestra la distribución de preferencia para cada una de las formulaciones evaluadas, en donde la calificación va en orden ascendente de 1 a 3. Se observa que la formulación 2 que contiene una dosis de 758 mg de péptidos por cada 250 ml de yogur obtuvo un 73% de aceptación por parte de los consumidores, por lo que se eligió esta formulación para la caracterización y la evaluación de su vida de anaquel sensorial.

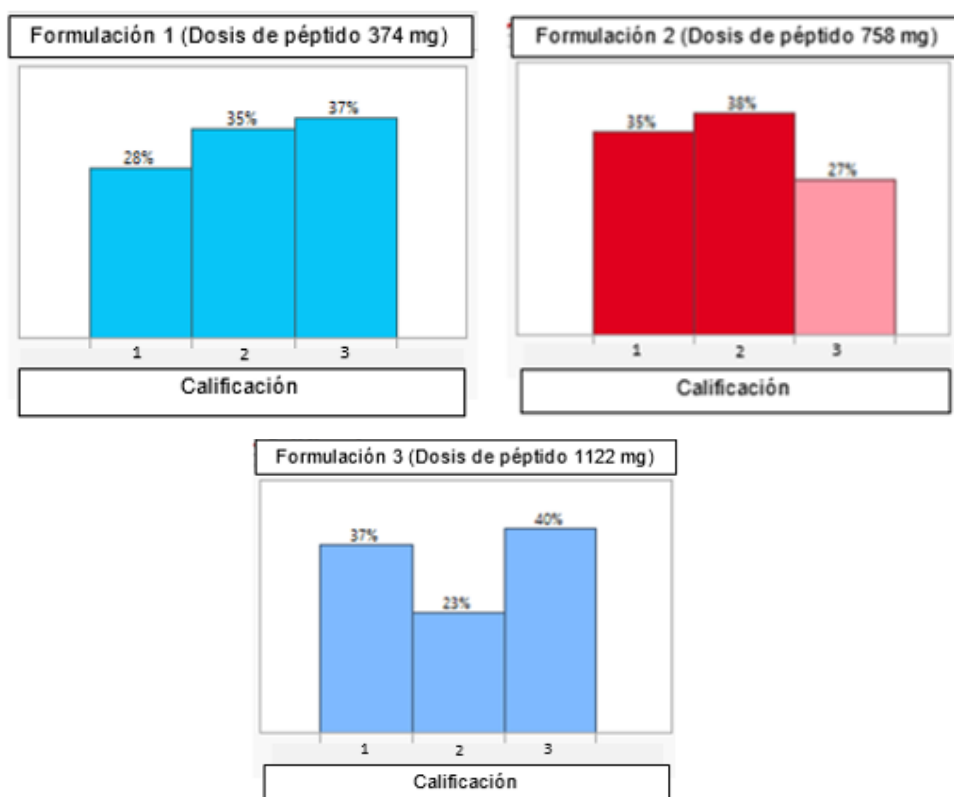


Figura 9. Preferencia de los consumidores de yogur bebible para cada una de las formulaciones.

Los resultados representan los resultados de la prueba sensorial de preferencia de las 3 formulaciones de yogur realizada por 60 consumidores. La calificación fue de forma ascendente, donde 1 represento el mayor agrado de los consumidores y 3 la que menos gusto.

6.3 Caracterización de la formulación de yogur seleccionada

La formulación que se eligió para continuar con los objetivos de este proyecto fue la que contenía una dosis de péptidos de 758 mg/250g con un pH final de 4.2

A continuación se muestran en el Cuadro 10 la composición porcentual obtenida de la caracterización del yogur. De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que el yogur cumple con las especificaciones fisicoquímicas establecidas en la NOM-181-SCFI-2010.

Cuadro 10. Composición porcentual de la caracterización fisicoquímica del yogur natural enriquecido con péptidos

Constituyente	Valor medio (%)
Humedad	87.297 ± 0.056
Sólidos totales	12.702 ± 0.056
Cenizas	0.517 ± 0.035
Proteínas	3.011 ± 0.105
Grasa	1.066 ± 0.152
Carbohidratos	8.108 ± 0.147
Acidez. Expresada como ácido láctico	14.250 ± 0.259

Los resultados representan los promedios de cada tratamiento (n=3) ± la DE del yogur enriquecido con una dosis de 758 mg péptidos bioactivos para 250 mL de yogur bebible.

Con los resultados anteriores se calculó la información nutrimental para una porción de 250 mL del yogur desarrollado, los resultados se muestran en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Información nutrimental por porción del yogur

Contenido energético	485 kJ (116 kcal)	
Proteínas	6.47 g	25.89 kcal
Grasa	2.29 g	20.62 kcal
Carbohidratos	17.43 g	69.72 kcal

Los resultados expresados se calcularon de acuerdo a una porción de 250 ml, equivalente a 215 g de yogur bebible.

6.4 Vida de anaquel sensorial

Se presentan los resultados obtenidos del yogur a los 28 días de almacenamiento a 4 °C.

6.4.1 Análisis microbiológicos

De acuerdo a la NOM-185-SSA1-2002 para leches fermentadas, durante los 28 días de almacenamiento no hubo desarrollo de coliformes totales (UFC/ml); para el caso de mohos y levaduras en el día 28 de almacenamiento se presentó crecimiento > 10 UFC/ml, por lo que no se utilizó este lote para la evaluación sensorial, los lotes con almacenamiento de 0, 7, 14 y 21 días presentaron crecimiento < 10 UFC/ml, lo cual se encuentra dentro de los límites de calidad aceptados para yogur, por lo que se seleccionaron estos cuatro lotes para realizar la evaluación sensorial.

6.4.2 Estimación de la vida de anaquel sensorial

Se realizó una prueba sensorial de aceptación o rechazo, en donde se evaluaron cuatro lotes diferentes de yogur bebible almacenados durante 0, 7, 14 y 21 días a 4 °C. A los datos obtenidos en la evaluación sensorial de 81 consumidores frecuentes de yogur se les realizó un análisis de supervivencia. En la Figura 10 se observa la clasificación de los datos obtenidos y el ajuste de diferentes modelos, la elección del modelo se realizó de acuerdo al criterio de información de Akaike (AIC), siendo el mejor modelo paramétrico el SEV ya que presente el menor valor de AIC, lo que nos indica que es el modelo que logra recuperar la mayor cantidad de información, por lo que se logra apegar más a los datos obtenidos.

En el resumen de los datos mostrados en la Figura 10, se observa que de los 81 consumidores que realizaron la evaluación, treinta consumidores aceptaron el producto durante los 21 días de almacenamiento (censura por la derecha) y que seis consumidores fueron inconsistentes en su evaluación, ya que mostraron rechazo por el producto desde el primer día de almacenamiento (censura por la izquierda).

Comparaciones de modelos			
Distribución	AICc	-2 Log- verosimilitud	BIC
SEV	168.90929	164.75544	173.54434
Logística	170.18434	166.03049	174.81939
log-gamma generalizada	170.41985	164.10816	177.29151
Normal	171.95479	167.80094	176.58984
Gamma generalizada	172.56778	166.25609	179.43944
Weibull	173.39180	169.23796	178.02685
Weibull para DS	175.54964	169.23796	182.42130
Log-logística	177.02520	172.87135	181.66025
LEV	177.72323	173.56938	182.35828
Log-logística para DS	179.18304	172.87135	186.05470
Log-normal	182.03691	177.88306	186.67196
Log-normal para DS	184.19475	177.88306	191.06641
Fréchet	192.15141	187.99756	196.78646
Fréchet para DS	194.30925	187.99756	201.18091
Exponencial	215.10483	213.05420	217.44865

Resumen de los datos	
Observación utilizada	81
Valores censurados a la derecha	30
Valores censurados por la izquierda	6
Valores censurados por intervalos	45

Figura 10. Comparaciones de modelos ajustados y resumen de los datos de la evaluación sensorial.

Se presenta en la Figura 11, el gráfico del ajuste de los datos del modelo paramétrico SEV, donde se observa que al tiempo final de almacenamiento (21 días) existe una probabilidad de falla o de rechazo por el producto de parte de los consumidores de aproximadamente el 65 %.

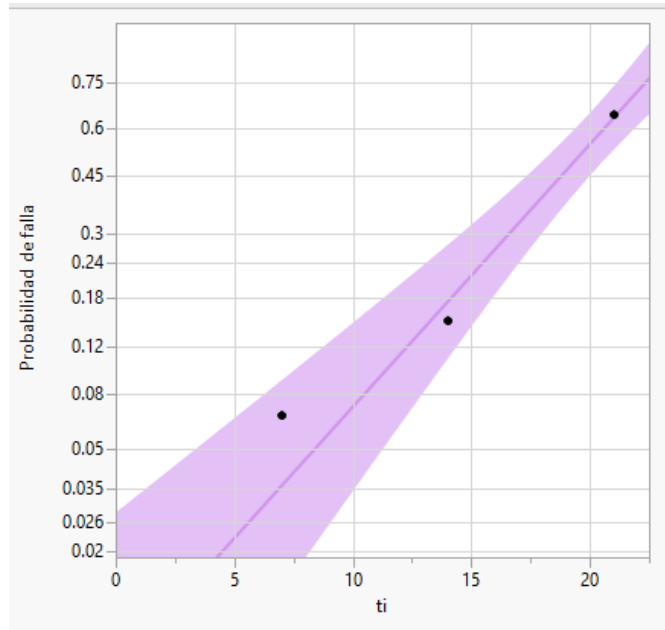


Figura 11. Ajuste del modelo SEV a los datos de la evaluación sensorial del yogur.

La línea muestra el ajuste del modelo SEV a los datos y las bandas moradas, representan los intervalos de este modelo con un 95 % de confianza.

De acuerdo al perfilador de distribución que se muestra en la Figura 12, se logró estimar el tiempo de vida de anaquel sensorial del yogur formulado y este es de 15 días considerando un rechazo sensorial del 17% al 35% con una confianza del 95%. Cabe señalar que no se utilizó ningún conservador ni estabilizante en el desarrollo de la formulación, por lo que se podía esperar que el tiempo de vida de esta formulación de yogur fuera corto.

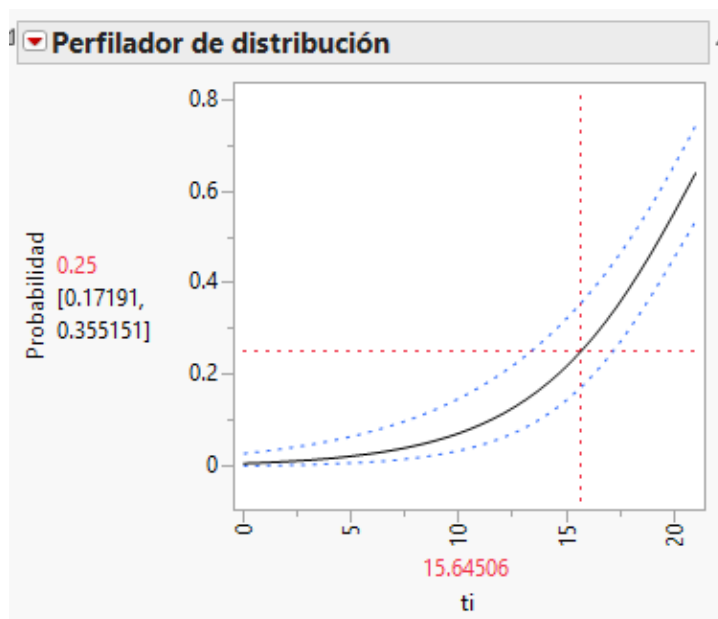


Figura 12. Perfil de distribución para la estimación del tiempo de vida de anaquel sensorial

6.4.3 Estabilidad de los péptidos durante la vida de anaquel

A cada uno de los lotes elaborados y almacenados a 0, 7, 14, 21 y 28 días se les determinó el porcentaje de inhibición de ECA, la Figura 13 muestra el cromatograma obtenido para el control (la reacción del hipuril-histidil-leucina (HHL) con ECA sin presencia de inhibidor) donde se ve la mayor concentración de ácido hipúrico (HA) obtenida por este método, en un tiempo de retención de 11.46 minutos.

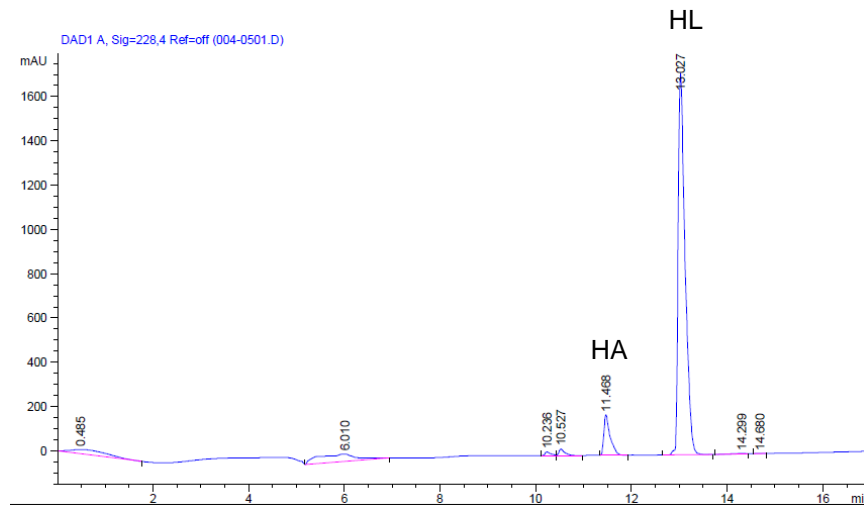


Figura 13. Cromatograma obtenido por RP-HPLC de las muestras de la reacción del HHL más ECA

Se utilizó un sistema Agilent 1200 (columna Zorbax C18; flujo de 0.5 ml / min; temperatura de 30 °C; se utilizaron dos fases, A = H₂O con 0.1 % TFA y B = Acetonitrilo con 0.1 % TFA, se aplicó un gradiente de 5 a 60 % de B durante 10 min, llegando al 60 % de B y se mantuvo constante por 2 minutos, trascurrido el tiempo se llevó hasta 95 % de A; detector UV visible a $\lambda = 228$ nm).

En la Figura 14 se observa que el yogur enriquecido con los péptidos (Tratamiento) presenta una diferencia estadística significativa para el porcentaje de inhibición de ECA en comparación con el yogur al que no se le adicionó ninguna cantidad de péptidos (Control). Sin embargo, se observa que conforme avanzan los días de almacenamiento se presenta una ligera actividad alcanzando en el día 28 de almacenamiento cerca del 10 % de inhibición.

En la Figura 15 se puede observar que durante el tiempo de almacenamiento, el yogur bebible adicionado con los péptidos muestra una actividad inhibitoria de ECA constante, incluso se puede observar que en el día 21 se generó un incremento, presentándose una inhibición hasta del 70 %, esto sin presentar un cambio estadísticamente significativo al porcentaje de inhibición obtenido a los 0 días de almacenamiento.

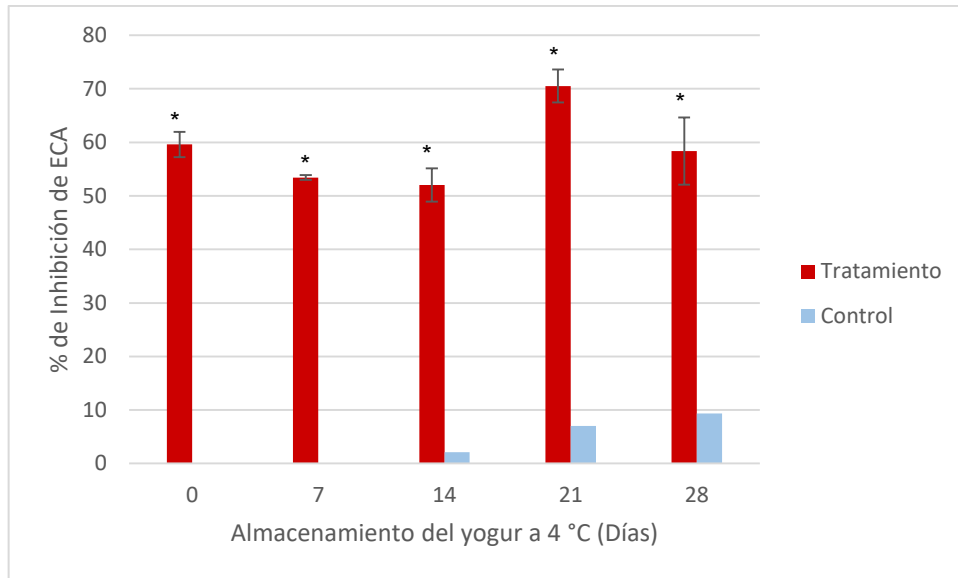


Figura 14. Comparación del porcentaje de inhibición de ECA entre el tratamiento y el control durante 28 días de almacenamiento a 4 °C

Los resultados representan los promedios de cada muestra \pm DE del porcentaje de inhibición de ECA ($n = 2$). Donde el asterisco indica diferencia entre el control y los tratamientos comparados con la prueba de Dunnett ($\alpha = 0.05$).

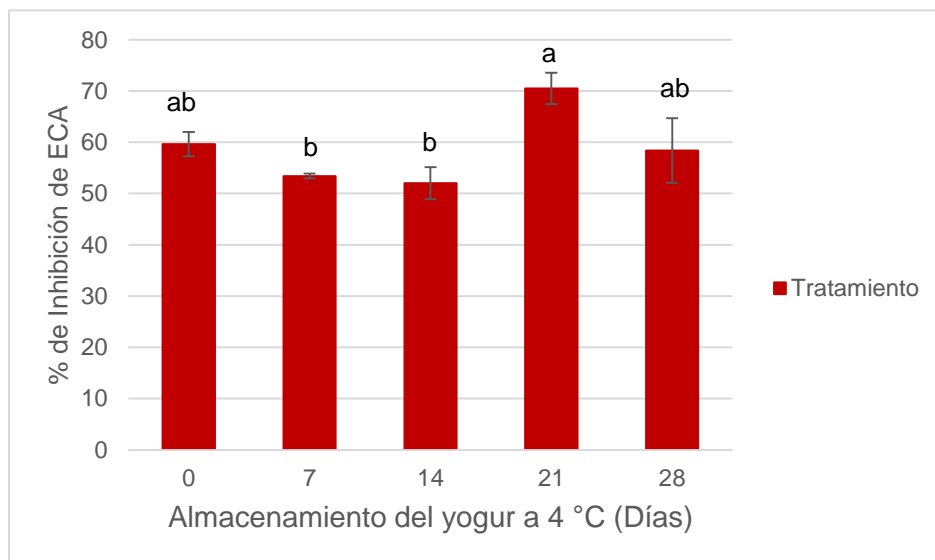


Figura 15. Comportamiento del porcentaje de inhibición de ECA del yogur enriquecido con péptidos durante 28 días de almacenamiento a 4 °C

Los resultados representan los promedios de cada muestra \pm DE del porcentaje de inhibición de ECA ($n = 2$). Donde letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre los tratamientos de acuerdo a la prueba de Tukey Kramer ($\alpha = 0.05$).

Dicho comportamiento concuerda con el reportado por Ramchandran y Shah (2010), los 28 días de almacenamiento de yogures simbióticos bajos en grasa se incrementó significativamente el porcentaje de inhibición de ECA en el día 7, posteriormente para los días 14 y 21 disminuyó el porcentaje de inhibición, seguido de un incremento en el día 28; estas variaciones se pueden atribuir a que el yogur contiene microorganismos viables, por lo que la actividad proteolítica continúa durante el periodo de almacenamiento

Cuadro 12. Comparación de la concentración mínima requerida para inhibir el 50% de la actividad de la enzima (IC₅₀) del yogur enriquecido con péptidos a los 0, 14 y 28 días de almacenamiento a 4 °C.

Muestra	IC ₅₀ (mg / ml)
0 días	0.296 ± 0.062 ^a
14 días	0.137 ± 0.152 ^a
28 días	0.313 ± 0.102 ^a

Los resultados representan los promedios de cada muestra ± DE del IC₅₀ (n=2). Donde letras iguales indican que no hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos ($\alpha = 0.05$).

Se calculó el IC₅₀ de tres tiempos de almacenamiento del yogur (0, 14 y 28 días) se observa en el Cuadro 12 los resultados durante estos días de almacenamiento. No existe diferencia estadísticamente significativa durante los tiempos de almacenamiento, de la misma manera comparado con los resultados obtenidos en el Cuadro 9 de la fracción ≤ 10 kDa se observa que al incorporar los péptidos bioactivos en el tipo de matriz utilizada (yogur natural bebible) no afecta ninguna actividad de los péptidos. Se observa que existe una variabilidad grande del día 14 al 28 de almacenamiento, presentando el mismo comportamiento explicado anteriormente en la gráfica de porcentaje de inhibición de ECA, pues el IC₅₀ representa la concentración mínima requerida para inhibir el 50 % de la actividad de la enzima, relacionándose de esta manera con el porcentaje de inhibición.

CONCLUSIONES

En el estudio de las condiciones de la hidrólisis enzimática resultan de gran significancia 3 factores: la temperatura, el pH y la interacción de la concentración de proteína y relación E/S. Resaltando la interacción como una de las más importantes, pues se observó que cuando existe una concentración menor de proteína y una mayor concentración de enzima, la actividad inhibitoria de ECA se incrementa, lo cual no sucede a concentraciones altas de proteína para los niveles de la relación E/S utilizadas en este diseño, lo que puede deberse a algún tipo de inhibición por impedimento estérico de parte del sustrato.

Por lo que para los fines del desarrollo de péptidos con actividad inhibitoria de ECA se define como el mejor tratamiento una concentración de proteína 16 g/L, relación (E/S) igual a 5, temperatura de 75°C y pH de 5. De igual manera la fracción ≤ 10 kDa, además de presentar una buena actividad inhibitoria de ECA presentó un color traslúcido, por lo que se decidió utilizar esta fracción para evitar que el color influya en la aceptabilidad de los consumidores.

Realizando un análisis de supervivencia se logró ajustar el modelo paramétrico SEV, con el que estimamos que el tiempo de vida de anaquel sensorial para el yogur formulado es de 15 días considerando un rechazo sensorial del 17% al 35% con una confianza del 95%. De la misma manera en el tiempo final de almacenamiento (21 días) se estima cerca del 65 % de rechazo de los consumidores, los cuales resaltaron un sabor a viejo y almacenado. Cabe resaltar, que para la formulación no se utilizó ningún tipo de conservador ni estabilizante, lo que se pudo reflejar en un tipo corto de vida de anaquel sensorial; además de que las pruebas microbiológicas de coliformes totales fueron negativas, así mismo para de hongos y levaduras fue <10 UFC/ml para los 4 lotes de yogur evaluados en la prueba sensorial los cuales son parámetros que deben cumplirse según la NOM-181-SCFI-2010.

Con respecto a la estabilidad de los péptidos durante el periodo de almacenamiento, se observó que la actividad inhibitoria de ECA se mantiene constante durante todo el periodo de almacenamiento. Por lo que se concluye que la matriz elegida para la incorporación del ingrediente funcional tuvo éxito, de la misma manera el tamaño de corte de 10 kDa de la fracción a incorporarse en el yogur fue el adecuado, pues como es un producto que contiene microorganismos viables, su presencia contribuye a que los péptidos continúen siendo metabolizados generando fracciones más pequeñas, lo que resultó en un incremento de la actividad en el día 21 de almacenamiento, sin embargo, también se observó que fracciones muy pequeñas de péptidos pierden la actividad con el paso del tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

Abadía-García, L., Cardador, A., del Campo, S. T. M., Arvízu, S. M., Castaño-Tostado, E., Regalado-González, C., García-Almendarez, B., & Amaya-Llano, S. L. (2013). Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. *International Dairy Journal*, 33(2), 191-197.

Aleixandre, A., Miguel, M., & Mugerza, B. (2008). Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de leche y huevo. *Nutrición Hospitalaria*, 23(4), 313-318.

Allgeyer, L. C., Miller, M. J., & Lee, S. Y. (2010). Sensory and microbiological quality of yogurt drinks with prebiotics and probiotics. *Journal of Dairy Science*, 93(10), 4471-4479.

Anchala, R., Kannuri, N. K., Pant, H., Khan, H., Franco, O. H., Di Angelantonio, E., & Prabhakaran, D. (2014). Hypertension in India: a systematic review and meta-analysis of prevalence, awareness, and control of hypertension. *Journal of Hypertension*, 32(6), 1170-1177.

Barbaros, H. O., & Huseyin, A. K. (2010). Functional milks and dairy beverages. *International Journal of Dairy Technology*, 63, 1-15.

Baró, L., Jiménez, J., Martínez Ferez, A., & Boza, J. J. (2001). Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Ars Pharmaceutica*, 42(3-4), 135-145.

Bendersky, M., & Sánchez, R. (2013). Hipertensión Arterial en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas*, 70(2).

Benítez, R., Ibarz Ribas, A., & Pagan i Gilabert, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227-236.

Birkenhäger, W. H., & de Leeuw, P. W. (1999). Non-peptide angiotensin type 1 receptor antagonists in the treatment of hypertension. *Journal of Hypertension*, 17(7), 873-881.

Bode, W., & Huber, R. (1992). Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *The FEBS Journal*, 204(2), 433-451.

Brandelli, A., Daroit, D. J., & Corrêa, A. P. F. (2015). Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Research International*, 73, 149-161.

Brown, J. J., Lever, A. F., Robertson, J. I. S., & Schalekamp, M. A. (1976). Pathogenesis of essential hypertension. *The Lancet*, 307(7971), 1217-1219.

Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Rojas-Martínez, R., Pedroza, A., Medina-García, C., & Barquera-Cervera, S. (2013). Hipertensión arterial: prevalencia, diagnóstico oportuno, control y tendencias en adultos mexicanos. *Salud Pública de México*, 55, S144-S150.

Cervera, S. B., Campos-Nonato, I., Rojas, R., & Rivera, J. (2010). Obesidad en México: epidemiología y políticas de salud para su control y prevención. *Órgano Oficial de la Academia Nacional de Medicina de México, AC*, 146, 397-407.

Cheison, S. C., & Kulozik, U. (2015). Impact of the environmental conditions and substrate pre-treatment on whey protein hydrolysis: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(2), 418-453.

Chen, Y., Wang, Z., Chen, X., Liu, Y., Zhang, H., & Sun, T. (2010). Identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from koumiss, a traditional fermented mares' milk. *Journal of Dairy Science* 93(3), 884–92.

Chobanian, A. V., Bakris, G. L., Black, H. R., Cushman, W. C., Green, L. A., Izzo Jr, J. L., Jones, D. W., Materson, B. J., Oparil, S., Wright, J. T., & Roccella, E. J. (2003). The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure: the JNC 7 report. *Jama*, 289(19), 2560-2571.

Coates, D. (2003). The angiotensin converting enzyme (ACE). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(6), 769-773.

Contra, H. S., Estrada, L. R., Chávez, A. G., & Hernández, H. (2008). El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial. *Revista Mexicana de Cardiología*, 19(1), 21-29.

Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Petruzzi, L., Casanova, F. P., & Sinigaglia, M. (2014). Functional beverages: The emerging side of functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6), 1192-1206.

Corchado, M. C. (2001). Panorama epidemiológico de la hipertensión arterial en México. *Archivos de Cardiología de México*, 71, 192-197.

Cushman, D., & Cheung, H. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology* 20, 1637-1648

Deedwania, P. C. (2005). Diabetes and hypertension, the deadly duet: importance, therapeutic strategy, and selection of drug therapy. *Cardiology Clinics*, 23(2), 139-152.

Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2017). Consultado el 05 de noviembre del 2017 en [https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Dairy%20and%20Products%20Semi-annual Mexico%20City Mexico 5-24-2017.pdf](https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Dairy%20and%20Products%20Semi-annual%20Mexico%20City%20Mexico%205-24-2017.pdf)

Drenth, J., Jansonius, J. N., Koekoek, R., & Wolthers, B. G. (1971). The structure of papain. *Advances in Protein Chemistry*, 25, 79-115.

Drenth, J., Jansonius, J. N., Koekoek, R., Swen, H. M., & Wolthers, B. G. (1968). Structure of papain. *Nature*, 218, 929-932.

Euromonitor International. (2015), consultado en <http://www.euromonitor.com/mexico>.

FitzGerald, R. J., & Meisel, H. (1999). Lactokinins: Whey protein-derived ACE inhibitory peptides. *Food / Nahrung*, 43(3), 165-167.

FitzGerald, R. J., & Meisel, H. (2000). Milk protein-derived peptide inhibitors of Angiotensin-I-converting enzyme. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 33-37.

González Sánchez, R., Llapur Milián, R., Díaz Cuesta, M., Illa Cos, M. D. R., Yee López, E., & Pérez Bello, D. (2015). Estilos de vida, hipertensión arterial y obesidad en adolescentes. *Revista Cubana de Pediatría*, 87(3), 273-284.

Gutiérrez Ruvalcaba, C. L., Vásquez-Garibay, E., Romero-Velarde, E., Troyo-Sanromán, R., Cabrera-Pivaral, C., & Ramírez Magaña, O. (2009). Consumo de refrescos y riesgo de obesidad en adolescentes de Guadalajara, México. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 66(6), 522-528.

Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y., & Takano, T. (1996). A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 64(5), 767-771.

Hough, G. (2010). *Sensory shelf life estimation of food products*. CRC Press.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2014). Consultado el 17 de marzo del 2016 en <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587>

Kabašinskienė, A., Liutkevičius, A., Sekmokienė, D., Zaborskienė, G., & Šlapkauskaitė, J. (2015). Evaluation of the physicochemical parameters of functional whey beverages. *Food Technology and Biotechnology*, *53*(1), 110-115.

Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Álvarez, C., & O'Donnell, C. P. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, *46*(1), 60-67.

Kayima, J., Wanyenze, R. K., Katamba, A., Leontsini, E., & Nuwaha, F. (2013). Hypertension awareness, treatment and control in Africa: a systematic review. *BMC Cardiovascular Disorders*, *13*(1), 1.

Kearney, P. M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P. K., & He, J. (2005). Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *The Lancet*, *365*(9455), 217-223.

Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, *9*(16), 1297-1308.

Lafarga, T., Aluko, R. E., Rai, D. K., O'Connor, P., & Hayes, M. (2016). Identification of bioactive peptides from a papain hydrolysate of bovine serum albumin and assessment of an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Research International*, *81*, 91-99.

Lim, S. S., Vos, T., Flaxman, A. D., Danaei, G., Shibuya, K., Adair-Rohani, H., ... & Aryee, M. (2013). A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, *380*(9859), 2224-2260.

López-Fandiño, R., Otte, J., & Van Camp, J. (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, *16*(11), 1277-1293.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* *193*, 265–275

Meisel, H. (1998). Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal*, *8*(5), 363-373.

Meisel, H., Frister, H., & Schlimme, E. (1989). Biologically active peptides in milk proteins. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, *28*(4), 267-278.

Monroy, Ó. V., Peralta, M. R., Esqueda, A. L., Hernández, G. P., Grupo, E. N. S. A., Attie, F., & Conyer, R. T. (2002). Hipertensión arterial en México: resultados de la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000.

Nie, H. L., Chen, T. X., & Zhu, L. M. (2007). Adsorption of papain on dye affinity membranes: Isotherm, kinetic, and thermodynamic analysis. *Separation and Purification Technology*, 57(1), 121-125.

Nielsen, P., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science* 66, 642-646.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-181-SCFI-2010, Yogurt-denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba prefacio.

Onwulata, C., & Huth, P. (Eds.). (2009). *Whey processing, functionality and health benefits* (Vol. 82). John Wiley & Sons.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2016) consultado el 10 de febrero del 2016 en <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/leche-y-productos-lacteos/es/#.V1DRFtLhBdg>.

Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015). Consultado el 10 de febrero del 2016 en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>

Organización Mundial de la Salud. (2013). *Información general sobre la hipertensión en el mundo*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud.

Özer, B. H., & Kirmaci, H. A. (2010). Functional milks and dairy beverages. *International Journal of Dairy Technology*, 63(1), 1-15.

Parra Huertas, R. A. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 62(1), 4967-4982.

Power, O., Fernández, A., Norris, R., Riera, F. A., & FitzGerald, R. J. (2014). Selective enrichment of bioactive properties during ultrafiltration of a tryptic digest of β -lactoglobulin. *Journal of Functional Foods*, 9, 38-47

Quirós del Bosque, A. (2007). Leches fermentadas con actividad antihipertensiva: identificación de péptidos y evaluación de su biodisponibilidad. Doctorado. Universidad Autónoma de Madrid Facultad de Ciencias Departamento de Química-Física Aplicada.

Ramchandran, L., & Shah, N. P. (2010). Characterization of functional, biochemical and textural properties of synbiotic low-fat yogurts during refrigerated storage. *LWT-Food Science and Technology*, 43(5), 819-827.

Rivera, J. A., Muñoz-Hernández, O., Rosas-Peralta, M., Aguilar-Salinas, C. A., Popkin, B. M., & Willett, W. C. (2008). Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 65(3), 208-237.

Roberfroid, M. (2002). Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*, 34, S105-S110.

Romaguera, D., Vergnaud, A., Peeters, P., van Gils, C., Chan, D., Ferrari, P.,....., & Norat, T. (2012). Is concordance with World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research guidelines for cancer prevention related to subsequent risk of cancer? Results from the EPIC study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 96(1), 150-163.

Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., & Korpela, R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(2), 326-330.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2016). Boletín de la leche enero-marzo de 2016. Consultado en Junio 11, 2016. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/97379/B_de_Leche_enero-marzo_2016.pdf

Seyhan, E., Yaman, H., & Özer, B. (2016). Production of a whey-based functional beverage supplemented with soy isoflavones and phytosterols. *International Journal of Dairy Technology*, 69(1), 114-121.

Shahidi, F., & Zhong, Y. (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, 91(4), 914-931.

Singh, G. M., Micha, R., Katibzadeh, S., Lim, S., Ezzati, M., & Mozaffarian, D. (2013). Abstract MP22: Mortality Due to Sugar-Sweetened Beverage Consumption: A Global, Regional, and National Comparative Risk Assessment. *Circulation*, 127(12), AMP22.

Sipola, M., Finckenberg, P., Santisteban, J., Korpela, R., Vapaatalo, H., & Nurminen, M-L. (2001). Long-term intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Physiology and Pharmacology* 52, 745-54.

Stamler, J., Stamler, R., Riedlinger, W. F., Algera, G., & Roberts, R. H. (1976). Hypertension screening of 1 million Americans: community hypertension evaluation clinic (CHEC) program, 1973 through 1975. *Jama*, 235(21), 2299-2306.

Sturrock, E. D., Natesh, R., Van Rooyen, J. M., & Acharya, K. R. (2004). Structure of angiotensin I-converting enzyme. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 2677-2686.

Tello, P. G., Camacho, F., Jurado, E., Páez, M. P., & Guadix, E. M. (1994). Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular-weight range. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(4), 529-532.

Thompson, J. L., Lopetcharat, K., & Drake, M. A. (2007). Preferences for commercial strawberry drinkable yogurts among African American, Caucasian, and Hispanic consumers in the United States. *Journal of Dairy Science*, 90(11), 4974-4987.

Timberlake, D. S., O'Connor, D. T., & Parmer, R. J. (2001). Molecular genetics of essential hypertension: recent results and emerging strategies. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 10(1), 71-79.

Torruco-Uco, J. G., Domínguez-Magaña, M. A., Davila-Ortiz, G., Martínez-Ayala, A., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2008). Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión. Antihypertensive peptides, an alternative for treatment of natural origin: a review. *CYTA-Journal of Food*, 6(2), 158-168.

Tunick, M. H. (2008). Whey protein production and utilization: a brief history. *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*, 1-13.

Velázquez, M. O., Rosas, P. M., Lara, E. A., Pastelín, H. G., Attie, F., & Tapia, C. R. (2001). [Arterial hypertension in Mexico: results of the National Health Survey 2000]. *Archivos de Cardiología de México*, 72(1), 71-84.

Vermeirssen, V., Van Camp, J., Devos, L., & Verstraete, W. (2003). Release of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity during in vitro gastrointestinal digestion: from batch experiment to semicontinuous model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(19), 5680-5687.

Walstra, P. and Oria Almudí, R. (2001). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Zaragoza: Editorial Acribia.

Wang, J., Hu, J., Cui, J., Bai, X., Du, Y., Miyaguchi, Y. & Lin, B. (2008). Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 111(2), 302-308.

Wang, W., Mejia, D., & Gonzalez, E. (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4(4), 63-78.

Wong, N. D., & Franklin, S. S. (2014). Basic Science. *Journal of the American Society of Hypertension*, 8(10), 760-763.

APENDICE

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA



Universidad Autónoma
de Querétaro



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Este formato de consentimiento informado se dirige a las personas invitadas a participar como panelista no entrenado (consumidor) en el análisis sensorial de tres formulaciones nuevas de yogur natural bebible como parte del proyecto de investigación “Desarrollo de un yogur bebible enriquecido con péptidos bioactivos obtenidos de la hidrólisis enzimática de proteínas de suero lácteo utilizando papaína”.

Nombre del director del proyecto: Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Nombre del investigador: I.B.Q. Araceli Vera Valle

Introducción

En esta investigación desarrollada por la estudiante de Maestría en Ciencia y Tecnología de alimentos del PROPAC, se busca evaluar la aceptabilidad de un yogur bebible que se encuentra enriquecido con péptidos obtenidos de proteínas de suero de leche. Se le hace la invitación a formar parte de esta investigación actuando como panelista del análisis sensorial.

Propósito

El desarrollo de una bebida funcional que contenga péptidos con actividad antihipertensiva, los cuales se obtienen a partir de la hidrólisis de proteínas de suero de leche, para utilizarse como coadyuvante en el tratamiento para el control de la hipertensión. Además el aprovechar el suero de leche como una fuente para obtener ingredientes funcionales, se disminuye el impacto ambiental que éste subproducto genera.

Selección de participantes

Los invitados a participar en esta evaluación serán 100 personas, sin exclusión de género, en un rango de edad entre 18 y 50 años, las cuales consuman yogur tres o más veces por semana. Los ingredientes que se utilizaron para las formulaciones de yogur a evaluar se muestran a continuación (Cuadro 8).

Cuadro 8. Ingredientes utilizados en las formulaciones de yogur

INGREDIENTE	ORIGEN
Leche bovina entera	Proveniente de la Universidad Autónoma de Querétaro, campus Amnazcala. Pasteurizada a 95°C por 10 minutos.
Leche bovina descremada	
Almidón modificado	Grado alimenticio
Grenetina Duche®	-
Azúcar de caña Zulka®	-
Splenda®	-
Cultivos lácticos bioprox®	-
Hidrolizados de proteínas de suero	Se utilizó proteína de suero lácteo, agua purificada y enzima comercial. Todo grado alimenticio.

Es de suma importancia que si usted es alérgico a algún componente de la leche, o tiene alguna restricción médica para el consumo de productos lácteos, lo notifique de inmediato para que se excluya de participar en este estudio, ya que su salud es primordial, de igual manera si duda de que algún ingrediente pueda causarle alguna reacción.

Participación voluntaria

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria, usted puede elegir participar o no, e incluso puede cambiar de parecer durante el transcurso del experimento aun cuando haya firmado con anterioridad este formato de consentimiento informado

Protocolo

Se presentarán ante usted 4 muestras de yogur bebible, para cada una debe responder a la pregunta ¿Consumiría este producto? Todas las muestras se presentarán simultáneamente con números aleatorios de tres dígitos.

Riesgos

Los yogures se elaboraron siguiendo las buenas prácticas de manufactura en la Planta Piloto de Productos Lácteos ubicada en el Parque Biotecnológico de la Universidad Autónoma de Querétaro, además de que se obtuvieron muestras de cada formulación, las cuales fueron sometidas a análisis microbiológicos, por lo que se garantiza la inocuidad del producto a evaluar por lo que se considera sin riesgo. Además para la elaboración de los hidrolizados se utilizó agua purificada y enzima comercial de grado alimenticio, además de que se procedieron a pasteurizar a 95°C por 10 minutos, por lo que de la misma manera no existe riesgo.

Confidencialidad

La información de los panelistas de esta investigación no se compartirá con personas ajenas a la misma y la información obtenida será presentada sin revelar el nombre del panelista.

Contacto

Si tiene cualquier duda o comentario posterior al análisis puede contactarse con la Dra. Silvia L. Amaya Llano al correo electrónico: samayal@uaq.com.mx.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO:

Fecha: _____

He sido invitado a participar en el análisis sensorial de 4 formulaciones de yogur bebible natural como parte del proyecto de investigación “Desarrollo de un yogur bebible enriquecido con péptidos bioactivos obtenidos de la hidrólisis enzimática de proteínas de suero lácteo utilizando papaína”, he sido informado de que los posibles riesgos han sido prevenidos. Se me ha proporcionado el nombre y los datos del investigador responsable y he leído la información proporcionada, por ello, elijo de manera voluntaria participar en esta investigación como un panelista no entrenado para una evaluación sensorial.

Nombre del participante: _____

Firma del participante: _____

He sido testigo de la lectura del documento de consentimiento informado por parte del participante, por lo que confirmo que el individuo ha dado su consentimiento libremente.

Nombre del director del proyecto: Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Nombre del investigador asistente: I.B.Q. Araceli Vera Valle

Firma del investigador asistente: _____

*Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de consentimiento informado.

PRUEBA SENSORIAL DE YOGUR BEBIBLE

Sexo: M F

Edad: _____

Frente a usted se encuentran 4 muestras codificadas de *yogur bebible natural*. Por favor pruébelas, anote en cada una de las líneas el código de la muestra y responda para cada muestra la siguiente pregunta:
¿Consumiría éste producto?

_____ Sí No

_____ Sí No

_____ Sí No

_____ Sí No

Comentarios:

*Se manejó un tiempo de almacenamiento de 0 a 21 días a 4°C. Las muestras son inocuas según las normas NOM-113-SSA1 y NOM-111-SSA-1994.

MUCHAS GRACIAS!!!

