



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la
República (PROPAC)

Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Tesis

**“Modificación ultrasónica de suero de mantequilla para la
producción de un ingrediente de alta funcionalidad”**

Presenta:

Joskua Itzamatul Malfavón Salomé

Dirigido por:

Silvia Lorena Amaya Llano

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, Qro.



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

Modificación ultrasónica de suero de mantequilla para la producción de un ingrediente de alta funcionalidad

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.B. Joskua Itzamatul Malfavón Salomé

Dirigido por:

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Presidente

Firma

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Secretario

Firma

Dra. Lucía Guadalupe Abadía García
Vocal

Firma

Dra. Minerva Ramos Gómez
Suplente

Firma

Dra. Beneranda Murúa Pagola
Suplente

Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Director de la Facultad de Química

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

Centro Universitario
Querétaro, Qro.

2021

Resumen

El suero de mantequilla es la fase acuosa liberada durante el batido de la crema al fabricar mantequilla. Pese a ser un producto lácteo con componentes tecnológicamente funcionales, en México es tratado como un desecho. El uso de tecnologías emergentes, como el ultrasonido de alta intensidad, puede dar un valor añadido a distintos subproductos alimenticios. El objetivo de este estudio fue evaluar las modificaciones funcionales y estructurales en suero de mantequilla al ser sometido a un tratamiento de ultrasonido de alta intensidad, para posteriormente incorporar el ingrediente en una formulación de helado tipo *premium* sabor natural y evaluar el *overrun*, la tasa de derretimiento y el color como parámetros de calidad y conocer el posible impacto del ingrediente lácteo desarrollado. Muestras de suero de mantequilla en polvo se reconstituyeron (23 %, p/v) y sonicaron a tres distintos niveles de amplitud sónica (20, 40 y 60 %) y a tres niveles de tiempo (5, 10 y 15 min), manteniendo la temperatura constante para excluir efectos del calentamiento. Las muestras se liofilizaron posteriormente para obtener un ingrediente lácteo en forma de polvo tratado por ultrasonido. Se evaluaron las propiedades funcionales del suero de mantequilla tratado, destacando que el mayor aumento en la capacidad de absorción de aceite ocurrió en los tratamientos 20 y 40 % de amplitud sónica. Hubo una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de la solubilidad, siendo el tratamiento 20% de amplitud sónica a 10 min aquel que presentó la mayor reducción en esta propiedad funcional. En cuanto a las modificaciones estructurales, la concentración de grupos sulfhidriilo aumentó significativamente ($p < 0.05$), otra vez destacando los tratamientos 20 % de amplitud a 5 y 10 min y el tratamiento 40 % de amplitud a 5 min; este resultado, en conjunción con el espectro obtenido mediante FTIR, indica la presencia de agregados proteicos en las muestras de suero de mantequilla tratado con ultrasonido de alta intensidad. Se eligió el tratamiento 20% de amplitud sónica a 5 min para ser incorporado en una formulación de helado. Los parámetros de color y tasa de derretimiento no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las muestras de helado; mientras que, se reporta la menor tasa de *overrun* para el helado con suero tratado por ultrasonido, valor posiblemente atribuible a limitaciones del equipo empleado y una falta de estabilización de las burbujas de aire. Los resultados de este estudio indican que es necesario realizar estudios adicionales para poder implementar un ingrediente lácteo en polvo tratado por ultrasonido en un producto alimenticio.

Palabras clave: suero de mantequilla, ultrasonido de alta intensidad, helado

Abstract

Buttermilk is the aqueous phase released during cream churning when butter is manufactured. Despite being a dairy product with technologically functional ingredients, it is treated as waste in Mexico. The use of emerging technologies, like high intensity ultrasound, can impart added value to different food by-products. The aim of this study was to evaluate the structural and functional changes present in buttermilk after being treated with high intensity ultrasound, to later incorporate the developed ingredient as an additive in a premium, natural flavor ice cream formulation, evaluating overrun, meltdown rate and color as quality parameters, to assess the possible impact of said additive. Buttermilk powder samples were reconstituted (23%, w/v) y sonicated at three sonic amplitude levels (20, 40 & 60%) and three time levels (5, 10 & 15 min), keeping temperature constant to exclude effects of heating. Samples were freeze-dried to obtain an ultrasound-treated, dairy powder ingredient. Functional properties of the treated buttermilk samples were evaluated, highlighting that the biggest increasement in oil absorption capacity was observed in samples treated with 20% and 40% sonic amplitude. A statistically significant reduction ($p < 0.05$) of solubility, with the 20% sonic amplitude/5 min sample presenting the biggest reduction in this functional property. Sulfhydryl groups concentration statistically increased ($p < 0.05$), highlighting, again, samples treated with 20% sonic amplitude/5 & 10 min, and the sample treated with 40% sonic amplitude for 5 min; this result, in conjunction with FTIR spectra, indicate the presence of protein aggregates. Treatment 20% sonic amplitude/5 min was selected to be incorporated into the ice cream formulation. Color parameters and meltdown rate presented no significant differences ($p > 0.05$) between ice cream samples; meanwhile, the smallest overrun rate was reported for ice cream with added ultrasound-treated buttermilk, a result possibly attributed to equipment limitations and a lack of stabilized air bubbles. Results from this study indicate that it may be necessary to conduct further research to incorporate an ultrasound-treated dairy powder into a food product.

Keywords: buttermilk, high intensity ultrasound, ice cream

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante los dos años de estudio, permitiendo la realización de este trabajo para obtener mi grado en Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

A todos los investigadores, técnicos y personal administrativo del posgrado, por su apoyo y las atenciones prestadas. En particular, mi más sincero agradecimiento a la Dra. Silvia L. Amaya Llano y la Dra. Lucía G. Abadía García, por ser guías importantes durante mi proceso de formación profesional y académica, pero, sobre todo, por sus cualidades humanas que ayudaron a formar mi carácter y madurez durante este periodo.

A mis padres, mis hermanas y mis sobrinos, por su apoyo (de distintos tipos) durante las dificultades que pasé, principalmente durante los periodos de cuarentena.

A todos mis compañeros de generación, de laboratorio, y los alumnos de doctorado con los que me relacioné durante la maestría. Su apoyo en las buenas y en las malas fue la parte más destacable de esta etapa, todos tienen mis mejores deseos y espero genuinamente que todos alcancen sus metas profesionales y personales.

A mis amigos de Coahuila y aquellos que se encuentran dispersos en otras partes del país y el mundo, por estar cuando los necesitaba y hacer mis días más amenos sin que importara la distancia geográfica.

Contenido

Índice de figuras	VI
Índice de gráficas	VI
Índice de cuadros	VII
1. INTRODUCCIÓN	8
2.1 Mantequilla	9
2.1.1 Suero de mantequilla como residuo	11
2.1.2 Composición del suero de mantequilla.....	13
2.1.2.1. Membrana del glóbulo graso	13
2.1.2.2 Proteínas	14
2.1.2.3 Lípidos	15
2.1.2.4 Lactosa	16
2.1.3 Enfoques actuales de utilización de suero de mantequilla	17
2.1.4 Funcionalidad tecnológica de los componentes del suero de mantequilla.....	19
2.1.4.1 Lípidos	19
2.1.4.2 Proteínas	19
2.1.4.3 Lactosa	21
2.2 Tecnologías aplicadas en la recuperación de residuos lácteos	21
2.2.1 Polvos lácteos	21
2.2.2 Tecnología de membranas.....	22
2.2.1.1 Microfiltración.....	24
2.2.3 Secado por aspersion	25
2.2.3 Liofilización	28
2.2.4 Ultrasonidos de alta intensidad.....	29
2.2.3.2 Modificación de proteínas lácteas utilizando ultrasonidos de alta intensidad ..	32
2.2.3.3 Modificación de lípidos mediante ultrasonido.....	33
2.2.3.4 Modificación de lactosa utilizando ultrasonidos de alta intensidad	35
2.3 Helado	35
3. JUSTIFICACIÓN	42
4. OBJETIVOS.....	43
4.1 General.....	43
4.2 Específicos	43

5. METODOLOGÍA	44
5.1 Modificación ultrasónica del concentrado de suero de mantequilla.....	44
5.2 Caracterización del concentrado de suero de mantequilla	44
5.2.1 Análisis proximales.....	44
5.2.2. Determinación de propiedades funcionales.....	45
5.2.3 Determinación de modificaciones de estructuras proteicas	47
5.3 Formulación de helado.....	48
5.3.1 Tasa de derretimiento	49
5.3.2 Color	49
5.3.3 <i>Overrun</i>	49
5.4 Análisis estadístico	50
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
6.1. Análisis proximales.....	51
6.2 Propiedades funcionales.....	51
6.2.1 Capacidad de absorción de grasa.....	51
6.1.2 Solubilidad.....	54
6.1.3 Actividad emulsificante	57
6.1.4 Viscosidad	62
6.2 Modificaciones de estructura proteica	64
6.2.1 Grupos sulfhidrilos libres	64
6.2.2. Electroforesis nativa.....	67
6.2.3 Espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier	69
(FTIR).....	69
6.3 Elaboración de helado	71
6.3.1 Tasa de derretimiento	71
6.3.2 Color	73
6.3.3. <i>Overrun</i>	74
7. CONCLUSIONES	77
8. REFERENCIAS.....	79

Índice de figuras

Figura		Página
1	Esquema de la estructura de la mantequilla	8
2	Pasos de elaboración de mantequilla	9
3	Estructura del glóbulo de grasa de la leche	13
4	Estructura de α -lactosa y β -lactosa	15
5	Ejemplos de aplicación de tecnologías de membrana en productos lácteos	23
6	Cavitación de ultrasonidos	30
7	Diagrama esquemático de la microestructura del helado	35
8	Estructura de base de helado y helado	36
9	Interacción amplitud/tiempo para capacidad de absorción de grasa	51
10	Interacción amplitud/tiempo para solubilidad	54
11	Interacción amplitud/tiempo para índice de estabilidad emulsificante	58
12	Interacción amplitud/tiempo para índice de actividad emulsificante	58
13	Interacción amplitud/tiempo para viscosidad	62
14	Interacción amplitud/tiempo para grupos sulfhidril libres	64
15	Electroforesis nativa en gel de poliacrilamida (native PAGE)	67
16	Espectro de la región amida I (1600-1700-1) para muestras de suero de mantequilla tratadas con 20% de amplitud sónica, a 3 niveles de tiempo	69
17	Espectro de la región amida I (1600-1700-1) para muestras de suero de mantequilla tratadas con 40% de amplitud sónica, a 3 niveles de tiempo.	69
18	Espectro de la región amida I (1600-1700-1) para muestras de suero de mantequilla tratadas con 60% de amplitud sónica, a 3 niveles de tiempo	70

Índice de gráficas

Gráfica		
1	Tasa de derretimiento de helado	71

Índice de cuadros

Cuadro		Página
1	Comparación de composición entre suero de mantequilla dulce, suero de mantequilla ácido y leche descremada	11
2	Propiedades funcionales de las proteínas lácteas y su aplicación en alimentos	19
3	Tipos y subtipos de polvos lácteos	21
4	Composición típica de una muestra de helado	37
5	Diseño experimental	41
6	Composición proximal de suero de mantequilla en polvo	50
7	Capacidad de absorción de grasa en muestras de suero de mantequilla sonicado	52
8	Solubilidad en muestras de suero de mantequilla sonicado	55
9	Actividad emulsificante de suero de mantequilla sonicado	59
10	Resultados de viscosidad en suero de mantequilla sonicado	62
11	Concentración de grupos tioles libres en suero de mantequilla sonicado	65
12	Parámetros de color en muestras de helado	73
13	Cuantificación de <i>overrun</i> en muestras de helado	74

1. INTRODUCCIÓN

El suero de mantequilla es el líquido liberado al batir la crema durante la producción de mantequilla y es considerado un subproducto altamente contaminante (Sodini et al., 2006). El suero de mantequilla contiene alrededor del 8-10% de sólidos, entre los que destaca su contenido de proteínas de alta calidad nutrimental y su contenido de lípidos provenientes de fragmentos de la membrana de glóbulo graso.

Actualmente en México, el suero de mantequilla es desechado contaminando los cuerpos de agua. De acuerdo con datos de SIAP (2020), el volumen total de mantequilla producida en México durante 2019 alcanzó las 229 mil toneladas, lo que implica la generación de un volumen igual de suero de mantequilla. El actual enfoque de la industria láctea en el mundo es la recuperación de los subproductos y su conversión a productos de valor agregado.

Con relación a esto, la aplicación de tecnologías emergentes es un tópico de gran interés, ya que puede facilitar la recuperación de componentes específicos o incrementar su funcionalidad. Particularmente, los ultrasonidos de alta intensidad se han reportado para mejorar la extracción de componentes de alto valor agregado a partir de subproductos de la industria alimenticia e inducir modificaciones estructurales que permiten mejorar sus propiedades funcionales.

En el presente proyecto se estudió la modificación de sólidos del suero de mantequilla utilizando ultrasonidos de alta intensidad con lo cual se indujeron interacciones que alteraron las propiedades funcionales del ingrediente, como emulsificación, solubilidad y retención de aceite. Estos cambios se correlacionaron con modificaciones estructurales de las proteínas presentes y, finalmente, el ingrediente desarrollado se incorporó en una formulación de helado tipo *premium* sabor natural al que se le evaluaron parámetros de calidad como tasa de derretimiento y *overrun*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Mantequilla

La mantequilla es un producto lácteo de naturaleza lipídica derivada del batido crema o leche fresca o fermentada (Deosarkar, Khedkar & Kalyankar, 2016). Para la producción de mantequilla se imparte un daño físico a los glóbulos de grasa de leche, resultando en la inversión de la emulsión aceite-en-agua a una agua-en-aceite, que es la mantequilla, estructura que puede verse en la Figura 1 (Richards & Fearon, 2003).

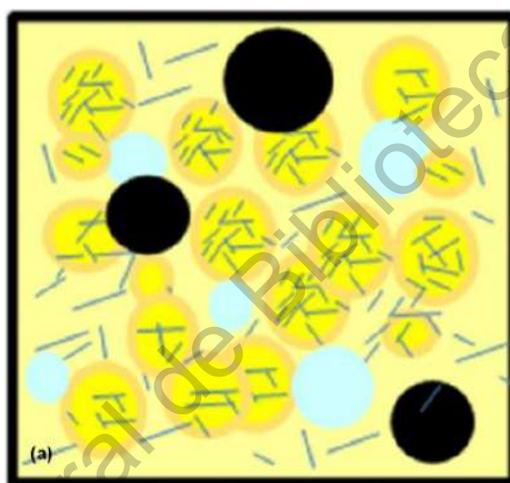


Figura 1. Esquema de la estructura de la mantequilla. La zona amarilla representa grasa líquida, las zonas azules representan el agua, los círculos amarillos son los glóbulos de grasa que contienen grasa líquida y cristales, mientras que los círculos negros son el aire incorporado durante el batido.

No a escala. Adaptado de Buldo & Wiking (2016).

De acuerdo con la NOM-185-SSA1-2002, la crema o leche empleada debe ser pasteurizada y puede estar sujeta a maduración, fermentación o acidificación, batido o amasado, pudiendo ser o no adicionada con sal según la NMX-F-010-1982 debe contener un mínimo de 80% de grasa butírica.

La producción mundial de mantequilla y grasa de leche anhidra es ~4.1 millones de toneladas (Deosarkar, Khedkar & Kalyankar, 2016), y este producto usualmente se

emplea como ingrediente en diversos platillos alrededor del mundo por ayudar a desarrollar texturas y sabores (Buldo & Wiking, 2016).

En la actualidad, se utilizan procesos de batido continuos en vez de métodos en lotes y, dentro de éstos el más común es el método Fritz, el cual se esquematiza en la figura 2. La crema se concentra a 40% de grasa vía centrifugación (A), y luego se realiza un tratamiento térmico que cristaliza parte de los glóbulos de grasa. Cuando la crema es batida ocurre la incorporación de aire, el cual se dispersa en pequeñas burbujas que interactúan con la grasa líquida y parte de las membranas del glóbulo graso; esto forma una espuma que posteriormente se desestabiliza por la constante acción mecánica del batido (B), resultando en la aglomeración de la grasa en grupos y la inversión de fases (C), quedando al final la mantequilla sólida y la fase acuosa resultante es el suero de mantequilla (Buldo & Wiking, 2016).

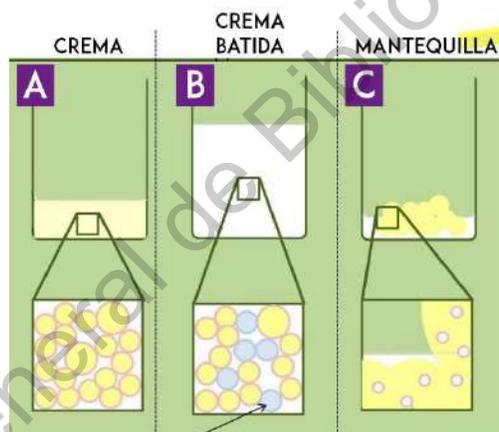


Figura 2. Pasos de elaboración de mantequilla

2.1.1. Suero de mantequilla

El suero de mantequilla es la fase acuosa liberada durante la etapa de batido de la crema después de la formación de los granos al elaborar mantequilla (Ali, 2018). La producción de este fluido ocurre durante la inversión de fases por la agitación mecánica en presencia de aire, aplicada a los glóbulos de grasa contenidos en la crema utilizada como materia prima (Libudzisz & Stepaniak, 2002; Barry et al., 2018).

Dependiendo del procesamiento al que se someta la mantequilla se podrán obtener suero de mantequilla dulce (sin adición de cultivos), ácido (por fermentación con cultivos comerciales) (composición en Tabla 1) y tipo *whey* a partir del procesamiento de crema obtenida del suero de leche (Zanabria Eyzaguirre & Corregid, 2011).

Se estima que al batir 1 litro de crema se recuperan 500 mL de suero de mantequilla (Saffon, 2013). Si bien puede haber variaciones en función al origen de la crema utilizada, en promedio el suero de mantequilla proveniente de crema dulce tiene un contenido de sólidos totales de 7 a 10%, 0.3 a 1.0% de lípidos, 3.5 a 4.9% de lactosa, 2.66 a 3.75% de proteína (entre las que se encuentran caseínas y proteínas de suero de leche), 0.6 a 0.75% de minerales y de 0.075 a 0.25% de fosfolípidos provenientes de las membranas de los glóbulos de grasa de la leche (Libudzisz & Stepaniak, 2002; Zanabria Eyzaguirre & Corregid, 2011). Desde una perspectiva química se considera como leche desnatada enriquecida con material de membranas de glóbulo graso de leche (Fauquant et al., 2014).

2.1.1.1 Suero de mantequilla como residuo

En general, los efluentes de procesos lácteos poseen ciertas características en común, como una alta carga de compuestos orgánicos, variaciones en pH por procesamientos químicos y presencia de agentes limpiadores, altos niveles de fósforo y nitrógeno y fluctuaciones en temperatura (Chen et al., 2018). El suero de mantequilla, aun cuando posee distintos componentes con diversas propiedades tecnológicas y nutricionales, se considera como un producto de bajo valor por su variabilidad en composición bioquímica, susceptibilidad a la contaminación bacteriana y pocas aplicaciones a nivel industrial (Fauquant et al., 2014).

Este efluente de desecho posee una Demanda Química de Oxígeno (DQO) en un rango de 104-111 g/L y una Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) entre 72.4-75.1 g/L, valores que evidencian su alto nivel contaminante (Slavov, 2017).

De acuerdo con datos de Lambert et al. (2016), la producción combinada de suero de mantequilla y grasa de leche anhidra a nivel mundial fue de alrededor 10 millones de toneladas en 2013. Se estima que durante 2016 se produjeron 2 millones de toneladas de suero de mantequilla en la Unión Europea; mientras que, el consumo *per cápita* en Estados Unidos durante el mismo año fue de 0.2 galones (Ali, 2018). Aunque no se tienen estadísticas respecto al suero de mantequilla producido en nuestro país, la producción de mantequilla en México reportada durante 2017 alcanzó las 220 mil toneladas, lo que generaría 146 mil toneladas de suero considerando que la mantequilla representa un 60% del volumen de crema utilizado y el restante queda como suero (Saffon, 2013; Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2018).

Cuadro 1. Comparación de composición entre suero de mantequilla dulce, suero de mantequilla ácido y leche descremada. Adaptada de Saffon (2013)

Componente	Suero de mantequilla dulce	Suero de mantequilla ácido	Leche descremada
Sólidos totales (%)	7-10	8-10	9.4
Grasa (%)	0.3-1.0	0-2.5	0.07
Lactosa (%)	3.5-4.9	4.8-5.8	4.8
Proteína (%)	2.66	3.75	3.36
Fosfolípidos (%)	0.075	0.25	0.015
Minerales (%)	0.6-0.75	0.6-0.9	nd

Pese a las variaciones en su composición bioquímica, el suero de mantequilla, en promedio, es 91% agua y 9% materia seca conformada por lactosa, compuestos nitrogenados, lípidos y minerales, y si bien es un compuesto rico en materia orgánica adecuado para tratamientos de aguas residuales (Pilarska et al., 2016), en México no se cuenta con la infraestructura necesaria para un correcto tratamiento

de efluentes provenientes de procesos lácteos, por lo que el suero de mantequilla se descarga en cuerpos de agua que contamina mantos acuíferos.

Adicionalmente, los desechos producidos por distintos procesos industriales no se descargan de forma simultánea, sino que forman efluentes con variaciones en su composición, lo cual implica procesos especiales para eliminar o reducir su impacto ambiental que no siempre tendrán los mismos resultados por la diversidad de los componentes de cada descarga (Slavov, 2017).

2.1.2 Composición del suero de mantequilla

2.1.2.1. Membrana del glóbulo graso

En la leche, los lípidos están presentes en la forma de glóbulos con diámetro de entre 0.1 a 15 μm cubiertos por una película delgada denominada membrana del glóbulo graso de leche (MFGM por sus siglas en inglés, provenientes de *milk fat globule membranes*) (Le, Van Camp & Dewettnick, 2014). Este material se origina a partir de material que se asocia con la grasa dentro de las células secretoras de leche y material adquirido durante la secreción de los glóbulos de grasa durante la biosíntesis y secreción de la leche, resultando así en una membrana con múltiples capas, empezando por una monocapa de lípidos y proteínas, una cubierta proteica y una capa externa con glucocálix asociado (Figura 3) (Mather, 2011). En el batido de la crema durante la fabricación de mantequilla y consecuente obtención de suero de mantequilla, los glóbulos de grasa sufren una disrupción, con la membrana del glóbulo terminando en el suero de mantequilla junto a compuestos hidrosolubles como lactosa y proteínas; todos estos componentes son los responsables de la funcionalidad del suero de mantequilla.

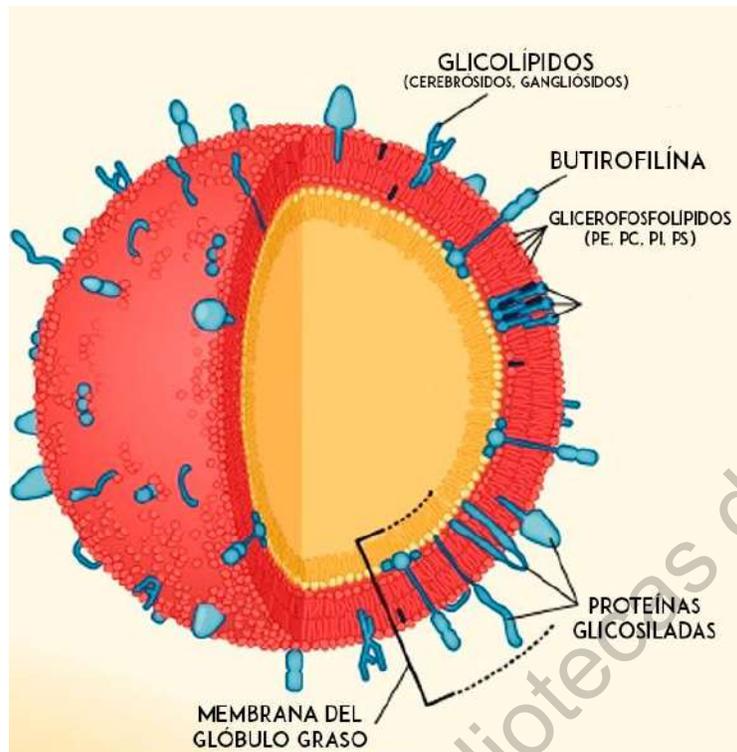


Figura 3. Estructura del glóbulo de grasa de la leche. Se hace especial énfasis en la estructura de la membrana y sus componentes (Mead Johnson Nutrition, 2017, imagen con licencia CC BY 4.0)

2.1.2.2 Proteínas

El suero de mantequilla posee proteínas derivadas de leche desnatada (caseína y proteínas de suero de leche), además de aquellas presentes en la membrana del glóbulo de grasa, las cuales han sido relacionadas con diversos procesos biológicos como la respuesta inmunitaria, transporte y metabolismo de lípidos y síntesis de proteínas (Zanabria Eyzaguirre & Corregid, 2011).

Las proteínas que conforman las MFGMs representan 1 - 2% de las proteínas totales de la leche, estando presentes principalmente mucina 1, xantina oxidasa, mucina 15, CD36, lactadherina, adipofilina y butirofilina, las cuales se han vinculado con efectos positivos contra infecciones bacterianas y virales, desarrollo del sistema inmunitario, diferenciación y crecimiento celular, y transporte y metabolismo de lípidos (Le, Van Camp & Dewettnick, 2014). Si bien el comportamiento del suero de mantequilla como ingrediente añadido a distintos alimentos puede atribuirse a la

presencia de MFGMs, este líquido presenta una mayor cantidad de proteínas de leche desnatada, de las cuales el mayor porcentaje está representado por caseínas, lo que explicaría algunas de las similitudes fisicoquímicas entre el suero de mantequilla y la leche descremada (Corredig, Roesch & Dalgleish, 2003).

Las caseínas, proteínas fosforiladas y glucosiladas sintetizadas por las glándulas mamarias y ricas en aminoácidos esenciales (con excepción de la cisteína), son uno de los subproductos lácteos con más aplicaciones en la industria alimenticia. Este grupo de proteínas representa el 80% de la proteína en la leche bovina, presente en una concentración de $\sim 25 \text{ kg/m}^3$, y en leche de animales sanos todas las caseínas se encuentran en micelas. En la leche de bovinos hay 4 fracciones diferentes de la caseína: α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína y κ -caseína, en proporciones aproximadas 4: 1: 3.5: 1.5. Las micelas de caseína son complejos de asociación coloidales donde las caseínas altamente fosforiladas (α y β) interactúan y forman agregados con fosfato de calcio. El tamaño de las micelas (con diámetro promedio de 200 nm, aunque la distribución de tamaño es polidispersa) se define por la proporción de κ -caseína (Dalgleish, 2011).

Entre las proteínas de suero de leche, que representan del 8 al 15% de las proteínas totales en el suero de mantequilla, encontramos β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, inmunoglobulinas y albúmina de suero bovino, las cuales están relacionadas a funciones biológicas como actividad antiinfecciosa, sensación de saciedad, transporte de lípidos, desarrollo y crecimiento celular y efectos anti-carcinogénicos, antioxidantes, antimutagénicos y actividad inmunomodulatoria (Saffon, 2013; Zafar et al., 2013; Ramos et al., 2016).

2.1.2.3 Lípidos

Los triglicéridos son la especie de lípidos más abundante de las MFGMs, representando un 62% de la composición lipídica, mientras que el contenido de fosfolípidos se encuentra entre el 26 a 31% (Mather, 2011; Barry et al., 2018). Las principales especies de lípidos polares de esta membrana son fosfolípidos como la

fosfatidilcolina (35%), fosfatidiletanolamina (30%), esfingomiélinea (25%), fosfatidilinositol (5%), fosfatidilserina (3%), además de otros como glucosilceramida, lactosilceramida y cerebrósidos presentes en cantidades traza. Entre los beneficios a la salud y funciones biológicas reportadas sobre las MFGM y/o los lípidos polares que las componen se observan efectos regulatorios a nivel celular (relacionados al crecimiento, proliferación, diferenciación y apoptosis) efectos anti-colesterémicos (por acción de la esfingomiélinea y fosfocolina) y efectos protectivos contra infecciones de bacterias enteropatógenicas e infecciones virales (rotavirus), carcinogénesis en colon y enfermedades neurodegenerativas (Zanabria Eyzaguirre & Corregid, 2011; Le, Van Camp & Dewettnick, 2014; Castro-Gómez et al., 2015, Yano et al., 2017; Pagliano et al., 2018; Barry et al., 2018).

2.1.2.4 Lactosa

La lactosa, β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-glucosa, es el principal carbohidrato en productos lácteos, siendo virtualmente único a la leche, encontrándose en distintas concentraciones dependiendo de la especie, y participa a nivel fisiológico en la formación del sistema nervioso y crecimiento de piel, huesos y cartílago (Kanurić et al., 2018).

La lactosa posee anómeros α y β , siendo el primero caracterizado por la orientación *cis* del grupo hidroxilo en el C1 de la glucosa con relación al grupo hidroxilo del C2 (Figura 4). A diferencia de otros carbohidratos, la lactosa posee poca dulzura, un bajo valor calórico, un bajo índice glucémico, buena compresibilidad, plasticidad y

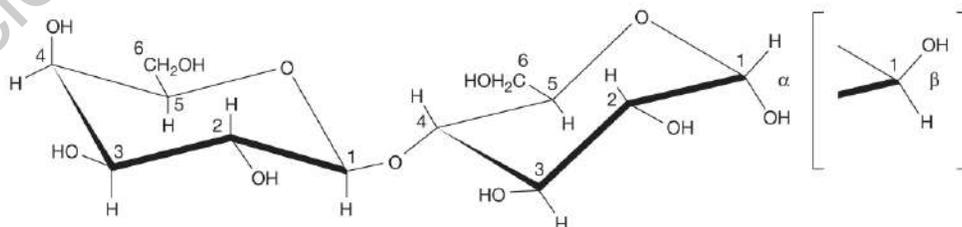


Figura 4. Estructura de α -lactosa y β -lactosa. Adaptado de Shendurse & Khekdar (2016)

firmeza, lo que la hacen ideal para distintas aplicaciones alimenticias y farmacéuticas (Sánchez-García et al., 2019).

La presencia de lactosa puede tener un impacto negativo en el procesamiento y estabilidad de ingredientes lácteos con un porcentaje de este carbohidrato mayor a 50% debido a reacciones de Maillard no deseadas y su posibilidad de conferir una consistencia pegajosa y formar grumos en polvos, siendo defectos más frecuentes en matrices alimentarias y ambientes con alta actividad de agua y temperaturas elevadas (Huppertz & Gasi, 2016); de esto se infiere que la lactosa tiene un impacto en la calidad del suero de mantequilla durante su procesamiento y almacenamiento al ser uno de sus principales constituyentes.

2.1.3 Enfoques actuales de utilización de suero de mantequilla

De manera tradicional, el suero de mantequilla se ha utilizado como base de bebidas en Europa, Asia, África y Medio Oriente; como sustrato para alimentación animal y como ingrediente en polvo adicionado a formulaciones de postres, confites y productos de panificación por sus propiedades emulsificantes y de desarrollo de sabor atribuibles a sus componentes como proteínas de suero de leche, caseínas, fosfolípidos y lactosa (Libudzisz & Stepaniak, 2002; Sarkar et al., 2015; Rai et al., 2017; Jane & Ahmand, 2017).

En la actualidad, existe una tendencia hacia la incorporación a nivel laboratorio de suero de mantequilla como ingrediente en productos con potencial funcional por su contenido de MFGMs, la purificación de dichas membranas, la evaluación de efectos benéficos a la salud en modelos *in vitro* e *in vivo* y su adición a distintos sistemas alimentarios. Entre los beneficios a la salud que poseen las MFGM destacan sus posibles efectos anti-proliferativos y protección contra la neurodegeneración y propiciar el desarrollo cognitivo en neonatos, además de sus efectos anti-infecciones; por estos motivos se considera la adición de ingredientes

ricos en fosfolípidos derivados de MFGMs en fórmulas infantiles (Ali, 2018; Bourlieu et al., 2018; Brink & Lönnnerdal, 2018; Castro-Gómez et al., 2016).

Las aplicaciones del suero de mantequilla requieren del uso de distintas tecnologías para su procesamiento (como la microfiltración, la pasteurización y el secado por aspersion) y cambios en los parámetros de procesamiento de la crema inicial, factores que impactan en la funcionalidad de este subproducto lácteo por las modificaciones estructurales que sufren sus lípidos y proteínas (Ali, 2018; Hansen et al., 2018).

Considerando las dificultades que plantea el aislamiento de las MFGMs y los antecedentes del uso tradicional del suero de mantequilla, se han planteado diversas propuestas donde se busca dar un valor agregado a productos elaborados con suero de mantequilla sin requerir su fraccionamiento: el mejoramiento de propiedades sensoriales y suplementación con fosfolípidos en quesos (untables y bajos en grasa), generación de películas comestibles, su incorporación en sistemas de encapsulamiento de compuestos con actividad biológica como ácidos grasos, y la elaboración de bebidas con fibra añadida y jugo de aloe vera y frutas (Ali, 2018, Augustin et al., 2014).

Cabe añadir que la utilización del suero de mantequilla puede verse afectada por la presencia de distintos defectos en el producto, principalmente la formación de sabores metálicos durante su almacenamiento en frío por oxidación de lípidos, consistencia pegajosa del polvo, la acidificación espontánea durante su almacenamiento en frío y el crecimiento bacteriano propiciado por su ambiente rico en nutrientes (Libudzisz & Stepaniak, 2002; Fauquant et al., 2014; Svanborg et al., 2015). Estos factores resultan en la corta vida de anaquel del producto a no ser que se someta a operaciones que retrasen su degradación como el secado por aspersion.

Sin importar los procesos tecnológicos a los que se someta el suero de mantequilla es frecuente su desnatado con el propósito de recuperar/eliminar lípidos residuales, los cuales tienden a obstaculizar el secado por aspersion (Morin, Jiménez-Flores & Pouliot, 2007; Fauquant et al., 2014; Lambert et al., 2016).

2.1.4 Funcionalidad tecnológica de los componentes del suero de mantequilla

2.1.4.1 Lípidos

Los fosfolípidos de la membrana del glóbulo graso tienen un rol importante como emulsificante en alimentos debido a su naturaleza ambifílica que les permite romper la tensión interfacial entre líquidos inmiscibles. El suero de mantequilla posee una concentración de MFGM 7 veces superior que la leche entera, por lo cual el suero de mantequilla en polvo es utilizado en panes, chocolates, margarina y productos lácteos, siendo una alternativa económica para reemplazar la adición de sólidos de leche en diversos productos, además de ayudar en el desarrollo de productos bajos en grasa mejorando sus propiedades sensoriales y estabilizando tanto emulsiones aceite en agua como emulsiones agua en aceite (Costa et al., 2010; Zanabria Eyzaguirre & Corregid, 2011; Sharma, Jana & Chavan, 2012; Szuhaj, 2016; Barry et al., 2018; Zhao et al., 2018).

2.1.4.2 Proteínas

Las proteínas lácteas poseen propiedades funcionales que le brindan atributos deseables a productos terminados, resultando así en su aplicación a distintos productos lácteos y otros tipos de alimentos (Cuadro 2). Entre estas proteínas se encuentran las caseínas, caseinatos, concentrados y aislados de proteína de suero y concentrados de proteína de leche. Su funcionalidad se puede clasificar en si está relacionada a hidrodinámica o hidratación (absorción de agua, solubilidad, viscosidad y gelación) o si dichas propiedades se deben a características de la

superficie de las proteínas, como son la emulsificación, espumado y formación de películas (Singh, 2011).

Las cadenas polipeptídicas de las caseínas unidas por interacciones no covalentes y la organización en micelas le dan a su estructura una dispersión estable de fracciones hidrofóbicas en un estado coloidal por acción de enlaces hidrofílicos, lo cual puede explicar propiedades fisicoquímicas como su alta capacidad de retención de agua, alta estabilidad al calor, capacidad de derretirse y capacidad surfactante, razones por las cuales esta proteína es adicionada a coberturas batidas, helados, pasteles, quesos y sopas principalmente como emulsificante (Sarode et al., 2016).

Cuadro 2. Propiedades funcionales de las proteínas lácteas y su aplicación en alimentos.
Adaptada de Singh (2011)

Propiedad funcional	Sistema alimenticio
Solubilidad	Bebidas
Emulsificación	Sustitutos de crema, licores cremosos, aderezos para ensaladas y postres
Espumado	Coberturas batidas, malteadas, mousses, pasteles, merengues
Unión de agua	Pan, carnes, barras, natillas, sopas, salsas, comidas con cultivos
Estabilidad al calor	Bebidas UHT, sopas, salsas, natillas
Gelación	Carnes, cuajos, queso, surimi, yogurt
Estabilidad al ácido	Bebidas ácidas, bebidas fermentadas

Las aplicaciones tecnológicas de las proteínas de suero de leche se explican en función de sus propiedades gelificantes, de emulsificación, de formación de espuma, y son térmicamente estables, que las vuelven extremadamente versátiles y se añaden a productos de confitería, yogures, jarabes, productos de panificación y productos cárnicos, permitiendo así mejorar sus atributos sensoriales, incrementar la biodisponibilidad de sales y aumentar el valor de saciedad de diversos productos

(Zafar et al., 2013; Ramos et al., 2016). Estas proteínas no solo están presentes en el suero de leche, sino que también se encuentran en el suero de mantequilla en una proporción caseína/proteínas de suero de leche similar a la leche descremada, aunque el contenido de lípidos es mayor por la presencia de las MFGMs y eso explica la diferencia de funcionalidad entre ambos productos lácteos (Svanborg et al., 2015).

2.1.4.3 Lactosa

La importancia industrial de este disacárido se debe a su rol crucial como sustrato para la fermentación por bacterias ácido lácticas durante la elaboración de yogur y distintas variedades de queso, su participación en reacciones de Maillard (explicada por su poder reductor) que ayuda a la formación de sabor y color en productos como confites y pan, su capacidad de ser procesada para la obtención de derivados como lactulosa, lactitol y ácido lactobiónico. Sus propiedades como baja higroscopicidad y alta solubilidad permiten que mejore la funcionalidad de grasas alimentarias y productos congelados, además de actuar como diluyente en colorantes, saborizantes y enzimas (Huppert & Gazi, 2016; Shendurse & Khekdar, 2016).

2.2 Tecnologías aplicadas en la recuperación de residuos lácteos

2.2.1 Polvos lácteos

La producción de leche está creciendo a nivel mundial debido a sus ventajas nutricionales y funcionales (Ji et al., 2016). La leche es un fluido complejo compuesto de diversos elementos que existen en distintos estados, como lactosa y minerales en solución, grasas en emulsión y proteínas en estado coloidal, lo que la hace muy versátil para ser consumida fresca o para ser transformada en distintos productos como queso, mantequilla y polvos lácteos (Boiarkina & Young, 2018).

Las principales razones para convertir leche líquida en polvo es para reducir los volúmenes que ocupa durante su almacenamiento y transporte y para extender su

vida útil al reducir su actividad de agua, lo que representa un ingrediente atractivo para la industria láctea por sus propiedades funcionales (Silva & O'Mahony, 2020).

De acuerdo con Boiarkina & Young (2018), la gran cantidad de tipos de polvos lácteos que existe es resultado de un aumento en la demanda por productos con diferentes propiedades funcionales y nutricionales, ayudados por el desarrollo de tecnologías de separación y membrana. Los tipos más comunes de polvos lácteos se presentan en el cuadro 3.

Sin importar el tipo de polvo lácteo, los materiales líquidos son usualmente secados por aspersión en forma de polvo para mayor facilidad de manejo, almacenamiento y transporte (Ji et al., 2016). Los polvos lácteos deben poseer una gama de atributos físicos y funcionales que cumplan las demandas de los usuarios finales a nivel doméstico e industrial, considerando la composición del polvo, tamaño, densidad, estructura e higroscopicidad (Kondor & Hogan, 2017). Estos polvos lácteos, particularmente aquellos altos en proteína, son ampliamente utilizados en productos lácteos y fórmula infantil, o utilizados como emulsificantes y estabilizantes en alimentos y bebidas.

2.2.2 Tecnología de membranas

Mediante el uso de tecnologías de membranas, una sustancia o compuesto sufre operaciones de transporte selectivo y separación de sus componentes mediante su paso por una membrana sintética mediante la aplicación de fuerza, como pueden ser presiones hidrostáticas y electrodiálisis (de Pinho & Minhalma, 2019). Las tecnologías de membranas poseen distintas ventajas con respecto a otros métodos para operaciones de concentración o separación, como una operación a temperaturas relativamente bajas, un amplio espectro de tamaño, buenos niveles de separación y que no se requiere un cambio de fase o estado de solventes (Goulas & Grandison, 2008).

Cuadro 3. Tipos y subtipos de polvos lácteos. Adaptada de Boiarkina & Young (2019)

Tipo	Subtipos	Composición
Polvo de leche entera (<i>whole milk powder</i> , WMP)	<ul style="list-style-type: none"> • Regular (no aglomerado) • Aglomerado (AWMP) • Instantáneo (IWMP) 	<ul style="list-style-type: none"> • Mínimo 26% de grasa
Polvo de leche descremada (<i>skim milk powder</i> , SMP)	<ul style="list-style-type: none"> • Regular (no aglomerado) • Instantáneo/aglomerado (ISMP) • <i>Ultra-heat treated</i> (UHT) 	<ul style="list-style-type: none"> • ~1% de grasa
Proteína de suero	<ul style="list-style-type: none"> • Concentrado de proteína de suero (WPC) • Aislado de proteína de suero (WPI) • Suero desmineralizado 	<ul style="list-style-type: none"> • 20-80% de proteína • >90% de proteína
Concentrado de proteína de leche (<i>milk protein concentrate</i> , MPC)	<ul style="list-style-type: none"> • MPC40-85 • Aislado de proteína de leche (MPI) 	<ul style="list-style-type: none"> • 40-85% de proteína • >90% de proteína
Polvos de caseína	<ul style="list-style-type: none"> • Caseína micelar (MC) • Caseinato de sodio/calcio (SC/CC) 	<ul style="list-style-type: none"> • 84-92% de proteína
Polvos de suero de mantequilla (<i>buttermilk</i> , bmp)	<ul style="list-style-type: none"> • Suero de mantequilla dulce • Suero de mantequilla ácido 	
Lactosa		<ul style="list-style-type: none"> • Pura
Polvo de crema		<ul style="list-style-type: none"> • 55-72% grasa

2.2.1.1 Microfiltración

La microfiltración se caracteriza por utilizar membranas con un tamaño de poro de 0.1-1.0 μm , y se utiliza ampliamente en la industria de alimentos para concentrar, separar y purificar macromoléculas, coloides y partículas suspendidas en soluciones, teniendo como aplicaciones la clarificación de jugos y cervezas y tratamiento de aguas residuales (Charcosset, 2012).

La industria láctea ha incorporado las tecnologías de membranas en diversas etapas de los procesos de manufactura de productos (Figura 5); esto es de especial importancia porque la leche es un sistema coloidal complejo con una multitud de especies que abarcan una amplia distribución de tamaño, pudiendo así fraccionar y concentrar varios componentes funcionales de la leche (Chen et al., 2019).

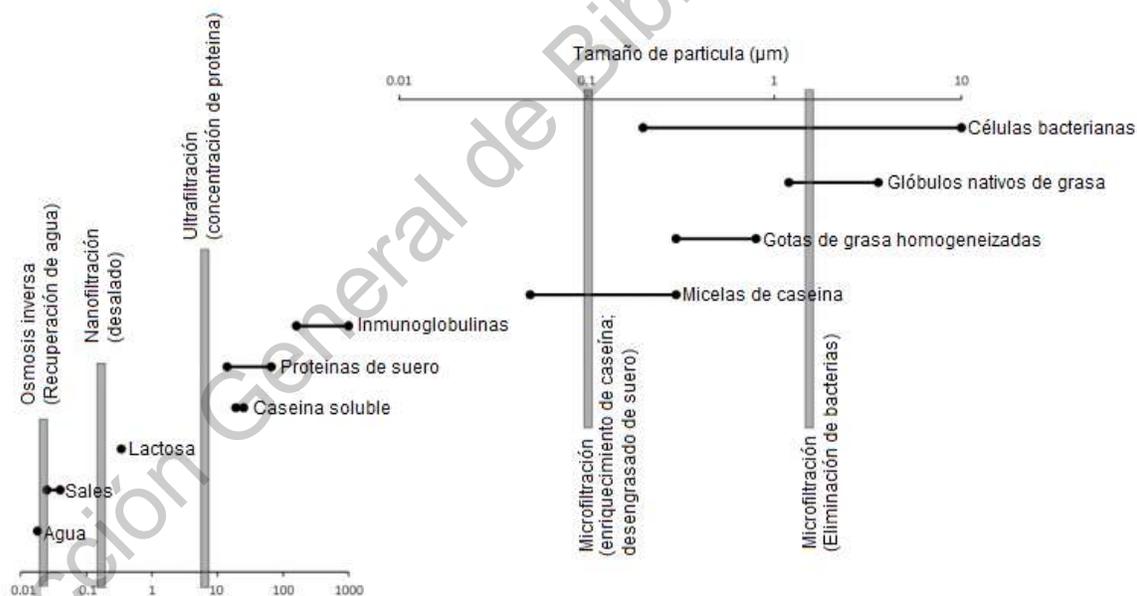


Figura 5. Ejemplos de aplicación de tecnologías de membrana en productos lácteos. Adaptado de Chen et al. (2019)

La microfiltración permite la separación de proteínas de distinto tamaño sin un impacto térmico o químico, presentando así diversas aplicaciones en la industria láctea como la obtención de micelas de caseína en su conformación nativa o la

extensión de la vida de anaquel de leche líquida al conjuntarse con pasteurización tradicional (Kulozik, 2019).

De acuerdo con Svanborg et al. (2015), el concentrado de proteínas de suero de leche obtenido mediante microfiltración de leche desnatada posee funcionalidades diferentes al concentrado proteico proveniente de suero de leche, como una excelente solubilidad y formación de geles después de tratamientos térmicos, además de menor contenido de minerales y ausencia de caseinomacropéptidos. La microfiltración permite obtener fracciones ricas en MFGMs y micelas de caseína a partir de suero de mantequilla. No obstante, la similitud en tamaño entre las membranas de glóbulo graso y las micelas de caseínas dificulta su separación mediante microfiltración. La alta proporción de caseínas con respecto a la proteína total en suero de mantequilla permite su mayor recuperación durante la microfiltración, y este retenido puede utilizarse como material inicial para una posterior separación y purificación de fosfolípidos.

Morin, Jiménez-Flores y Pouliot (2004) emplearon la microfiltración para separar fosfolípidos de las MFGMs, demostrando que la temperatura de filtración afecta el paso de los lípidos, siendo este reducido en un 50% al utilizar suero de mantequilla pasteurizado fresco en comparación a suero de mantequilla en polvo reconstituido. Esto se atribuye a que el procesamiento del suero en polvo (como pasos de concentración evaporativa o secado por aspersion) podría inducir un reordenamiento o ruptura parcial de la MFGM, reduciendo así el tamaño de partícula.

2.2.3 Secado por aspersion

El secado por aspersion es una tecnología rápida y económica para producir polvos secos con características deseables como tamaño y forma de partícula uniformes y contenido de humedad residual específico (Teijeiro et al., 2018).

El secado por aspersión es un proceso multifase de secado convectivo que involucra la atomización de gotas, transporte de partículas, evaporación y la interacción entre partículas, gotas y paredes del equipo de secado y si bien es un proceso de secado de condiciones no agresivas, si no se cuidan los parámetros utilizados se pueden dañar diversos productos sensibles por la deshidratación y temperaturas elevadas y ocasionar defectos de calidad (Schmitz-Schug, Kulozik & Foerst, 2016). incluye al menos un punto y seguido

La superficie de un polvo es importante porque es la parte de la partícula que interactuará con su ambiente. En general, se acepta que el tamaño de partícula tendrá impacto en las propiedades funcionales de un polvo, como su rehidratación, apelmazamiento, flujo y espesamiento (Nikolova et al., 2014).

Los productos lácteos, al ser altamente perecederos, son transformados en polvos para extender su vida de anaquel; los cambios inducidos en sus componentes por el tratamiento térmico y la pérdida de agua les permite ser ingredientes con propiedades funcionales aptos para ser añadidos a diversos productos con valor agregado, como productos de panadería, postres y productos cárnicos (Sharma et al., 2012).

Las etapas de manufactura de la leche descremada en polvo incluyen su evaporación para un contenido de ~45-50% de sólidos totales (ST) y un secado por aspersión hasta ~97% de ST. Dependiendo de la severidad del tratamiento térmico se podrá observar la desnaturalización de las proteínas de suero de leche, la unión de estas a las micelas de caseína y la dispersión de sales, proteínas de suero y caseínas entre el suero y las fases coloides de la leche. Dichos cambios afectarán características de procesado, como la gelación en productos como yogurt y queso (Lin et al., 2018)

Aalaei, Rayner y Sjöholm (2016) indican que la probabilidad de que la leche descremada en polvo sufra una reacción de Maillard durante su almacenamiento en

condiciones ambientales comunes, tanto en anaquel como en vida de anaquel secundaria (producto abierto en casa), se debe a su contenido de proteína y carbohidratos. Esto propicia una unión entre lisina y lactosa, lo que se considera el primer paso en la reacción de Maillard, ocasionando la formación de compuestos pro-inflamatorios. En pruebas realizadas con leche descremada en polvo almacenada a distintas temperaturas y humedades relativas, estos investigadores concluyeron que, en este producto lácteo, si bien el secado por aspersion puede favorecer reacciones de Maillard en mayor medida que la liofilización, se presenta menor incidencia de este defecto en comparación al secado por tambor.

Uno de los principales problemas durante el almacenamiento de lactosa en polvo es la aglomeración no deseada de partículas en grumos de tamaño y dureza variables, lo cual ocurre por acción de aumentos de temperatura por encima de la temperatura de transición vítrea, una humedad relativa alta que disminuye esta temperatura y/o promueve la absorción de agua en el polvo, el aumento en la interacción de partículas por acción de fuerzas mecánicas y la presencia de impurezas en el polvo que aumentan la higroscopicidad de la lactosa (Carpin et al., 2017). incluye al menos un punto y seguido

En un estudio por Morin et al. (2007), el contenido de fosfolípidos tanto en suero de mantequilla pasteurizado como sin pasteurizar disminuyó significativamente después del secado por aspersion a temperaturas de entrada y salida de aire de 195 y 85 °C, respectivamente; en el caso de suero de crema no pasteurizada la disminución relativa comparada con suero desnatado fue 38.2% (1.49% a 0.42%) y 40.6% (1.28% a 0.76%) para suero de mantequilla proveniente de crema pasteurizada. La mayoría de los fosfolípidos del suero de mantequilla se encuentran en los fragmentos de MFGM, por lo que una pérdida mayor de fosfolípidos podría indicar pérdida de fragmentos completos. Se ha reportado que las proteínas de MFGM son muy reactivas a temperaturas relativamente bajas (60 °C), el calentamiento a 80 °C causa una pérdida total de la proteína PAS 6/7 de la membrana de glóbulo graso. El tratamiento térmico combinado con remoción de

agua e incremento de fuerza iónica inducidos por el secado por aspersión podría formar complejos entre proteínas de leche, proteínas de las membranas de glóbulo graso de la leche y los fosfolípidos, lo cual impediría su extracción mediante el método Mojonnier. Estos cambios producidos en los constituyentes del suero de mantequilla impactarán en la funcionalidad del subproducto lácteo.

2.2.3 Liofilización

Aunque el secado por aspersión es un proceso económico para la producción de leche en polvo, las limitaciones de este proceso (al ser una operación que involucra calor, le imparte un sabor a cocido algo astringente, siendo perjudicial para su sabor y olor) garantizan la necesidad de un método de secado alternativo (Bushani & Anandharamakrishnan, 2017).

La liofilización (*freeze-drying*) es un método de preservación que se basa en el principio de remover el solvente de una formulación líquida. El proceso incluye 5 actividades esenciales que son el congelamiento, sublimación, desorción, bombeo al vacío y condensación por vapor; primero, las formulaciones líquidas son enfriadas a bajas temperaturas y el agua presente en el material se congela completamente. Posteriormente, a presiones reducidas, el solvente congelado es calentado y removido del estado sólido directamente a la fase de vapor (secado primario por sublimación). Esto es seguido por un proceso de desorción (secado secundario) para la remoción del solvente sin congelar (Waghmare et al., 2021).

Tradicionalmente, esta técnica se utiliza para deshidratar productos farmacéuticos y biotecnológicos de alto valor, y su aplicación en alimentos tiende a limitarse a productos que se consideran de alto valor (café, especias, cárnicos, ingredientes y frutas deshidratadas) con altos márgenes de ganancia. Aunque es una técnica de secado costosa, ésta posee la ventaja de preservar atributos como funcionalidad, viabilidad celular y valor nutricional (Mujumdar, Law & Woo, 2016).

En la industria láctea se usa predominantemente la liofilización para la preservación de cultivos iniciadores y encapsulación de organismos probióticos para su uso como ingredientes funcionales. Otros productos lácteos adecuados para liofilización son leche, queso, crema, yogurt y helado, utilizados en la industria panificadora, restaurantes y la industria biotecnológica, además de presentar potencial como comida espacial, de emergencia y raciones militares (Bushani & Anandharamakrishnan, 2017).

La liofilización no representa un riesgo de desnaturalización de proteínas ya que se realiza a vacío y a bajas temperaturas, además de retrasar reacciones de deterioro, por lo que se considera el mejor método para la obtención de productos secos de alta calidad (Ganju & Gogate, 2017). Entre las ventajas que este proceso brinda a productos lácteos se encuentran una mayor retención de vitaminas sensibles al calor, prevención de la desnaturalización de las proteínas de suero y reacciones de Maillard, un producto bajo en humedad estable en anaquel y una estructura porosa y rígida (Deshwal et al., 2020).

2.2.4 Ultrasonidos de alta intensidad

La industria alimentaria constantemente busca tecnologías innovadoras para producir productos seguros y de alta calidad, mejorando la eficiencia de los procesos y reduciendo el consumo energético, lo que conduce a estudios sobre la aplicación de tecnologías emergentes como los ultrasonidos en el área del procesamiento de alimentos (Tao & Sun, 2014).

Los ultrasonidos son ondas acústicas fuera del espectro de audición humana con frecuencias superiores a 20 kHz y se pueden clasificar en función de su frecuencia e intensidad, de lo cual dependerá su aplicación en la industria alimentaria (Awad et al., 2012). En general, los ultrasonidos producen ciclos de compresión y descompresión en el medio donde viajan, formando burbujas de cavitación que crecen y colapsan dando lugar a regiones de elevadas temperatura y presión

(Figura 6), produciendo así ondas de alta energía y turbulencia en la zona de cavitación (Cárcel et al., 2012). Este proceso induce cambios físicos, químicos y mecánicos sobre el sustrato al que se aplicaron los ultrasonidos (Ozuna et al., 2015). Se considera una tecnología verde ya que requiere menos tiempo, agua y energía que otras tecnologías usadas con aplicaciones finales similares (Chemat, Zill-e-Huma & Khan, 2011).

La importancia de los ultrasonidos radica en su capacidad de modificar la estructura de los alimentos y las propiedades sensoriales como la textura, la consistencia y la palatabilidad que dependen de la estructura, e influye en la liberación de sabor, biodisponibilidad y digestibilidad de nutrientes, índice glicémico y estabilidad de los productos (Terefe, Sikes & Juliano, 2016). Adicionalmente, el tratamiento con ultrasonido facilita operaciones necesarias para el procesamiento de alimentos como extracción, secado y filtrado en aquellos productos sensibles a cambios bruscos de temperatura o susceptibles a modificaciones químicas, físicas y microbiológicas (Chemat, Zill-e-Huma & Khan, 2011).

La fuerza que conduce el procesamiento por ultrasonido de alta intensidad es la cavitación acústica. En su mayoría, las ondas ultrasónicas se aplican en sistemas líquidos o líquido-sólido, ya sea insertando la sonda de ultrasonido dentro del sistema o sumergiendo las muestras en baños ultrasónicos para recibir la irradiación acústica. Se generan burbujas de cavitación por el paso de la onda ultrasónica a través de la matriz líquida, y como cualquier onda acústica, es transmitida como una serie de ciclos de compresión y rarefacción. Cuando la presión negativa del ciclo de rarefacción excede las fuerzas de atracción entre las moléculas del líquido, se forma un vacío que contendrá vapor de la solución, creciendo en tamaño durante ciclos sucesivos para formar una burbuja de cavitación acústica. Algunas de estas burbujas se expanden a tamaños inestables y colapsan violentamente, causando cambios de presión y temperatura durante su implosión (Figura 6) (Tao & Sun, 2014; Tiwari & Mason, 2012).

e consideran ultrasonidos de alta intensidad a aquellas ondas sonoras aplicadas con intensidades superiores a 1 W/cm^2 y frecuencias comprendidas entre 20 y 100

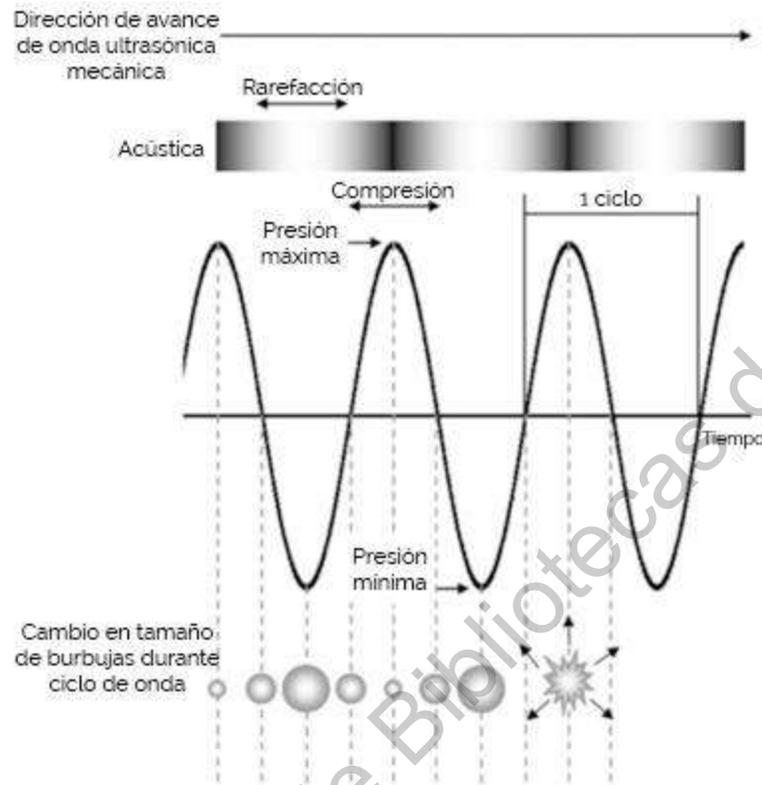


Figura 6. Cavitación por ultrasonidos. Adaptado de Soria & Villamiel (2010).

kHz (Higuera-Barraza et al., 2016). Entre sus ventajas se encuentran su corto tiempo de acción, operación simple, facilidad de control y su bajo consumo de energía (Ma, Wang & Guo, 2018).

En el contexto de la industria alimenticia, los ultrasonidos de alta intensidad se han utilizado para modificar o mejorar diversos procesos (Tao & Sun, 2014). Sus principales aplicaciones son la extracción de compuestos de distinta naturaleza, congelación, deshidratación osmótica y emulsificación, procedimientos usualmente aplicados en sistemas líquido-líquido o líquido-sólido mediante uso de equipos especialmente diseñados por la facilidad con la que las ondas se transmiten en líquidos (Carcel et al., 2012).

Los ultrasonidos de alta intensidad han encontrado aplicaciones en la industria láctea para ayudar en el procesamiento de diversos productos, incluyendo, pero no limitándose a la mejora de solubilidad y espumado de proteínas de suero de leche, alteración de los geles formados a partir de leche e inactivación de enzimas y bacterias (Ma et al., 2018).

2.2.3.2 Modificación de proteínas lácteas utilizando ultrasonidos de alta intensidad

Las proteínas poseen propiedades funcionales importantes: su carácter ambifílico y capacidad para formar películas interfaciales crean sistemas de estabilización como espumas y emulsiones; también pueden interactuar para crear redes y geles, desarrollando así películas comestibles (Higuera-Barraza et al., 2016).

En años recientes, los ultrasonidos de alta intensidad se han empleado para provocar cambios conformacionales y mejorar la funcionalidad de varias proteínas provenientes de leche, huevo, soya y carne (Awad et al., 2012). La aplicación de ultrasonidos en proteínas afecta su hidratación, tamaño molecular, hidrofobicidad y conformación estructural, lo que modifica muchas de sus propiedades funcionales como la solubilidad, viscosidad, emulsificación y gelificación (Abadía-García et al., 2016).

Hay distintos estudios de ultrasonido en proteínas lácteas, entre los que se encuentran la evaluación del efecto de ultrasonido en las propiedades fisicoquímicas de proteínas de suero de leche reconstituidas, observando una mejora en sus propiedades gelificantes obteniendo así geles con mayor fuerza y menos sinéresis (Higuera-Barraza et al., 2016).

Wu, Hulber y Mount (2000) observaron un aumento en la capacidad de retención de agua en yogurt en tres niveles de aplicación de ultrasonido, atribuido a una reducción del tamaño de partícula por efecto de la cavitación que además promovió la unión de micelas de caseína con lípidos de la membrana del glóbulo graso de

leche y la exposición de regiones hidrofílicas de las proteínas hacia la fase acuosa del yogurt.

Jambrak et al. (2008) reportan un incremento en la solubilidad en un aislado de proteína de suero de leche y un hidrolizado de proteína de suero después de la aplicación de ultrasonido con frecuencias de 20 y 40 kHz, además de un aumento en la capacidad de espumado y estabilidad de espuma en aislado de proteína de suero, concentrado de proteína de suero e hidrolizado de proteína de suero.

Barukčić et al. (2015) realizaron un estudio donde la aplicación de ultrasonido de alta intensidad aumentó la viscosidad (ligado a un aumento de la capacidad de retención de agua) y el tamaño de las partículas de suero de leche dulce, atribuible a la desnaturalización de proteínas que posteriormente forman agregados.

Abadía-García et al. (2016) demostraron que el tratamiento de proteínas de suero de leche con ultrasonido de alta intensidad a 0.092 W/mL antes de un tratamiento con bromelina redujo en un 95% el tiempo necesario para formar hidrolizados, atribuible a cambios en la estructura terciaria y/o cuaternaria de la α -lactoalbúmina y β -lactoalbúmina por acción de las ondas sonoras aplicadas.

2.2.3.3 Modificación de lípidos mediante ultrasonido

El ultrasonido ha encontrado aplicación potencial en lípidos como una tecnología utilizada para asistir la extracción de éstos y compuestos de naturaleza lipídica (como poliprenoles) a partir de distintas fuentes, como algas, semillas de lino y hojas de *Ginkgo biloba* permitiendo mayores rendimientos de extracción en comparación o en conjunción a solventes tradicionales a base de petróleo (Metherel et al., 2009; Keris-Sen et al., 2014; Zhang et al., 2016).

La aplicación del ultrasonido en lípidos de productos lácteos se dirige a tratar de controlar su oxidación. Torkamani et al. (2014) sometieron suero de leche

proveniente de la fabricación de queso Cheddar a distintas combinaciones de frecuencia (20-2000 kHz) y energía (8-390 kJ/kg) para conocer su impacto en la oxidación de los lípidos presentes y mejorar la calidad del suero, reportando que la mayor formación de radicales hidroxilo fue encontrado entre 400 y 1000 kHz, pero la oxidación ocurrió tanto en muestras sonicadas como no sonicadas y esta no fue promovida en ningún tratamiento, no se afectó la concentración de ácidos grasos libres ni se cambió la composición de fosfolípidos. Los autores llegan a la conclusión de que se puede aplicar ultrasonido a muestras de suero de leche sin afectar el perfil lipídico.

Juliano et al. (2014) sonicaron lotes de 2 L de leche sin pasteurizar y lotes de leche descremada a diversas frecuencias (20, 400, 1000, 1600 y 2000 kHz), temperaturas de procesamiento, tiempos de tratamiento y niveles de energía, parámetros aplicados para evaluar su efecto en la estabilidad de la leche durante su almacenamiento a 4 °C a las unidades durante 14 días, concluyendo que la oxidación de los lípidos en la leche puede ser controlada al disminuir la energía aplicada por el ultrasonido y la temperatura de procesamiento. Se argumenta que el colapso de las burbujas de cavitación producidas por gradientes de presión causados por ciclos de compresión y rarefacción durante el procesamiento con ultrasonido genera zonas calientes que conducen a un incremento de la temperatura del líquido. Las temperaturas extremas y las condiciones de agitación creadas por la cavitación resultan en la generación de radicales hidroxilo e hidrógeno que promueven la oxidación de lípidos. Marchesini et al. (2012) reportaron resultados similares en leche sin pasteurizar tratada a 200 kHz y 400 W, quienes también observaron que la adición de CO₂ antes de la sonicación disminuyó la formación de productos de oxidación y la detección de un sabor “a quemado”, lo que indica que cuidar la intensidad y periodos de exposición es fundamental durante el tratamiento de matrices lácteas con ultrasonidos.

2.2.3.4 Modificación de lactosa utilizando ultrasonidos de alta intensidad

La cristalización de lactosa por ultrasonidos reduce su distribución de tamaño (se obtienen partículas más uniformes) e incrementa el rendimiento de cristalización. Existen teorías que explican el mecanismo mediante el cual los ultrasonidos modifican la nucleación, una de ellas explicando este fenómeno mediante una mayor transferencia de masa sólido-líquido y energía promovida por las burbujas de cavitación (Sánchez-García et al., 2019).

En un estudio de Sánchez-García et al. (2019), la presencia de proteínas de suero de leche en soluciones con 25% de lactosa sonicadas a 9 y 50 J/mL permitió una aceleración del proceso de cristalización de lactosa en comparación a las muestras control, pero indujo la formación de cristales amorfos.

2.3 Helado

El helado es uno de los productos lácteos más ampliamente consumidos debido a su valor nutricional (además de macronutrientes, posee calcio y vitaminas E, D y A) y su efecto refrescante, particularmente en meses de verano (Durmaz et al., 2020; Ismail et al., 2020). Se define como un postre lácteo congelado compuesto de una mezcla de aire, grasa de leche o no láctea, sólidos no grasos de leche (*milk solids-not-fat*, MSNF), endulzantes, estabilizantes, emulsificantes y saborizantes, los cuales, al congelarse, forman una matriz que contienen burbujas de aire, glóbulos de grasa, cristales de hielo y una fase de suero no congelada (Kurt & Atalar, 2018).

Se puede observar un esquema general de la microestructura del helado en la Figura 7. Una base de helado contiene glóbulos de grasa parcialmente cristalizados y micelas de caseína como partículas en una matriz líquida que es una solución de azúcares, proteínas y estabilizantes. Los glóbulos de grasa en coalescencia parcial también se encuentran en la superficie de las celdas de aire, estabilizándolas. Esto le confiere al helado su estructura característica que lo diferencia de otros postres lácteos congelados (Clarke, 2012).

Una base de helado es la combinación de ingredientes sin congelar que se usa para suministrar los constituyentes anteriormente mencionados (excepto el aire y los saborizantes) y la combinación adecuada e interacción de estos ingredientes conferirán al helado características sensoriales deseables incluye un punto y seguido (Goff & Hartel, 2013). A un nivel estructural más complejo, se explica que la base para helado contiene glóbulos de grasa parcialmente cristalinos y micelas de caseína como partículas discretas en una solución de azúcares, proteínas de suero dispersas y estabilizantes, observándose adsorción competitiva de proteínas (micelas de caseína, β -caseína, proteínas de suero parcialmente desnaturalizadas y emulsificantes) en la superficie del glóbulo de grasa. El helado, ya sometido a congelamiento dinámico, contiene cristales de hielo, celdas o burbujas de aire y glóbulos de grasa en coalescencia parcial como fases discretas dentro de un suero sin congelar que contiene el material disuelto. Estos glóbulos de grasa, proteínas y emulsificantes se adsorben en la superficie de las celdas de aire, ligando las burbujas unas con otras (Figura 8) Un ejemplo de formulación de helado se encuentra en el cuadro 4.

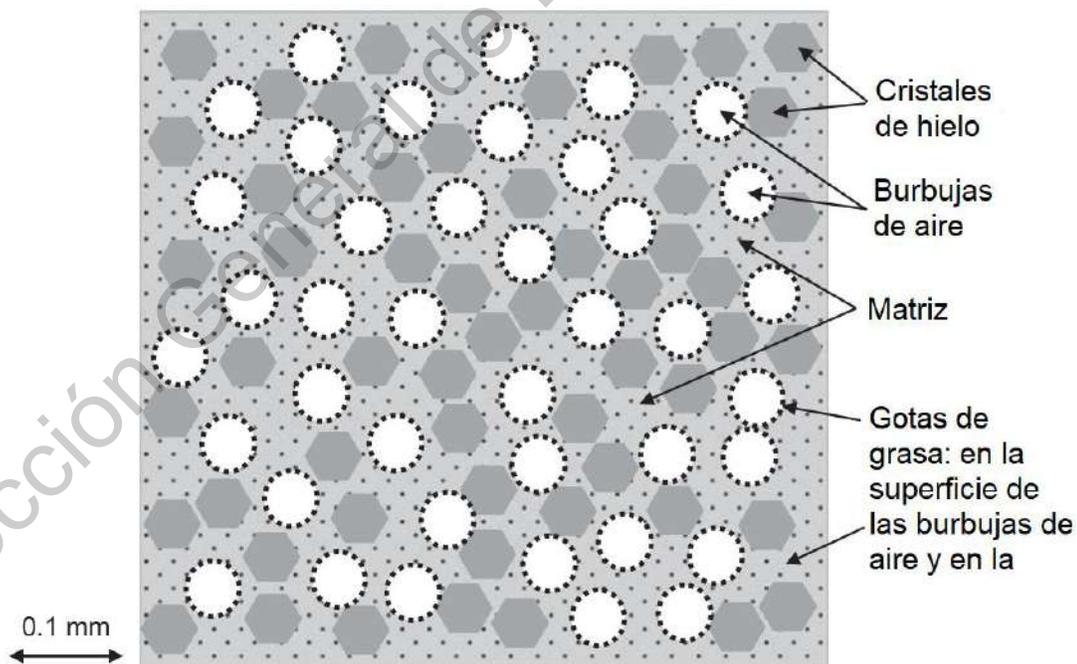


Figura 7. Diagrama esquemático de la microestructura del helado.

Adaptado de Clarke (2012).

De acuerdo con Goff (2018), el primer paso para desarrollar una formulación de helado es definir el nivel de grasa, variando del 3-4% para formulaciones bajas en grasa hasta 16% en productos *super premium*. Generalmente, la grasa de leche se suministra a través de crema, mantequilla o grasa de leche anhidra. Este ingrediente le confiere al producto una textura suave y cremosa al lubricar el paladar.

Los sólidos de leche no grasos (MSNF) comprenden la lactosa, proteínas lácteas, vitaminas, minerales y componentes menores de los productos lácteos de donde provienen. Entre las fuentes más comúnmente utilizadas se encuentran el polvo de leche descremada, leche condensada e ingredientes provenientes del concentrado de suero de leche. Las proteínas, con su capacidad de emulsificación, espumado y retención de agua, contribuyen a la formación de burbujas de aire y al aumento de viscosidad de la mezcla, resultando en una mezcla con una textura deseable y una reducción en la tasa de derretimiento del helado (Deosarkar et al., 2016).

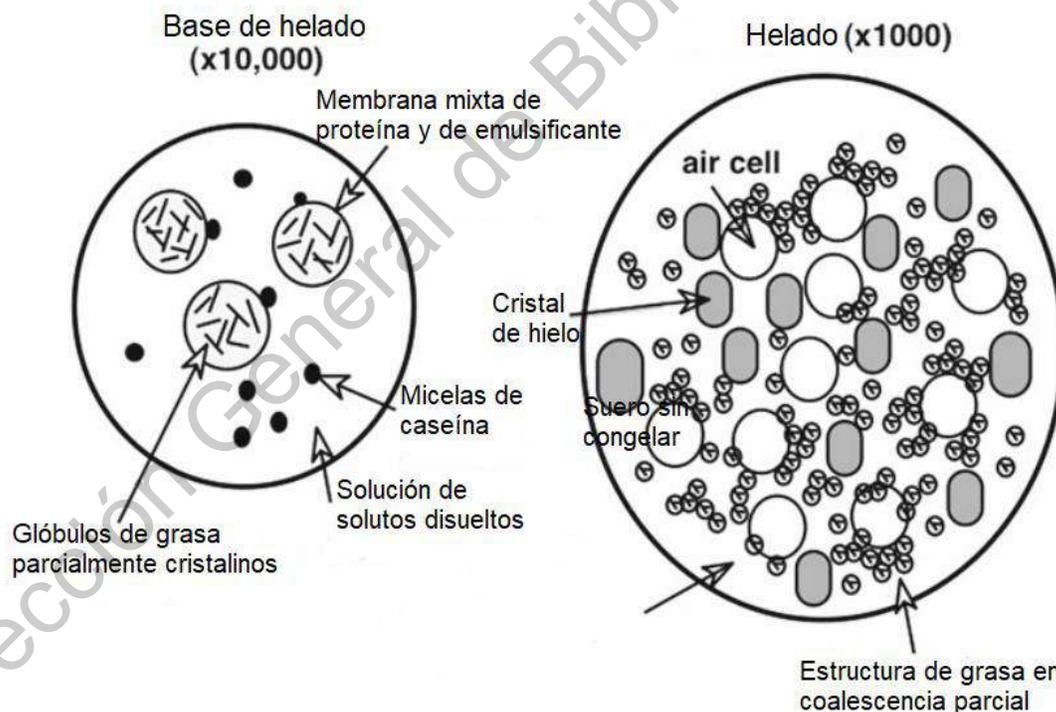


Figura 8. Estructura de base de helado y helado. Adaptado de Goff & Hartel (2013).

Endulzantes como la sacarosa y sólidos de glucosa, además de proveer dulzura al helado, contribuyen al aumento de los sólidos totales y a una reducción del punto de congelamiento de la mezcla (Goff, 2018). La dulzura recomendable es el equivalente a 13-16 % de sacarosa en mezclas con 36-38 % de sólidos totales; un nivel mayor de azúcar puede disminuir la capacidad de batido de la mezcla, y la reducción en el punto de congelamiento conduce a un incremento en la tasa de derretimiento del helado. La lactosa, presente de forma natural en productos lácteos, también contribuye a la dulzura del producto, reducción del punto de congelamiento y al conteo de sólidos totales, pero posee la desventaja de conferir una textura arenosa al helado por su facilidad de cristalización. (Goff & Hartel, 2013).

Cuadro 4. Composición típica de una mezcla de helado. Adaptado de Clarke (2012)

Ingrediente	Cantidad (% peso)
Grasa	7-15 ya se indica el % arriba
Proteínas de leche	4-5
Lactosa	5-7
Otros azúcares	12-16
Estabilizantes, emulsificantes y saborizantes	0.5
Sólidos totales	28-40
Agua	60-72

Los estabilizantes son polisacáridos que actúan en las fases de hielo y suero sin congelar, ayudando a estabilizar la estructura del helado. Estos ingredientes, como la goma guar y goma xantana, confieren al helado propiedades deseables como una mejora en la textura y cuerpo, además de retrasar y reducir el crecimiento de cristales de hielo y lactosa durante el almacenamiento (Deosarkar et al., 2016).

En las mezclas de helado existe suficiente proteína para emulsificar la mezcla, por lo que la adición de emulsificantes se realiza con el propósito de desestabilizar la grasa presente. Al reducir la tensión superficial entre el agua y la grasa de la mezcla, se logra desplazar la proteína presente en la superficie del glóbulo de grasa, lo que reduce la estabilidad del glóbulo y permite su coalescencia parcial durante los procesos de batido y congelamiento. Esto conlleva a la formación de una estructura de grasa en el producto que contribuye positivamente a la textura y propiedades de derretimiento (Goff & Hartel, 2013).

Variaciones en la proporción de ingredientes nos darán distintos tipos de helado con diferentes características. En general, formulaciones con cantidades altas de sólidos totales dan un helado de mejor calidad. Helados bajos en grasa (~ 5 %) poseen niveles de grasa, azúcares y proteína similares a un yogurt saborizado convencional mientras que, un helado alto en grasa y menor tasa de *overrun* nos dará un helado *premium* con una cantidad de grasa y aporte energético mayor (Clarke, 2012).

Entre las prácticas actuales para la elaboración de helados, se nota una preferencia por parte de los consumidores en buscar productos con menor aporte calórico y/o beneficios agregados a la salud, mientras se mantienen atributos sensoriales aceptables, por lo que estudios recientes se han enfocado en alimentos saludables con propiedades funcionales y que sean ricos en nutraceuticos (Kurt & Atalar, 2018; Ismail et al., 2020). Desde un punto tecnológico esto implica un reto debido a que la grasa y el azúcar son los principales componentes que le aportan su valor calórico al helado, pero su reemplazo o reducción afecta parámetros de calidad como sus propiedades térmicas. La grasa presente en la mezcla no debe estar completamente sólida o líquida entre -5 y 5 °C para permitir su coalescencia parcial y estabilizar las burbujas de aire de la estructura del helado (Clarke, 2012; Pintor-Jardines et al., 2018). Un incremento en la cantidad de proteína en una base de helado mejora su contenido nutricional, pero puede tener un impacto negativo al crear una emulsión que no se pueda desestabilizar, resultando en una espuma muy inestable y un helado seco y de textura “dura” (Clarke, 2012; Daw & Hartel, 2015).

Simultáneamente, la industria láctea ha estado prestando atención a sus subproductos, como el suero de leche y el suero de mantequilla, ya que representan aproximadamente el 80% de la leche ocupada en distintos procesamientos, generando altos costos de disposición si se quiere evitar su impacto ambiental. Al poseer sustancias bioactivas y propiedades funcionales, los subproductos lácteos representan un material de bajo costo para reemplazar la leche en distintos productos lácteos, existiendo así distintos estudios que evalúan su uso en formulaciones de helado (Meneses et al., 2020; Szkolnicka et al., 2020), encontrando ligeras pero aceptables variaciones en distintos parámetros sensoriales como color y textura.

En particular, el suero de mantequilla se ha utilizado en formulaciones de helado como fuente de MSNF y agua por disponibilidad y/o costo del ingrediente, siendo particularmente deseable en formulaciones con bajo contenido de grasa, en ausencia de emulsificantes y/o estabilizantes, o con cualquier forma de grasa no emulsionada (como mantequilla), ya que los fragmentos de MFGM presentes en el suero de mantequilla contribuyen a la facilidad de batido de la mezcla. Adicionalmente, este ingrediente puede conferirle un sabor distintivo a la mezcla de helado, usualmente descrito como un sabor “fresco” (Clarke, 2012; Goff & Hartel, 2013). El uso de suero de mantequilla proveniente de crema dulce (sin presencia de cultivos) en una formulación sin emulsificantes no causó una diferencia significativa en porcentaje de *overrun* ni en evaluaciones sensoriales después de 14 días de almacenamiento al compararse contra un helado control de leche descremada.

Se pueden ocupar distintos ingredientes y subproductos dependiendo del tipo de helado que se desea producir. Los helados tipo *premium*, de los principales tipos de helado más consumidos a nivel mundial, generalmente están elaborados de ingredientes de alta calidad y una cantidad relativamente alta de grasa láctea y una cantidad pequeña de aire, explicando así su mayor costo en comparación a helados

económicos con ingredientes más baratos (como grasa vegetal) y un mayor contenido de aire (Clarke, 2012). En general, se consideran como *premium* a aquellas formulaciones de helado con un contenido de grasa mayor al 12%, siendo lo usual del 11 al 15% (Park et al., 2015), pero no es inusual encontrar productos con porcentajes de grasa del 15 al 20% (Clarke, 2012).

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

3. JUSTIFICACIÓN

La industria láctea constantemente busca dar un valor agregado a la leche y sus productos, la innovación en procesos y productos y la sustentabilidad, esta última comprendida por la reducción de residuos y la reutilización de subproductos (Olabi et al., 2015). El uso de distintas tecnologías emergentes, como lo es el ultrasonido de alta intensidad, permite la modificación estructural y funcional de distintos subproductos para darles un valor añadido, incluidos distintos polvos de origen lácteo. Si bien existen estudios donde se utilizan subproductos lácteos, incluyendo el suero de mantequilla, para su incorporación en helado (Szkolnicka et al., 2020), no existen antecedentes de suero de mantequilla tratado con ultrasonido de alta intensidad por qué es una justificación ni de la aplicación de un polvo lácteo ultrasonicado incorporado en una formulación de helado. Es importante realizar estudios que evalúen el impacto del procesamiento de subproductos para su aprovechamiento, generando conocimiento que pueda conducir a la aplicación de dichos subproductos en productos alimenticios, a partir de los cambios estructurales y funcionales inducidos por la aplicación de tecnologías emergentes.

Considerando que es un ingrediente con diversos componentes como fosfolípidos y proteínas que le brindan propiedades funcionales y valor nutricional, y dado que el uso de distintas tecnologías puede permitir la modificación de los componentes de diferentes matrices alimentarias, someter el suero de mantequilla a ultrasonido de alta intensidad influye en su funcionalidad, permitiendo así obtener un ingrediente funcional aplicable a diversos productos con valor agregado.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Aplicar ultrasonido de alta intensidad para inducir cambios en la estructura de los sólidos del suero de mantequilla, alterando así su funcionalidad tecnológica para su incorporación en una matriz alimenticia.

4.2 Específicos

- Reconstituir sólidos de suero de mantequilla y someterlos a distintas condiciones de ultrasonido de alta intensidad para caracterizar sus propiedades funcionales
- Analizar los cambios estructurales inducidos por los ultrasonidos de alta intensidad en los sólidos de suero de mantequilla para relacionarlos con las propiedades funcionales evaluadas (propiedades emulsificantes, solubilidad, capacidad de absorción de grasa, viscosidad).
- Incorporar el suero de mantequilla ultrasonicado en una formulación de helado para conocer el impacto del ingrediente en los parámetros de calidad de la matriz alimenticia elegida, como lo son la tasa de derretimiento, color y overrun.

5. METODOLOGÍA

5.1 Modificación ultrasónica del concentrado de suero de mantequilla

Las soluciones se prepararon a partir 15 g de sólidos de suero de mantequilla en polvo (Hoosier Hill Farm) dispersados en 50 mL de agua destilada. Posteriormente, las soluciones fueron agitadas por 30 min y colocadas en refrigeración por ~16 horas a 4 °C para permitir la rehidratación del polvo.

El tratamiento se aplicó utilizando un homogeneizador ultrasónico (Cole-Palmer, 750 W, 20 kHz) provisto de una sonda de titanio (diámetro de 13 mm) sumergida 3 cm en la solución. Los niveles de amplitud sónica y tiempo de tratamiento se detallan en el cuadro 5. La temperatura se mantuvo constante (~25 °C) con el objetivo de excluir el efecto térmico, utilizando recirculación de agua fría en un reactor enchaquetado.

Cuadro 5. Diseño experimental

Factores	Niveles
Amplitud sónica	20, 40 y 60%
Tiempo	5, 10 y 15 minutos

Posteriormente, se llevó a cabo la liofilización de las muestras en un equipo Triad Freezone (Labconco, Kansas City, MO, EUA). Las muestras se pulverizaron y empacaron al vacío en bolsas de plástico, almacenándose en cajas de unicel, dentro de un cajón fresco, seco y alejado de la luz solar. Cada vez que se abrían las muestras, éstas se volvían a sellar al vacío.

5.2 Caracterización del concentrado de suero de mantequilla

5.2.1 Análisis proximales

5.2.1.1 Determinación de proteínas

Se calculó el porcentaje de nitrógeno por método Kjeldahl en concordancia con los lineamientos de la AOAC (1980). El porcentaje total de proteína en la muestra se calculó multiplicando el porcentaje de nitrógeno x 6.38.

5.2.1.2 Determinación de cenizas por gravimetría

Se calculó el contenido de cenizas por gravimetría siguiendo el método establecido por la AOAC partiendo de 1 g de muestra del ingrediente funcional (AOAC, 1980).

5.2.1.3 Determinación de grasa por el método de Röse-Gottlieb

Se determinó el contenido de grasa en el concentrado derivado de suero de mantequilla siguiendo el procedimiento de referencia de la AOAC para el método de Röse-Gottlieb a partir de 1 g de muestra seca (AOAC, 1980).

5.2.2. Determinación de propiedades funcionales

5.2.2.1 Determinación de solubilidad

Esta determinación se llevó a cabo siguiendo el método de Anema et al. (2006). Soluciones al 5% (w/w) se agitaron a temperatura ambiente por 30 min con un agitado magnético. Una muestra previamente pesada de solución se centrifugó a 700 g por 10 min, el sobrenadante se recolectó en un plato pre-pesado y se registró el peso del plato con el sobrenadante. Posteriormente, el sobrenadante se secó toda la noche a 105 °C y se calcularon los sólidos. La cantidad de material soluble σ se calcula como:

$$\sigma (\%) = \frac{\text{peso del material seco}}{\text{peso de la solución}} \times 100$$

5.2.2.2 Determinación de propiedades emulsificantes

Se siguió el método de Akasha et al. (2016) con ligeras modificaciones. 750 mg de muestra de suero de mantequilla tratado con ultrasonido se disolvieron en 75 ml de agua destilada. Se añadieron 25 ml de aceite de canola y la mezcla se homogenizó con un ultraturrax a 12800 rpm durante 1 min. Se removieron 50 μ L de la emulsión se removieron del fondo del recipiente y se suspendieron en 5 ml de solución 0.1% (w/v) de SDS, midiéndose la absorbancia a 500 nm a los 0 y 10 min.

El índice de actividad emulsificante (EAI) y el índice de estabilidad de emulsión (ESI) se calcularon a partir de las siguientes fórmulas

$$EAI = \frac{2 \times T \times A_0}{C \times \varphi \times 1000}$$

Donde

A_0 = Absorbancia inmediatamente después de emulsificación (tiempo 0)

C = peso de la proteína por unidad de volumen (g/ml)

Φ = fracción volumétrica de aceite (0.25)

$T = 2.303$

$$ESI = \frac{A_0}{A_0 - A_{10}} \times \Delta t$$

Donde

A_{10} = Absorbancia después de 10 min

$\Delta t = 10$ min

5.2.2.3 Determinación de capacidad de retención de grasa

De acuerdo con Ahmedna et al. (1999), se pesó 1 g de proteína en tubos de centrifuga pre-pesados, y se adicionaron 10 ml de aceite de canola. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 1600 g por 10 min a 25 °C, se removió el sobrenadante y se pesaron los tubos con los sólidos restantes. La capacidad de retención de aceite (FAC) se calculó como:

$$FAC = \frac{W2 - W1}{W0}$$

Donde:

W_0 = peso de la muestra seca (g)

W_1 = peso del tubo + muestra seca (g)

W_2 = peso del tubo + sedimento (g)

5.2.2.4 Viscosidad y pH

La viscosidad de una solución a 10% w/w se determinó mediante el uso de un viscosímetro Brookfield, manteniendo la muestra a 22 °C; la viscosidad relativa de la muestra se determinó al comparar los tiempos de flujo relativo y densidad de la

muestra con aquellos del agua destilada. El pH se determinó a partir de muestra a 25 °C, utilizando un pH-metro previamente calibrado con soluciones amortiguador a pH 4.0, 7.0 y 10.0 (Shanmugam, Chandrapala y Ashukkumar, 2012).

5.2.3 Determinación de modificaciones de estructuras proteicas

5.2.3.1 Electroforesis nativa

Se siguió la metodología de Massum et al. (2020), con algunas modificaciones, para realizar una electroforesis en gel de acrilamida bajo condiciones nativas (*native PAGE*). 100 μ L de muestras diluidas a una concentración de 2 mg de proteína/mL se mezclaron con volúmenes iguales de soluciones amortiguadoras de carga nativas, cargándose alícuotas de 20 μ L por pozo en geles *pre-cast*. Se utilizó el estándar Precision Plus Protein™ Unstained (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, EUA), colocándose alícuotas de 10 μ L en los pozos. Se utilizó un sistema Mini-PROTEAN, por la misma compañía, y el experimento se condujo por una hora a 150 V. El gel se tiñó con una solución de azul Coomassie brillante R-250 (0.1 w/v%) por dos horas, para posteriormente ser desteñida por ~16 horas, con una solución compuesta por 10 % etanol, 10 % ácido acético glacial y 80 % agua.

5.2.3.2 Cuantificación de grupos tioles libres

Se utilizó la técnica de Ellman (Ellman, 1959) para su determinación. A soluciones de 1 g de suero de mantequilla ultrasonificado/L se les adicionó solución amortiguadora estándar pH 8.0 (TRIS 86 mM, glicina 90 mM y EDTA 4 mM). A 2.5 ml de muestra se adicionaron 25 μ L de reactivo Ellman (4 mg DNTB/ml amortiguador estándar), se mezclaron y se dejaron reposar a temperatura ambiente por 30 min para posteriormente leer su absorbancia a 412 nm, usando el amortiguador como blanco. La concentración de grupos tioles libres se cuantificó a partir de una curva estándar de DTT, y se reportaron como μ mol/mL.

5.2.3.4 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier

Las muestras de suero sometido a ultrasonido de alta intensidad se analizaron en un espectrómetro de infrarrojo marca PerkinElmer modelo Spectrum 100 (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA). Para cada muestra se promediaron 100 espectros obtenidos en un lapso de aproximadamente 1 minuto.

5.3 Formulación de helado

El helado base se elaboró a partir de una adaptación de la formulación reportada por Harwood et al. (2013), compuesto por 14.1 % de grasa, 16.7 % de azúcar y 10.5 % de sólidos no grasos de leche (SNGL), para corresponder a una formulación alta en grasa tipo *premium*, con un porcentaje de grasa comparable a otros helados de esta categoría presentes en el mercado mexicano. Se evaluaron tres formulaciones: dos de ellas utilizaron soluciones de suero de mantequilla (15 g disueltos en 50 mL de agua) sonificado (muestra HUS) o control (muestra HBM) como una de las fuentes de MSNF, mientras que el helado control (HC) utilizó leche entera en polvo en vez de suero de mantequilla, a la misma concentración. Los tres tipos de helado fueron adicionados con aislado de proteína de suero como fuente para los SNGL restantes y crema (Crema Alpura® Clásica, 25% de grasa) como fuente de grasa de leche. Las mezclas se homogenizaron con una licuadora doméstica y se maduraron por dos horas a 4 °C. Las mezclas para helado se sometieron a congelamiento dinámico en una máquina para helado de uso doméstico (modelo FRSTICM700, Oster, EUA) de 1 L de capacidad durante 30 min. La elección de equipo se tomó en base a la necesidad de elaborar volúmenes pequeños de helado debido a que la contingencia sanitaria por la pandemia COVID-19 imposibilitó la importación del suero de mantequilla para elaborar las muestras en mayor volumen. Posteriormente, el helado se envasó en contenedores plásticos y se almacenó a -18 °C hasta el momento en que se evaluaron sus parámetros de calidad.

5.3.1 Tasa de derretimiento

Se siguió la metodología de Chen et al. (2019) para cuantificar la tasa de derretimiento. Se colocó una porción de ~25 g de helado se colocó sobre un colador de aberturas de 2 mm², permitiendo que el helado derretido cayera sobre un vaso de precipitado colocado en una balanza para registrar el peso de helado derretido cada 10 min. Se utilizó la siguiente fórmula para conocer el porcentaje de derretimiento en cada punto de tiempo:

$$\% \text{ derretimiento} = \frac{\text{peso helado derretido}}{\text{peso porción}} \times 100$$

Posteriormente, se calculó el cociente entre porcentaje de derretimiento y tiempo, y se considera como tasa de derretimiento al mayor valor obtenido

$$\text{tasa de derretimiento (\%/min)} = \frac{\% \text{ derretimiento}}{\text{tiempo (min)}}$$

5.3.2 Color

Se utilizó un colorímetro CM-600D con iluminante D65 (Konica Minolta, Tokio, Japón) y observador de 10° para conocer el color de la superficie de las muestras de helado, midiendo los parámetros L^* , a^* y b^* . Antes de la prueba, se calibró el equipo con una placa de color blanco estandarizado.

5.3.3 Overrun

El *overrun* se determinó por el método de Szkolnicka et al. (2019), comparando el peso de volúmenes iguales (10 mL) de mezcla de helado y helado, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Overrun (\%)} = \frac{\text{peso de mezcla} - \text{peso de helado}}{\text{peso de helado}} \times 100$$

5.4 Análisis estadístico

Para la parte del desarrollo del ingrediente, que comprende la evaluación de propiedades funcionales y modificaciones de estructura proteica, se utilizó un diseño bifactorial, de dos variables (tiempo y amplitud sónica) a tres niveles. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) para determinar los efectos principales y su interacción sobre las variables respuesta. Los resultados se presentaron como la media de tres réplicas \pm su respectiva desviación estándar. Para la elaboración del helado, se consideró el ingrediente base como el factor a evaluar, con tres niveles (suero control, suero tratado y leche entera), presentando la media de dos medias \pm su respectiva desviación estándar. En todos los casos, las medias de los tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey HSD, considerándose significativas bajo un valor de $P < 0.05$. Se utilizó el paquete estadístico R studio, versión 1.1.463.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis proximales

Los datos de la composición proximal del suero de mantequilla se encuentran en el Cuadro 6. Los valores reportados son comparables a los reportados por otros autores para muestras de suero de mantequilla en polvo

Cuadro 6. Composición proximal de suero de mantequilla en polvo

Componente	%
Proteína	30.5
Lactosa	56.8
Lípidos	5.8
Cenizas	6.9

La composición proximal del suero de mantequilla en polvo utilizado en este estudio es equiparable a lo reportado en otros estudios, con un contenido de proteína, lactosa, lípidos y cenizas característico del suero de mantequilla en polvo (Ali, 2018; Sodini et al., 2006).

6.2 Propiedades funcionales

De forma global, se considera que los cambios en propiedades funcionales de proteínas sometidas a ultrasonido de alta intensidad es resultado de características inherentes a ellas y el tiempo e intensidad del tratamiento (Arzani et al., 2012).

6.2.1 Capacidad de absorción de grasa

La capacidad de absorción de grasa de un ingrediente se explica por la unión de lípidos con los aminoácidos no polares presentes en las cadenas laterales de las proteínas, siendo importante a nivel tecnológico para la retención de sabor y textura, encontrando aplicación en productos cárnicos, de panadería y postres (Susheelamma y Rao, 1974; Ma, 2015; Aryee, Agyei y Udenigwe, 2018). Esta

propiedad es una medida de la cantidad de aceite absorbida por peso de polvo o proteína.

El análisis de varianza de dos factores se encuentra en la Figura 9. En general, se muestra una tendencia a la disminución de esta propiedad funcional a medida que aumenta el tiempo de tratamiento, aunque el tratamiento con 40% de amplitud sónica mostró un repunte en la capacidad de absorción de grasa al máximo tiempo de tratamiento. Se podría concluir, entonces, que el tiempo es el factor con la mayor influencia en la capacidad de absorción de grasa. Los resultados se presentan en el Cuadro 7. Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($p = 2.28e-11$), mostrando un incremento de la capacidad de retención de aceite debido al tratamiento ultrasónico, destacando aquellas capacidades de retención de aceite obtenidas con 5 minutos de tratamiento al 20% y 40% de amplitud sónica.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
ampli	1	0.405	0.405	3.738	0.0656 .
tiempo	1	3.855	3.855	35.583	4.41e-06 ***
ampli:tiempo	1	0.452	0.452	4.176	0.0526 .
Residuals	23	2.492	0.108		

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

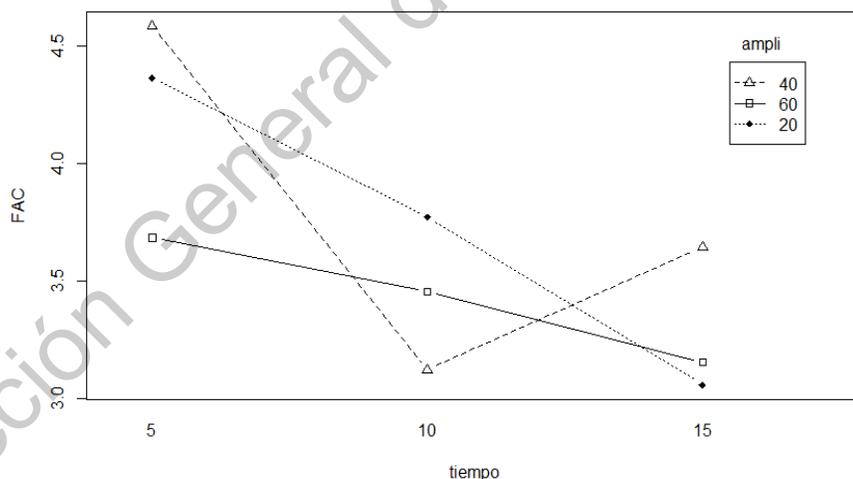


Figura 9. Gráfico de interacción amplitud/tiempo para capacidad de absorción de grasa en muestras de suero de mantequilla en polvo sometido a ultrasonido de alta intensidad. Ampli: amplitud sónica; FAC: capacidad de absorción de grasa

Cuadro 7. Capacidad de absorción de grasa en muestras de suero de mantequilla sonicado

Amplitud sónica (%)	Tiempo de tratamiento (min)	Capacidad de absorción de grasa (g aceite/g polvo)
Control		3.06 ^a ± 0.13
20	5	4.36 ^d ± 0.14
	10	3.77 ^c ± 0.06
	15	3.06 ^a ± 0.05
40	5	4.58 ^d ± 0.26
	10	3.12 ^{ab} ± 0.05
	15	3.64 ^c ± 0.10
60	5	3.68 ^c ± 0.09
	10	3.45 ^{bc} ± 0.02
	15	3.15 ^{ab} ± 0.14

^{a,b,c,d} Diferentes letras en sentido vertical indican diferencias significativas según Tukey ($p < 0.05$)

¹ Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (n=3)

La capacidad de absorción de grasa del control es equiparable a la reportada por Wong y Kitts (2003); la diferencia entre el valor reportado en este trabajo para el suero control con el reportado por los autores mencionados (1.17 g de aceite/g de polvo) puede deberse a diferencias en el proceso de elaboración del polvo de suero de mantequilla, teniendo esto un impacto en la estructura de las proteínas presentes y, por consiguiente, afectando la capacidad de los aminoácidos no polares de ligarse al aceite.

Las mayores capacidades de absorción de grasa reportadas en este estudio superan las encontradas en la literatura, tanto para proteínas lácteas como otras de origen animal y vegetal. Ahmedna et al. (1999) reportan una capacidad de absorción de grasa de 2.5 g/g de proteína para leche en polvo desgrasada, ~1.6 g/g en clara de huevo en polvo y ~1.8 en aislado de proteína de soya. Wong y Kitts (2003) reportan para estos mismos ingredientes unas capacidades de absorción de grasa

de 3.03, 1.68 y 2.54 g/g, respectivamente. Estos autores atribuyen la diferencia en absorción de grasa entre muestras al contenido de grasa inicial, explicando por qué la leche en polvo desgrasada absorbe más grasa que el aislado de proteína de soya: a menor contenido de grasa en un ingrediente de composición mixta, existe un mayor potencial por parte de las proteínas presentes a ligar la grasa en el medio. La otra explicación discutida en el artículo citado es una mayor concentración de grupos sulfhidrilo, que indican la desnaturalización de una molécula proteica con regiones hidrofóbicas que interactúan con la grasa. Considerando que el suero de mantequilla contiene una relación lípidos/proteína baja, es posible que las proteínas presentes (modificadas estructuralmente por acción del ultrasonido) tengan los suficientes grupos hidrofóbicos expuestos para ligar aceite sin presentarse una interferencia por los lípidos ya presentes en la matriz.

6.1.2 Solubilidad

La solubilidad describe la habilidad de un soluto para disolverse en un solvente (Aryee, Agyei y Udenigwe, 2018), es una propiedad crítica para la funcionalidad de las proteínas y tecnológicamente importante para polvos lácteos por permitir un mayor potencial de aplicaciones industriales, ligada directamente a fenómenos de desnaturalización y agregación proteica (Yanjun et al., 2014; Khatkar et al., 2018). Incluir al menos un punto y coma o punto y seguido

Al realizar anova de dos factores, se pudo observar la influencia de la amplitud sónica ($p = 0.0122$), tiempo ($p = 0.5295$) y la interacción de ambos factores ($p = 0.8867$) (Figura 10). Los resultados de la determinación de solubilidad se presentan en el Cuadro 8, demostrando diferencias estadísticas significativas ($p = 0.0015$) entre los tratamientos. El tratamiento a 20% de amplitud sónica, 10 min fue el que presentó la mayor disminución de solubilidad. Pese a que hay significancia estadística para 3 muestras, se considera que esto no representa una diferencia a nivel práctico o para aplicaciones tecnológicas puesto que hay una diferencia de 5% entre los límites inferior y superior de los resultados presentados, además de reportar una solubilidad por encima del 80% en todas las muestras.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
ampli	1	14.58	14.580	7.407	0.0122 *
tiempo	1	0.80	0.802	0.408	0.5295
ampli:tiempo	1	0.04	0.041	0.021	0.8867
Residuals	23	45.27	1.968		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

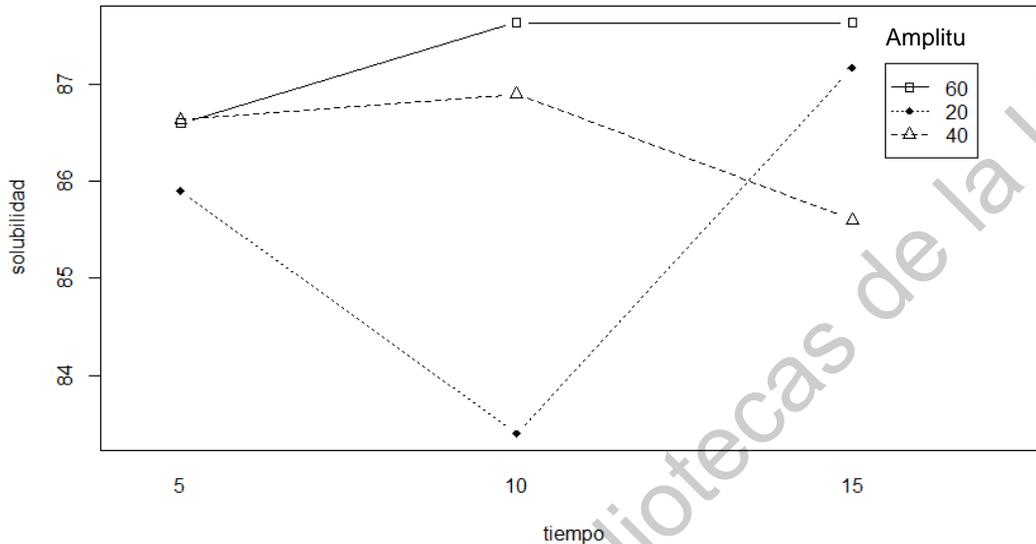


Figura 10. Gráfico de interacción amplitud/tiempo para valores de solubilidad en suero de mantequilla en polvo sometido a ultrasonido de alta intensidad. Ampli: amplitud sónica

Hay literatura disponible que expone alteraciones en la solubilidad de polvos lácteos tratados con ultrasonido de alta intensidad, demostrando tanto reducción como aumento de esta propiedad, en un mismo estudio con distintas muestras. El tratamiento de concentrado de proteína de leche a 300 W (50 % de amplitud sónica) por 5 min aumentó significativamente la solubilidad de 35.78 a 88.30 %, cambio atribuido a modificaciones en la estructura globular de las proteínas lácteas, incrementando el número de grupos cargados (NH_4^+ , COO^-) que aumentan las interacciones proteína-agua (Yanjun et al., 2012). Por el otro lado, Jambrak et al. (2008) reportaron un incremento significativo de la solubilidad en muestras de aislado de proteína de suero e hidrolizado de proteína de sueros sometidos a frecuencias de 20 y 40 kHz por 15 min, por el contrario, se observó una disminución en esta propiedad funcional al aplicar el mismo tratamiento en muestras de concentrado de proteína de suero.

Cuadro 8. Solubilidad en muestras de suero de mantequilla sonicado

Amplitud sónica (%)	Tiempo de tratamiento (min)	Solubilidad (%)
Control		87.2 ± 0.5 ^b
20	5	85.9 ± 0.9 ^{ab}
	10	83.4 ± 0.5 ^a
	15	87.2 ± 0.5 ^b
40	5	86.6 ± 1.0 ^b
	10	86.9 ± 1.0 ^b
	15	85.6 ± 2.2 ^{ab}
60	5	86.6 ± 0.1 ^b
	10	87.6 ± 1.2 ^b
	15	87.6 ± 0.1 ^b

a,b,c,d Diferentes letras en sentido vertical indican diferencias significativas según Tukey ($p < 0.05$)

¹ Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (n=3)

Se conoce que compuestos como los mono- y disacáridos estabilizan las estructuras proteicas sometidas a desnaturalización por calor o congelamiento. Existe literatura que reporta la baroprotección por parte de la sacarosa en soluciones de β -lactoglobulina, atribuible a posibles efectos en la interfaz proteína-agua o a través de un mecanismo de exclusión diferencial, en vez de inducir un cambio conformacional (Dumay, Kalichevsky y Cheftel, 1994). Al excluir la sacarosa del dominio de la proteína en solución se incrementa la energía libre del sistema, siendo la estructura desdoblada aún menos termodinámicamente favorable, manteniendo así una estructura tridimensional estable (Lee y Timasheff, 1984). Esto explicaría por qué alcoholes polihídricos y azúcares estabilizan moléculas macrobiológicas en solución. Debido a este mecanismo, se considera que el alto contenido de lactosa, con relación a otros polvos lácteos, es responsable de la disminución no significativa de la solubilidad en concentrado de proteína de suero sometido a ultrasonido de alta intensidad (Jambrak et al., 2008), siendo esta conclusión extrapolable al suero de mantequilla.

Por otra parte, es importante señalar la posible formación de agregados y su efecto en la solubilidad del suero de mantequilla. Arzeni et al. (2012) muestran una disminución en la solubilidad de proteína de clara de huevo tratada con ultrasonido de alta intensidad (20 kHz, 20 min), causada por la formación de agregados proteicos. No se observaron diferencias significativas en la solubilidad de caseinato de sodio reconstituido sometido a sonicación; sin embargo, la solubilidad de todas las muestras se mantuvo arriba del 96% por la ausencia de agregados insolubles grandes. Se remarca que la ausencia de significancia estadística, y que contrasta con lo reportado por otros estudios, se debe a la ausencia de agregados insolubles presentes por acción del tratamiento ultrasónico (Lo et al., 2019).

6.1.3 Actividad emulsificante

La actividad emulsificante es la habilidad de una proteína para participar en la formación y estabilización de emulsiones, siendo una propiedad funcional primordial en diversos sistemas alimenticios como los productos cárnicos y lácteos (Zayas, 1997).

El suero de mantequilla es conocido por sus capacidades emulsificantes atribuidas a sus distintos componentes, incluidas las proteínas y fosfolípidos de la membrana de glóbulo graso (Sodini et al., 2006). Se conoce que el ultrasonido de alta intensidad puede cambiar la estructura de las proteínas, exponiendo así los grupos hidrofóbicos presentes en el interior de las estructuras globulares (Shanmugan et al., 2012), por lo que se procedió a evaluar índices relacionados a la actividad emulsificante del ingrediente funcional.

El índice de estabilidad de emulsión (ESI) es la estimación de la capacidad de una proteína o ingrediente para permanecer en la interfaz agua-aceite después del almacenamiento o calentamiento de la emulsión, la habilidad de una emulsión para resistir cambios en su estructura a través de un periodo de tiempo definido (Mohanty et al., 1988; Indu, Thangavel & Amirtham, 2019). Este parámetro no presentó

diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0.361$) (Cuadro 9). Al hacer un anova de dos factores, no se presentan efectos por la amplitud ($p = 0.376$), el tiempo ($p = 0.874$) o la interacción de ambos factores ($p = 0.936$) (Figura 11). Se observa que el ultrasonido de alta intensidad causa una disminución del ESI en los tres niveles de amplitud sónica de los 5 a los 10 minutos de tratamiento; cuando el tiempo se incrementa a 15 minutos, el ESI aumenta de forma más pronunciada para el tratamiento a 40% de amplitud sónica, mientras que los otros niveles de amplitud sónica muestran diferencias menos marcadas.

En contraste, el índice de actividad emulsificante (EAI), que se define en base al área de interfaz agua-aceite estabilizada por unidad de peso de proteína (Zayas, 1997), presentó diferencias significativas ($p = 0.0001$) (Cuadro 9). para el índice de actividad emulsificante (EAI) en función del tratamiento de ultrasonido aplicado. El análisis de varianza de dos factores se presenta en la Figura 11. Se observa que, para todos los tres niveles de amplitud sónica, el EAI disminuye cuando el tiempo de tratamiento aumenta de 5 a 10 min, e incrementa al aplicar un tratamiento de 15 minutos, siendo más notable en las muestras correspondientes a 20% amplitud sónica.

Para los 3 niveles de amplitud sónica se tienen los mayores valores de EAI en el menor tiempo de tratamiento, encontrando los menores índices a los 10 min, presentando un leve incremento en el EAI a los 15 minutos, manteniéndose menores a los valores obtenidos a los 5 minutos de sonicación no se entiende. Para todos los tratamientos (excepto el 40%, 5 minutos), el EAI obtenido es menor al tratamiento control, llegando a la conclusión de que el ultrasonido de alta intensidad disminuye la actividad emulsificante en polvo de suero de mantequilla.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
ampli	1	2.57	2.5689	0.814	0.376
tiempo	1	0.12	0.1250	0.040	0.844
ampli:tiempo	1	0.02	0.0208	0.007	0.936
Residuals	23	72.59	3.1562		

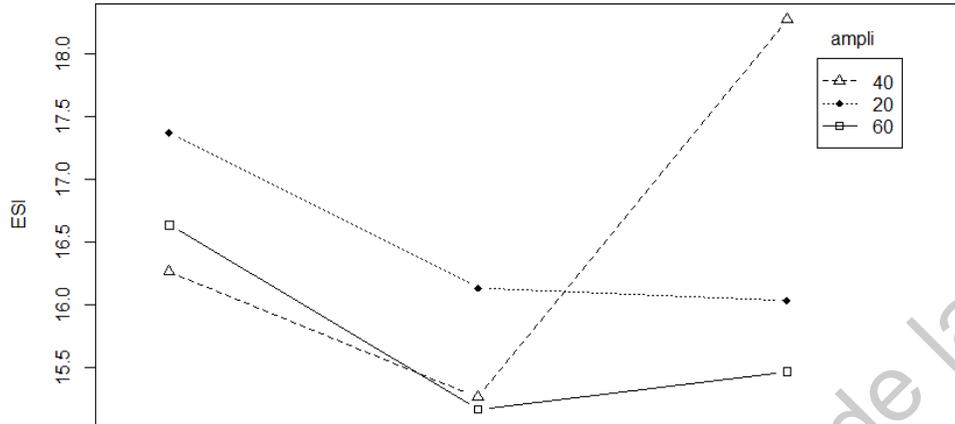


Figura 11. Gráfico de interacción amplitud/tiempo para valores de índice de estabilidad emulsificante (ESI) en suero de mantequilla en polvo sometido a ultrasonido de alta intensidad. Ampli: amplitud sónica

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
ampli	1	0.587	0.5868	1.122	0.301
tiempo	1	0.907	0.9068	1.733	0.201
ampli:tiempo	1	0.022	0.0217	0.041	0.840
Residuals	23	12.033	0.5232		

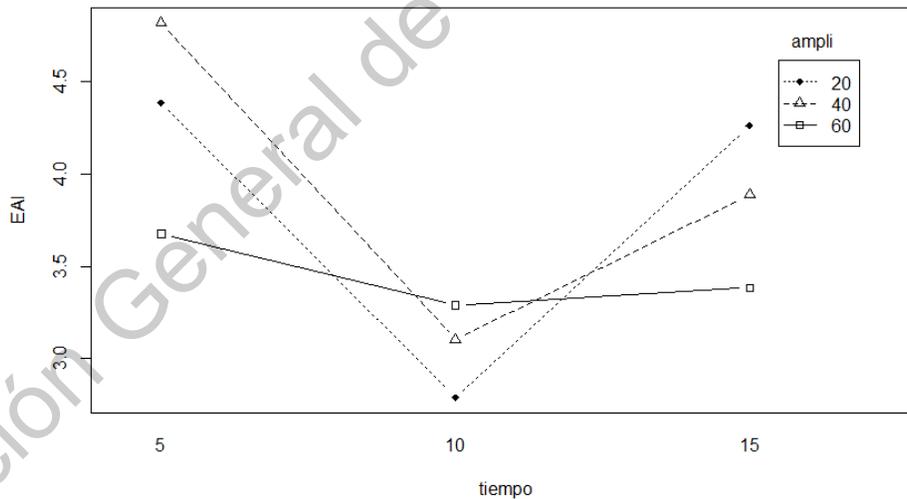


Figura 12. Gráfico de interacción amplitud/tiempo para valores de índice de actividad emulsificante (EAI) en suero de mantequilla en polvo sometido a ultrasonido de alta intensidad. Ampli: amplitud sónica

Cuadro 9. Actividad emulsificante de suero de mantequilla sonicado

Amplitud sónica (%)	Tiempo de tratamiento (min)	EAI (m ² /g)	ESI (min)
Control		4.54 ± 0.2 ^{abcd}	17.3 ± 1.0 ^a
20	5	4.38 ± 0.2 ^{cd}	17.4 ± 2.5 ^a
	10	2.79 ± 0.1 ^a	16.1 ± 1.6 ^a
	15	4.26 ± 0.4 ^{bcd}	16.0 ± 0.3 ^a
40	5	4.82 ± 0.7 ^d	16.3 ± 0.5 ^a
	10	3.10 ± 0.5 ^{ab}	15.3 ± 0.8 ^a
	15	3.89 ± 0.2 ^{abcd}	18.3 ± 3.6 ^a
60	5	3.68 ± 0.6 ^{abcd}	16.6 ± 1.3 ^a
	10	3.29 ± 0.2 ^{abc}	15.2 ± 0.8 ^a
	15	3.38 ± 0.4 ^{abc}	15.5 ± 0.7 ^a

^{a,b,c,d} Diferentes letras en sentido vertical indican diferencias significativas según Tukey ($p < 0.05$)

¹ Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (n=3)

En un estudio con concentrado de caseína micelar, Zhang et al. (2018) reportan un incremento en el EAI con hasta 2 min de tratamiento con una sonda de 20 kHz, no hay un incremento significativo del EAI a tiempos mayores. También se ha reportado un aumento estadísticamente significativo del índice de actividad emulsificante en concentrado de proteína de leche tratado a 50 % de amplitud sónica (600 W al 100% de amplitud) por hasta 2 min (Yanjun et al., 2014). En contraste, Jambrak et al. (2011) reporta disminuciones significativas en el EAI y ESI en muestras de aislado y concentrado de proteína de suero, señalando que la disrupción podría ser la consecuencia de una falta de compuestos con actividad de superficie que sean capaces de formar emulsiones, además de una agregación parcial de las gotas de aceite, ya que las condiciones turbulentas durante el tratamiento con ultrasonido promueven la agregación proteica. De acuerdo con Zhang et al. (2018), se considera que hay una correlación positiva entre emulsificación, solubilidad e hidrofobicidad de superficie, ya que el aumento de hidrofobicidad puede hacer que la proteína tenga un mejor potencial de adsorción en la interfaz de las gotas de aceite y, con la mejora de la solubilidad, la proteína se difunde más rápidamente.

En este estudio se observaron diferencias estadísticas significativas en la solubilidad de los polvos tratados por ultrasonido y una disminución de esta propiedad en relación con el control, similar a lo observado en el índice de actividad emulsificante, y al determinar la hidrofobicidad de superficie en el ingrediente tratado con ultrasonido de alta intensidad, es posible que se presente el mismo comportamiento de diferencias estadísticas y disminución del valor comparado al control. Si la lactosa, el mayor componente del suero de mantequilla, presenta efectos baroprotectores que dificultan el desdoblamiento de las proteínas e impide cambios importantes en la solubilidad de estas, es lógico ligar este efecto a la disminución del EAI.

Otra posible explicación, que también podría relacionarse con los datos obtenidos, sería la formación de agregados proteicos, ya que se ha observado que los agregados suelen mostrar actividad emulsificante más pobre que proteínas no agregadas debido a su mayor estabilidad conformacional, que impide su desdoblamiento y dispersión rápida para estabilizar las gotas de aceites, lo que lleva a gotas más grandes y un EAI más bajo (Akasha et al., 2016).

Con relación al ESI, un aumento en este valor se correlaciona con una disminución en el tamaño de partícula de la emulsión (Liu et al., 2020). De acuerdo con Indu et al. (2019), el ESI depende principalmente en la solubilidad de proteína e hidrofobicidad de superficie, y su valor en muestras de leche de coco aumentó a medida que se incrementó el tiempo de sonicación, ya que la desnaturalización de la proteína durante la sonicación pudo haber la actividad de superficie y la adsorción de la interfaz aceite-agua, explicando así el aumento en los valores de ESI. En este estudio no se encontraron diferencias significativas en el ESI y, considerando lo anteriormente mencionado, esto se podría correlacionar con la posible formación de agregados indicada por las otras propiedades funcionales evaluadas. Sui et al. (2017) reportaron una disminución del EAI y ESI en emulsiones estabilizadas con aislado de proteína de soya y lecitina a medida que se aumentaba la potencia del tratamiento sónico (de 300 a 450 W), atribuible a la posible formación de agregados

insolubles; Al considerar, además, que el EAI disminuye junto a la solubilidad (Kaushik et al., 2017), se puede concluir que la ausencia de cambios significativos en el índice de estabilidad de emulsión apuntaría a la formación de agregados proteicos.

6.1.4 Viscosidad

El análisis de varianza de dos vías se encuentra en la Figura 13. Los resultados de la determinación de viscosidad se encuentran en el Cuadro 10. Para los tratamientos a 20 y 60% de amplitud sónica, se observa un pico en los valores de viscosidad obtenidos a los 10 min, para sufrir un descenso marcado a los 15 min de tratamiento. En contraste, las muestras tratadas a 40% de amplitud sónica muestran el comportamiento opuesto, con una disminución de viscosidad a los 10 min de tratamiento en comparación a 5 min, incrementando cuando se aplica ultrasonido de alta intensidad durante 15 min.

Se encontró una diferencia significativa ($p = 0.00758$) en los valores de viscosidad reportados. La mayor viscosidad se obtuvo en las muestras sometidas al tratamiento 20 % de amplitud sónica a 10 min.

Jambrak et al. (2011) reportaron que la solubilidad y fluidez de soluciones de aislado de proteína de suero disminuyen como resultado de la sonicación. De acuerdo con Shen et al. (2017), la disminución de la viscosidad en muestras de agregados solubles de WPI se puede atribuir a una reducción en el tamaño de partícula, por lo que el aumento de la viscosidad observado en este estudio indicaría la formación de agregados proteicos, observación que concuerda con lo reportado en la literatura. Un aumento en la viscosidad de sistemas tratados con ultrasonido apunta a la formación de agregados proteicos (Jambrak et al., 2011; Lo et al., 2019).

Cuadro 10. Resultados de viscosidad en suero de mantequilla sonicado

Amplitud sónica (%)	Tiempo de tratamiento (min)	Viscosidad (cP)
Control		1.82 ± 0.02 ^a
20	5	1.87 ± 0.01 ^{ab}
	10	1.88 ± 0.03 ^b
	15	1.84 ± 0.02 ^{ab}
40	5	1.86 ± 0.01 ^{ab}
	10	1.82 ± 0.01 ^a
	15	1.84 ± 0.01 ^{ab}
60	5	1.84 ± 0.02 ^{ab}
	10	1.86 ± 0.01 ^{ab}
	15	1.83 ± 0.02 ^{ab}

a,b,c,d Diferentes letras en sentido vertical indican diferencias significativas según Tukey (p<0.05)

¹ Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (n=3)

```

ampli      DF   Sum Sq   Mean Sq   F value   Pr(>F)
tiempo     1   0.001422  0.0014222  2.977  0.0978 .
ampli:tiempo 1   0.000408  0.0004083  0.855  0.3648
Residuals 23   0.010986  0.0004777
---
signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
    
```

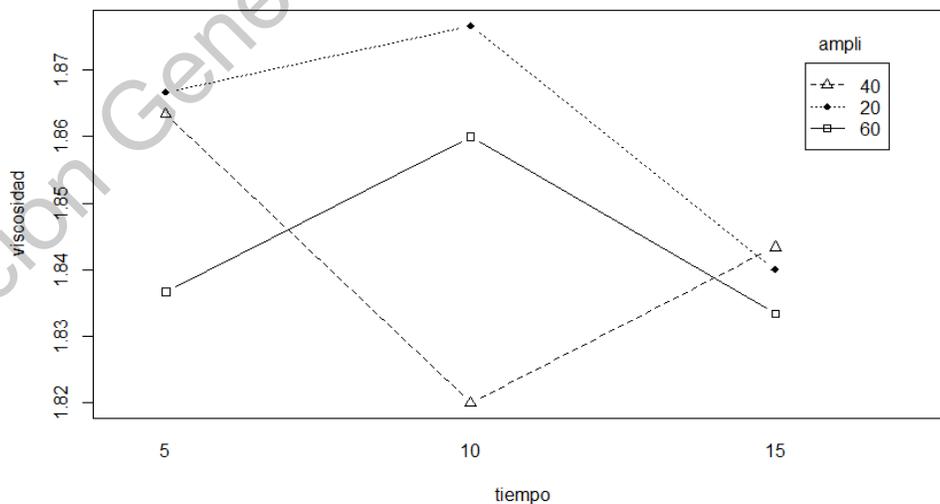


Figura 13. Gráfico de interacción amplitud/tiempo para valores de viscosidad en suero de mantequilla en polvo sometido a ultrasonido de alta intensidad. Ampli: amplitud sónica

6.2 Modificaciones de estructura proteica

6.2.1 Grupos sulfhidrilos libres

La funcionalidad física de los polvos lácteos se encuentra influenciada por la presencia y disponibilidad de segmentos hidrofóbicos, grupos tioles libres y cargas de superficie relacionadas; pequeños cambios en estas propiedades pueden llevar al desdoblamiento y posterior agregación de las proteínas (Nishanti et al., 2017).

Los residuos de cisteína generalmente confieren rigidez a las proteínas, y éstos pueden estar involucrados en la formación de enlaces disulfuro intra- e intermoleculares o pueden existir como tioles libres. Durante procesos de doblamiento estructural de las proteínas, la formación de enlaces disulfuros intramoleculares no nativos puede causar un doblamiento incorrecto, lo que puede conducir a su agregación y precipitación (Trivedi, Laurence & Siahhan, 2009).

En general, estudios que evalúan la influencia del ultrasonido de alta intensidad en el contenido de grupos sulfhidrilo en muestras de proteína de suero han reportado resultados contradictorios, ya sea la falta de cambios significativos en comparación al control o una disminución de tioles reactivos después de periodos de sonicación prolongados, además de la influencia de las condiciones del estudio como la composición proteica y pH (Frydenberg et al., 2016). Los resultados de este estudio se presentan en el Cuadro 11; dependiendo de los niveles de amplitud sónica y tiempo del tratamiento, se observaron tanto disminución como aumento del contenido de tioles reactivos en comparación al control.

En la Figura 14 se muestra el gráfico de interacción entre las dos variables del estudio, comparando su influencia en la variable respuesta mediante un anova de dos factores. En general, para los tres niveles de amplitud sónica, se observa una tendencia de disminución de grupos sulfhidril libres a medida que aumenta el tiempo de tratamiento, siendo esta tendencia menos marcada para el suero de mantequilla tratado con 40% amplitud sónica.

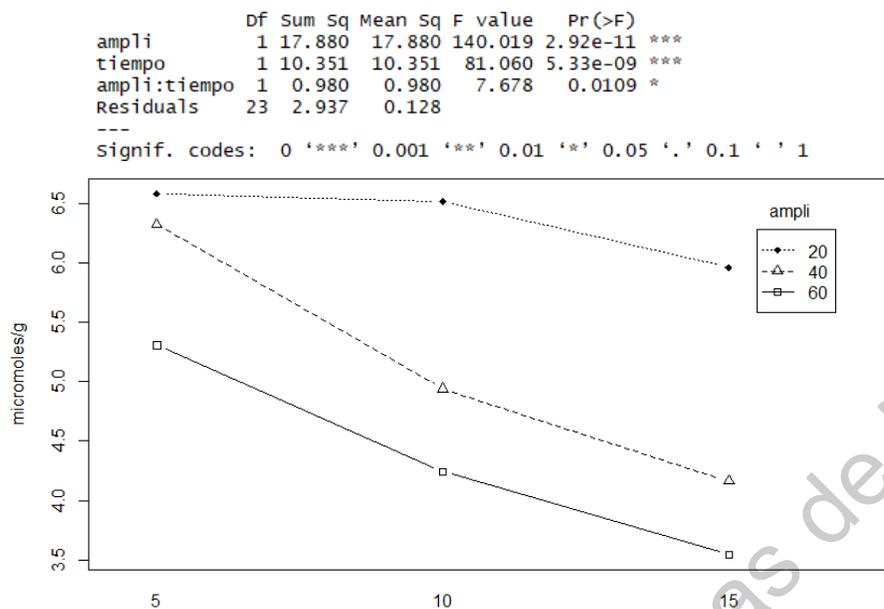


Figura 14. Gráfico de interacción amplitud/tiempo para valores de grupos sulfhidrilos libres en suero de mantequilla en polvo sometido a ultrasonido de alta intensidad. Ampli: amplitud sónica; micromoles/g: concentración de grupos sulfhidrilos libres ($\mu\text{mol/g}$)

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 2.33e^{-5}$) en el contenido de grupos sulfhidril libres presentes en muestras de suero de mantequilla tratadas con ultrasonido. El tratamiento que incrementó en mayor número la concentración de grupos sulfhidril libres en comparación al control fue el tratamiento 20 % amplitud sónica por 5 min, con un aumento del 33.94 %, mientras que la mayor disminución se presentó para el tratamiento 60 % y 15 min, con una disminución del 28.05 %. La concentración de grupos tioles libres reportada en este trabajo se encuentra en los intervalos presentes en la literatura para otras muestras de polvos lácteos, tanto en tratamientos control como aquellos sometidos por ultrasonido o procesos térmicos (Saffon et al., 2014; Shi et al., 2020).

De acuerdo con Shi et al. (2020), el aumento en la concentración de grupos sulfhidrilos se debe a una estructura espacial desdoblada de las proteínas lácteas inducida por cavitación, exponiendo aquellos grupos que se encuentran en la parte interna de la estructura globular; mientras que, la reducción en la concentración representaría una formación de agregados proteicos mediada por puentes disulfuro

intermoleculares, aunque interacciones no-covalentes pueden limitar el acceso del ácido 5-5'- ditiobis-2-nitrobenzoico (DNTB) a los grupos sulfhidrilos libres (Nishanti et al., 2017; Leeb, Haller & Kulozik, 2018).

Cuadro 11. Concentración de grupos tioles libres en suero de mantequilla sonicado

Amplitud sónica (%)	Tiempo de tratamiento (min)	H ₀ (μmol/g)
Control		4.92 ± 0.2bcd
20	5	6.59 ± 0.2f
	10	6.52 ± 0.3f
	15	5.96 ± 0.5ef
40	5	6.32 ± 0.2f
	10	4.94 ± 0.2cd
	15	4.16 ± 0.2ab
60	5	5.30 ± 0.3de
	10	4.24 ± 0.3abc
	15	3.54 ± 0.1a

^{a,b,c,d} Diferentes letras en sentido vertical indican diferencias significativas según Tukey (p<0.05)

¹ Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (n=3)

Considerando la presencia de agregados proteicos en muestras donde la concentración de tioles libres aumentó, es posible que se vea una formación de agregados mediados por interacciones no covalentes, como interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals, sobre todo al considerar la presencia de proteínas de suero en conformaciones no nativa, fragmentos de MFGM y la posible presencia de agregados proteicos pequeños (formados durante el procesamiento del suero de mantequilla) que pudieran haber servido como núcleos de agregación (Saffon et al., 2014).

6.2.2. Electroforesis nativa

La electroforesis nativa en gel de poliacrilamida (native PAGE) permite la separación de proteínas basada en su masa molecular y su carga (Leeb et al., 2018). Al realizar la electroforesis bajo estas condiciones se observó que material de alto peso molecular permaneció en la parte superior del gel. Este comportamiento también fue observado por Masum et al. (2020), debido a la presencia de agregados proteicos. En la Figura 8 se observan algunas bandas de mayor intensidad en los tratamientos F al I, que comprenden el tratamiento 40 % de amplitud sónica por 5 m y los tratamientos con 20 % de amplitud en los tres niveles de tiempo. Como era de esperarse, el control no posee la misma intensidad de bandas de alto peso molecular, pero se observa que el suero de mantequilla presentó cierto grado de agregación, posiblemente proveniente de las condiciones de procesamiento. Estos resultados se pueden ligar con los cambios que estos tratamientos presentaron en algunas propiedades funcionales evaluadas, además de los cambios en la concentración de grupos sulfhidrilos libres.

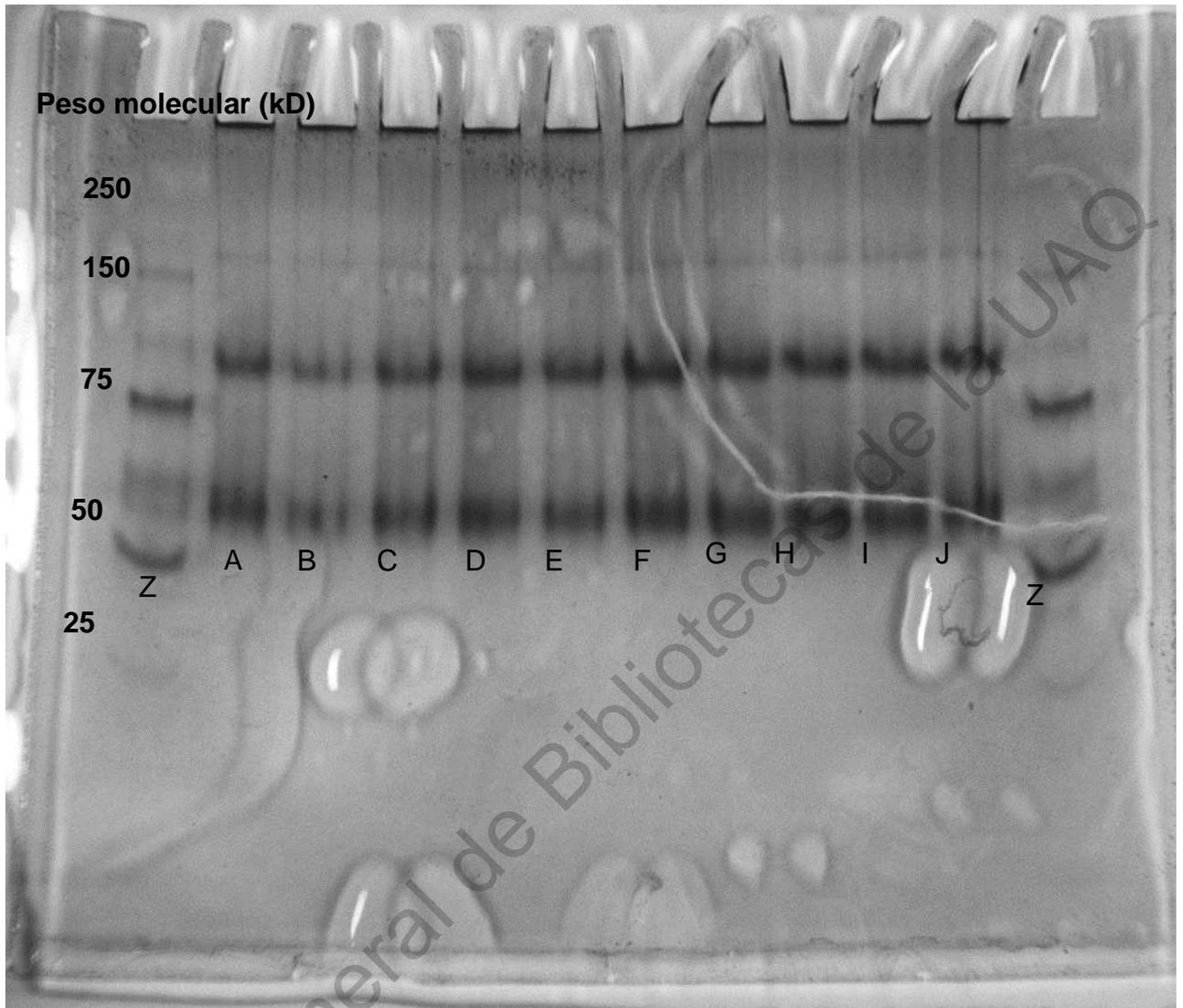


Figura 15. Electroforesis nativa en gel de poliacrilamida (nativa PAGE).

Leyendas: A: tratamiento 60 % de amplitud sónica por 15 minutos (60/15), B: 60/10, C: 60/5, D: 40/15, E: 40/10, F: 40/5, G: 20/15, H: 20/10, I: 20/5, J: Control, Z: Estándares de peso molecular

De acuerdo con Saffon et al. (2014), un aumento en la concentración de grupos sulfhidrilos con una presencia de agregados proteicos indicaría que éstos se encuentran regidos, principalmente, por intercambios SH/SS, además de interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals, producto de la desnaturalización y posterior interacción entre proteínas de la MFGM y proteínas de suero presentes, principalmente la β -lactoglobulina.

6.2.3 Espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier

(FTIR)

El análisis del espectro obtenido por FTIR se realizó en la región amida I (1600-1700 cm^{-1}), relacionada a las vibraciones del estiramiento C=O (Nishanti et al., 2017), se muestran en las Figuras 9 a 11 mover las figuras. De acuerdo con estos autores, la presencia de picos en $\sim 1637^{-1}$ y $\sim 1654^{-1}$ indican la presencia de hojas β y hélices α de qué?, respectivamente, y una disminución en el tamaño de los picos en estas regiones indica una pérdida de la estructura de qué?. Picos en 1648^{-1} corresponden a enrollamientos aleatorios (*random coils*), la región $1683-1685^{-1}$ indica una agregación intermolecular conducida por hojas β y entrecruzamientos en la región $1618-1620^{-1}$. Los picos en 1660^{-1} representan giros y la región $1667-1681^{-1}$ indica la presencia de giros β (Ho et al., 2019). Estos resultados, al conjuntarse con los obtenidos de la electroforesis nativa y concentración de grupos sulfhidrilos libres, confirma la presencia de agregados proteicos en las muestras de suero de mantequilla tratado con ultrasonido de alta intensidad, destacando las muestras tratadas con 20 % de amplitud sónica, presentando las mayores concentraciones de grupos sulfhidrilos libres presentan los mayores picos en la región 1618^{-1} . El perfil del suero de mantequilla control es parecido al del suero de leche salado (*salty whey*) y suero de leche ácido (*acid whey*), presentando picos no tan pronunciados en la región 1655^{-1} y 1685^{-1} (Nishanti et al., 2017). De acuerdo con Nikolova et al. (2014), las bandas en localizadas en 1614^{-1} , 1634^{-1} , 1648^{-1} y 1677^{-1} corresponden a desnaturalización de proteínas y aquellas en 1617^{-1} y 1682^{-1} indicarían agregación proteica, por lo que se esperarían alteraciones en estas bandas en muestras proteicas sometidas a tratamientos como altas temperaturas. Al observar los espectros obtenidos en la región $\sim 1685^{-1}$, los tratamientos de ultrasonido forman agregados en los tres niveles de tiempo a 20 % de amplitud sónica (Figura 9), se sigue observando en las muestras tratadas con 40 % de amplitud sónica durante 5 y 10 min pero en el tratamiento a 15 min se observa una pérdida de este pico (Figura 10), volviendo a aparecer a medida que se incrementa el tiempo en los tratamientos

a 60 % de amplitud (Figura 11) mover las figuras. Esto podría indicarnos que, si bien a amplitudes sónicas y tiempos de tratamientos menores se promueve la formación de agregados, al incrementar las magnitudes de los niveles de estas variables se llega a un punto en que promueve la desagregación de estas estructuras, para eventualmente volver a formarse al seguir incrementando la amplitud y/o tiempo de tratamiento.

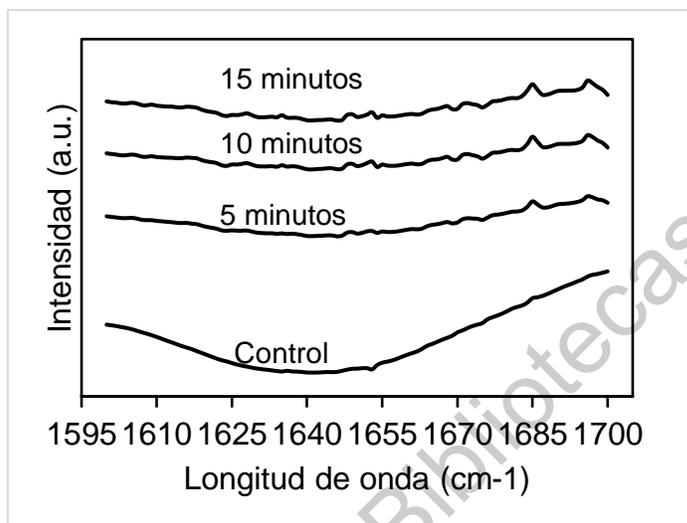


Figura 16. Espectro de la región amida I ($1600-1700^{-1}$) para muestras de suero de mantequilla tratadas con 20% de amplitud sónica, a 3 niveles de tiempo.

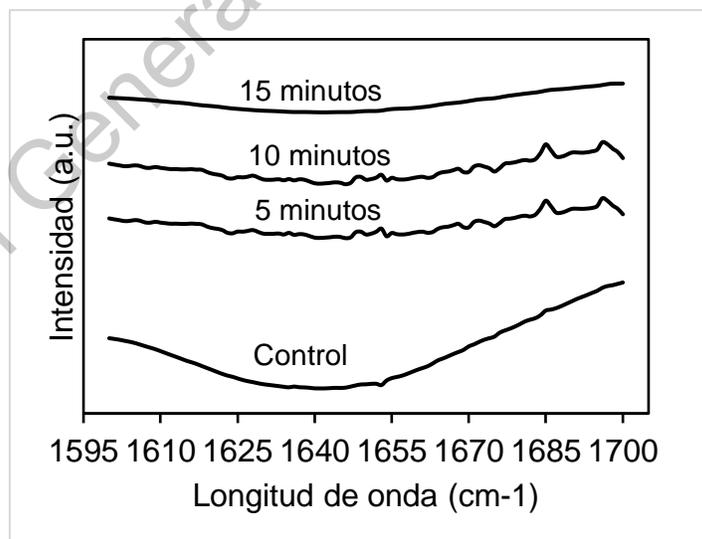


Figura 17. Espectro de la región amida I ($1600-1700^{-1}$) para muestras de suero de mantequilla tratadas con 40% de amplitud sónica, a 3 niveles de tiempo.

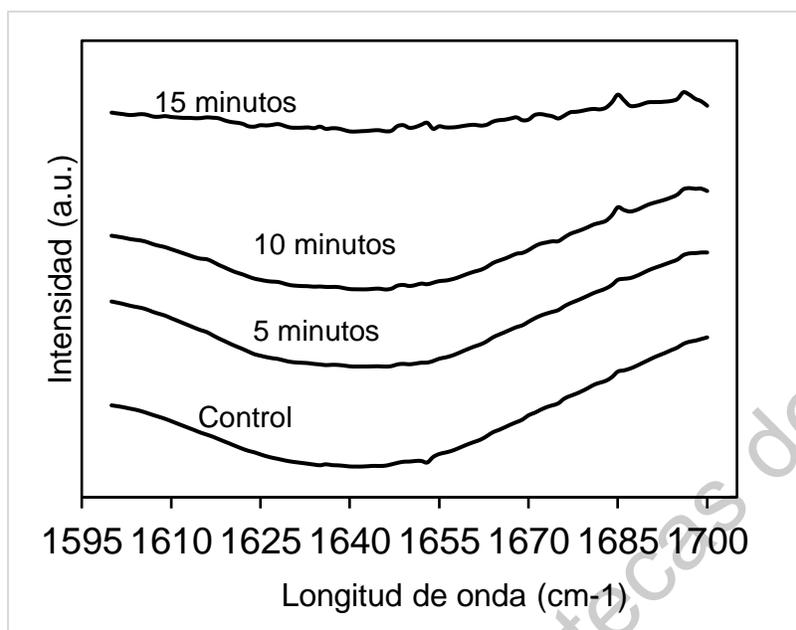


Figura 18. Espectro de la región amida I ($1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) para muestras de suero de mantequilla tratadas con 60% de amplitud sónica, a 3 niveles de tiempo.

6.3 Elaboración de helado

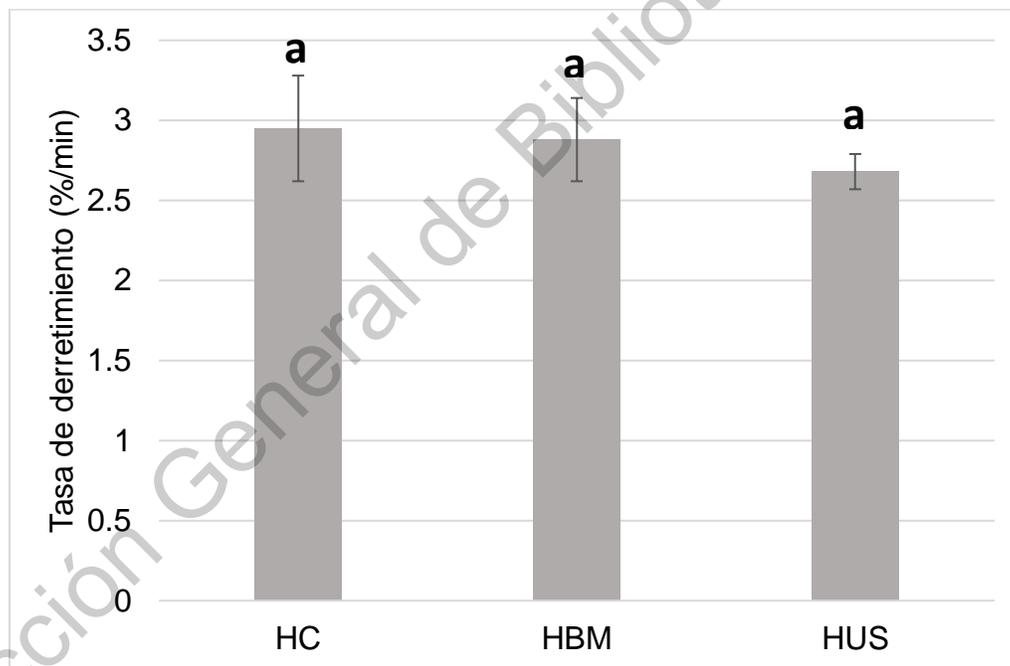
Por sus resultados de capacidad de absorción de grasa y concentración de grupos sulfhidrilos libres se eligió el tratamiento 20% y 5 min para incorporarse en la formulación de un helado tipo *premium*. Adicionalmente al helado elaborado con suero de mantequilla tratado con ultrasonido (HUS) y el helado con suero de mantequilla control (HBM), se elaboró una formulación de helado control (HC), reemplazando el contenido de suero de mantequilla con leche entera en polvo.

6.3.1 Tasa de derretimiento

De acuerdo con Clarke (2012), la tasa de derretimiento no es un parámetro físico definido, sino que es una medida empírica que refleja distintos factores como conductividad térmica, capacidad calorífica, microestructura y formulación, siendo usualmente cuantificado para indicar los efectos de un cambio en formulación o condiciones de proceso.

Los resultados de la determinación de la tasa de derretimiento para las 3 muestras de helado se presentan en la Figura 12. No se encontró diferencia significativa ($p = 0.61$) en este parámetro de calidad evaluado. Szkolnicka et al. (2019) reportaron tasas de derretimiento entre 0.71 a 1.10%/min⁻¹, inferiores a las mostradas en este trabajo. En contraste, Rolon et al. (2017) reportaron la ausencia de diferencias estadísticas significativas en la tasa de derretimiento en helado de vainilla con distintos niveles de grasa (6% a 14%).

El comportamiento (o resistencia al) derretimiento refleja su habilidad para resistirse al derretimiento cuando se expone a temperaturas cálidas por un periodo de tiempo (Clarke, 2012), y tiene su mayor significancia tecnológica y comercial cuando el producto se come en un cono o paleta, siendo una característica indeseable para los consumidores (Goff & Hartel, 2013).



Gráfica 1. Tasa de derretimiento de helado

^{a,b,c,d} Diferentes letras en sentido vertical indican diferencias significativas según Tukey ($p < 0.05$)

¹ Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar ($n=2$)

Se considera que, entre los factores que influyen la tasa de derretimiento, se encuentra la aglomeración de la grasa en la mezcla. Si bien se eligió un suero de

mantequilla tratado por ultrasonido que pudiera tener una interacción con las moléculas de grasa, no parece haber tenido una influencia estructural que permitiera observar diferencias significativas en la tasa de derretimiento entre las muestras de helado.

De acuerdo con Szkolnicka et al. (2019), el uso de emulsificantes mejora la resistencia del helado al derretimiento. Tanto en el estudio anteriormente mencionado como en este, se evitó el uso de emulsificantes para evaluar el impacto del uso de suero de mantequilla en los parámetros de calidad del producto. La diferencia en la tasa de derretimiento al compararse con la literatura principalmente podría deberse al incremento en el contenido de grasa. Si bien un aumento en el contenido de grasa se correlaciona con una mayor resistencia al derretimiento, a mayor desestabilización de los glóbulos de grasa aumenta la tasa de derretimiento, y es posible que la formulación empleada no presentara un contenido de proteína suficiente para promover una coalescencia de la grasa que confiriera al helado una resistencia al derretimiento (Rossa, Burin & Bordignon-Luiz, 2012). Adicionalmente, es posible que sea necesario añadir ingredientes o proteínas con capacidad de ligar agua, ya que se reporta que reducir la libertad de movimiento de las moléculas de agua resulta en una reducción del derretimiento (Akesowan, 2009).

6.3.2 Color

Los parámetros de color para las muestras de helado, reportados en el Cuadro 12, no presentaron diferencias significativas entre muestras ($p > 0.05$) para ninguno de los parámetros evaluados. Los parámetros son similares a la literatura (Akesowan, 2009; Szkolnicka et al., 2019), y la falta de diferencia estadística en el color de muestras de helado con adición de galactooligosacárido ha sido reportada por Balthasar et al. (2015). Un valor alto en L^* , que representa luminosidad, implica que un helado se acerca a lo que conoceríamos como un blanco; mientras que, los valores negativos en el eje a^* indican una característica que va ligeramente al espectro del color verde, aunque es mínimo en el estudio, y los valores positivos en

b^* demuestran un leve atributo amarillo (Ho et al., 2019). De acuerdo con Goff & Hartel (2013), el color de un helado es importante para el atractivo del producto y ayudar a la identificación del sabor; dependiendo de esto, puede haber un rechazo por parte de los consumidores a colorantes añadidos.

Cuadro 12. Parámetros de color en muestras de helado

Formulación	L*	a*	b*
HUS	84.97 ± 0.34 ^a	-0.18 ± 0.04 ^a	10.12 ± 0.01 ^a
HBM	84.40 ± 1.22 ^a	-0.22 ± 0.13 ^a	10.68 ± 1.05 ^a
HC	83.01 ± 1.39 ^a	-0.04 ± 0.13 ^a	9.43 ± 0.38 ^a

^{a,b,c,d} Diferentes letras en sentido vertical indican diferencias significativas según Tukey ($p < 0.05$)

¹ Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar ($n=2$)

6.3.3. Overrun

La incorporación de aire es un proceso necesario durante la elaboración de helado ya que influenciará el perfil sensorial al conferirle una textura más suave al producto (Balthasar et al., 2015), además de aumentar el rendimiento de producto obtenido. Clarke (2012) indica que un helado convencional tiene una fracción volumétrica de helado de 0.50, mientras que en un producto premium será de 0.35.

Los datos de *overrun* presentados en el cuadro 12 muestran una diferencia estadística ($p = 0.0448$) en los valores de *overrun* obtenidos durante este estudio, siendo el helado con el suero de mantequilla tratado el que presentó el menor valor en este parámetro, mientras que el helado control mostró la mayor incorporación de aire. Si bien se presenta diferencia estadística, podría considerarse una diferencia sin aplicación práctica.

Los valores obtenidos en el estudio se consideran bajos en comparación a los reportados en la literatura (Akesowan, 2009; Rolon et al., 2016; Szkolnicka et al., 2019). Esta diferencia se atribuye principalmente al uso de una máquina para helado

de uso doméstico que no permite la inyección de aire en la mezcla ni el enfriamiento de esta a las temperaturas típicas en equipos convencionales (-30 °C), lo que resulta en los bajos valores de *overrun* característicos de helados hechos en casa, que sensorialmente pueden ser comparables a formulaciones *premium* comerciales (Bower & Baxer, 2000; Clarke, 2012). Adicionalmente, a mayor contenido de grasa, menor es el porcentaje de *overrun* (Rossa et al., 2012), siendo entendible que un helado *premium* elaborado en este tipo de equipo no incorporará la misma cantidad de aire reportada en otros estudios.

Cuadro 13. Cuantificación de *overrun* en muestras de helado

Formulación	<i>Overrun</i> (%)
HUS	8.10 ± 0.21 ^a
HBM	11.84 ± 0.85 ^{ab}
HC	11.04 ± 1.24 ^b

^{a,b,c,d} Diferentes letras en sentido vertical indican diferencias significativas según Tukey ($p < 0.05$)

¹ Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar ($n=2$)

Al considerar que el helado con suero de mantequilla sonicado fue el del menor porcentaje de *overrun*, no se puede descartar un efecto por la adición de este ingrediente. Clarke (2012) expone que la parte hidrofílica de las proteínas yace en la matriz, mientras que la parte hidrofóbica se ubica en las burbujas de aire, pero también se presenta una estabilización de Pickering debido a la absorción de las gotas de grasa en la superficie de las burbujas de aire. Es posible que el ingrediente añadido, en función de sus grupos tioles disponibles que le confieren la capacidad de absorber grasa, haya absorbido la suficiente cantidad de grasa para impedir la estabilización de las burbujas de aire; el no cubrir completamente las burbujas de aire con gotas de grasa es parte de la estructura del helado, porque permite la coalescencia parcial de los glóbulos de grasa, pero es posible que no se haya llegado a este punto de estabilización por la presencia del ingrediente. De esta manera, se explicaría por qué el helado con suero de mantequilla sonicado presenta el menor porcentaje de *overrun* de las tres muestras. Esto abriría la necesidad de establecer límites en la capacidad de absorción de grasa de ingredientes empleados

en helado, en función de parámetros como contenido de grasa y capacidad de *overrun* de los equipos empleados.

Si bien resultados de este parámetro se encuentran debajo del 60-90% encontrado en otras formulaciones premium (Park et al., 2009), cabe aclarar que un helado *superpremium* presenta un contenido de grasa entre el 16 al 18% y *overrun* menor al 30% (Bower & Baxer, 2000). Sería necesario hacer evaluaciones sensoriales que contraste el helado de este estudio con helado *superpremium* para evaluar la posibilidad de estar replicando el perfil sensorial.

Otra consideración es que la ausencia de estabilizantes y/o emulsificantes en la formulación y el bajo valor de *overrun*, además del empleo de un equipo de congelamiento por lotes, son atributos característicos del *gelato*, postre lácteo congelado de origen italiano que se diferencia del helado convencional por las características anteriormente mencionadas (Thompson, Chambers & Chambers, 2009). El uso de una máquina doméstica para helados se debió a motivos logísticos puesto que se necesitaba producir los menores volúmenes posibles y, la omisión de estabilizantes y emulsificantes, se hizo en base en el interés lo que resultó en un proceso de fabricación similar a un *gelato*, aunque la formulación empleada contiene un nivel de grasa mayor que el convencional para *gelato* (4-8%). Al considerar las muestras de helado de este estudio como productos análogos al helado, el valor de *overrun* es equiparable a datos encontrados en la literatura (Singh, Rani & Kanse, 2020). Con esta información sería posible considerar el producto elaborado como un intermediario entre *gelato* y helado *premium*. Evaluaciones sensoriales, probablemente una prueba triangular o alguna que nos permita conocer similitudes/diferencias entre perfiles organolépticos, nos ayudaría a conocer qué tan análogo es nuestro helado a un *gelato* o cómo se posicionaría entre los consumidores, permitiendo así utilizar el suero de mantequilla en un producto de elevado valor comercial.

7. CONCLUSIONES

- La aplicación de ultrasonido de alta intensidad en muestras de suero de mantequilla reconstituido generó cambios en distintas propiedades funcionales analizadas.
- La aplicación de ultrasonido de alta intensidad redujo de forma significativa la solubilidad del suero de mantequilla en comparación a las muestras control
- Las muestras de suero de mantequilla tratadas con ultrasonido presentaron disminuciones significativas para el índice de actividad emulsificante (EAI) en comparación al suero control, mientras que no se observaron cambios significativos para el índice de estabilidad de emulsión (ESI).
- Se reportó un incremento en la capacidad de absorción de grasa de las muestras tratadas con ultrasonido, con valores superiores a los reportados por otros autores en muestras de proteínas de origen animal y vegetal.
- El tratamiento con ultrasonido indujo un aumento significativo en la viscosidad de muestras de suero de mantequilla.
- La cuantificación de tioles libres indica una mayor disponibilidad de éstos cuando el suero de mantequilla es sometido a un tratamiento de ultrasonido de alta intensidad, destacando aquellas muestras sometidas a 20 y 40% de amplitud sónica durante 5 minutos.
- Al correlacionar los resultados de funcionalidad con la cuantificación de tioles libres, se propone que la aplicación del tratamiento ultrasónico promovió la formación de agregados proteicos, confirmado por el análisis del perfil electroforético realizado bajo condiciones nativas y el espectro obtenido mediante FTIR. Se espera que el ingrediente desarrollado sustituya ingredientes estabilizantes/emulsificantes en una formulación de helado.
- Se eligió el tratamiento 20% amplitud sónica a 5 minutos como el ingrediente a añadir en una formulación de helado sabor natural.
- No se reportaron cambios significativos para los valores de tasa de derretimiento y color en las muestras de helado adicionado con suero de mantequilla sometido al tratamiento de ultrasonido.

- Se presentaron diferencias significativas para el porcentaje de *overrun*, siendo el helado control el que presentó el mayor porcentaje y el de menor porcentaje fue el helado con el suero de mantequilla sometido a ultrasonido de alta intensidad, por 5 minutos a 20% de amplitud de sónica. Se sugiere que la adición de este ingrediente pudo haber afectado la capacidad de los glóbulos de grasa para estabilizar las burbujas de aire.
- Considerando el método de fabricación, la ausencia de estabilizantes y/o emulsificantes añadidos y el nivel de *overrun* reportado, se considera que el producto desarrollado posee atributos que lo colocarían como un análogo de *gelato* en vez de un helado tipo *premium*.
- Se concluye que la adición del suero de mantequilla, al nivel de amplitud sónica y tiempo de tratamiento de ultrasonido seleccionados, no confirió alguna mejora o defecto destacable a la formulación de helado empleada en este estudio. La elección de una formulación con emulsificantes y/o estabilizantes añadidos y el uso un equipo de congelamiento dinámico que permita el control del *overrun* o de la inyección de aire, podría ayudarnos a evaluar si es necesario realizar estudios posteriores para encontrar condiciones de ultrasonido o concentraciones diferentes de ingredientes para la aplicación de suero de mantequilla tratado con ultrasonido en una formulación de helado. Se pretende que la adición de un ingrediente desarrollado por procesamiento con ultrasonido de alta intensidad promueva algún cambio estructural en el helado que le confiera al producto una característica tecnológica deseable, como mantener la coalescencia parcial del helado para alcanzar menores tasas de derretimiento.
- Al observar los valores de *overrun* y tasa de derretimiento, entre las preguntas surgidas después de la conclusión del proyecto, se encuentra la necesidad de establecer límites o intervalos en los valores de distintas propiedades funcionales para conocer su posible influencia o impacto al ser añadidos en formulaciones de alimentos con matrices complejas, como lo es el helado.

8. REFERENCIAS

Aalaei, K., Rayner, M. & Sjöholm, I. (2016). Storage stability of freeze-dried, spray-dried and drum-dried skim milk powders evaluated by available lysine. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 675-682. doi: 10.1016/j.lwt.2016.07.011

Abadía-García, L., Castaño-Tostado, E., Ozimek, L., Romero-Gómez, S., Ozuna, C. & Amayo-Llano, S.L. (2016). Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37(A), 84-90. doi: 10.1016/j.ifset.2016.08.010

Ahmedna, M., Prinyawiwatkul, W. & Rao, R.M. (1999). Solubilized wheat protein isolate: Functional properties and potential food applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1340-1345, doi: 10.1021/jf981098s

Akasha, I., Campbell, L., Lochamp, J. & Euston, S.R. (2016). The major proteins of the seed of the fruit of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.): Characterisation and emulsifying properties. *Food Chemistry*, 197, 799-806, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.11.046

Akesowan, A. (2009). Influence of soy protein isolate on physical and sensory properties of ice cream. *Thai Journal of Agricultural Science*, 42 (1), 1-6.

Ali, A. H. (2018). Current knowledge of buttermilk: Composition, applications in the food industry, nutritional and beneficial health characteristics. *International Journal of Dairy Technology*, 70, 1-14. doi:10.1111/1471-0307.12572

Aryee, A. N. A., Agyei, D., & Udenigwe, C. C. (2018). Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins. En *Proteins in Food Processing* (27-45). Reino Unido: Woodhead Publishing. doi:10.1016/b978-0-08-100722-8.00003-6

Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 463-472. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.08.018

Augustin, M.L., Bhail, S., Cheng, L.J., Shen, Z., Øiseth, S. & Sanguansri, L. (2014). Use of whole buttermilk for microencapsulation of omega-3 oils. *Journal of Functional Foods*, 19, 859-867. doi: 10.1016/j.jff.2014.02.014

Awad, T.S., Moharram, H.A., Shaltout, O.E., Asker, D. & Youssef, M.M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48, 410-427. doi: 10.1016/j.foodres.2012.05.004

Balthasar, C.F., Silva, H.L.A., Celeguini, R.M.S., Santos, R., Pastore, G.M., Conte Junior, C.A., Freitas, M.Q., Nogueira, L.C., Silva, M.C. & Cruz, A.G. (2015). Effect of galactooligosaccharide addition on the physical, optical, and sensory acceptance of vanilla ice cream. *Journal of Dairy Sciences*, 98, 4266-4272.

Barry, K.M., Dinan, T.G., Stanton, C. & Kelly, P.M. (2018). Investigation of the neurotrophic effect of dairy phospholipids on cortical neuron outgrowth and stimulation. *Journal of Functional Foods*, 40, 60-67. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.10.005>

Barukčić, I., Jakopović, K.L., Herceg, Z., Karlović, S. & Božanić, R. (2015). Influence of high intensity ultrasound on microbial reduction, physico-chemical characteristics and fermentation of sweet whey. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 94-101. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.10.013>

Boiarkina, I. & Young, B. 2019. The Structure and Rehydration Properties of Dairy Powders. En *Encyclopedia of Food Chemistry* (3, 55-50) Reino Unido: Elsevier. doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.21693-4

Bourlieu, C., Cheillan, D., Blot, M., Daira, P., Trauchessec, M., Ruet, S., Gassi, J.Y., Beaucher, E., Robert, B., Leconte, N., Bouhallab, S., Gaucheron, F., Gésan-Guiziou, G. & Michalski, M.C. (2018). Polar lipid composition of bioactive dairy co-products buttermilk and butterserum: Emphasis on sphingolipid and ceramide isoforms. *Food Chemistry*, 240, 67-74. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.091>

Bower, J. A., & Baxter, I. A. (2000). Consumer perception of the nature and quality of home-made and commercial dairy ice cream. *British Food Journal*, 102(11), 821–837. doi:10.1108/00070700010362266

Brink, L.R. & Lönnerdal, B. (2018). The role of milk fat globule membranes in behavior and cognitive function using a suckling rat pup supplementation model. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 58, 131-137. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.05.004>

Buldo, P., & Wiking, L. (2016). Butter: Properties and Analysis. *Encyclopedia of Food and Health*, 535–541. doi:10.1016/b978-0-12-384947-2.00095-7.

Bushani, A., & Anandharamakrishnan, C. (2017). *Freeze Drying*. En Anandharamakrishnan, C. (Ed.), *Handbook of Drying for Dairy Products* (95-123). Chichester, UK: Wiley Blackwell. doi: 10.1002/9781118930526

Cárcel, J.A., García-Pérez, J.V., Benedito, J. & Mullet, A. (2012). Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. *Journal of Food Engineering*, 110, 200-207. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.05.038

Carpin, M., Bertelsen, H., Dalberg, A., Roiland, C., Risbo, J., Schuck, P., & Jeantet, R. (2017). Impurities enhance caking in lactose powder. *Journal of Food Engineering*, 198, 91–97. doi:10.1016/j.jfoodeng.2016.11.013

Castro-Gómez, P., Rodríguez-Alcalá, L.M., Monteiro, K.M., Ruiz, A.L.T.G., Carvalho, J.E. & Fontecha, J. (2016). Antiproliferative activity of buttermilk lipid fractions isolated using food grade and non-food grade solvents on human cancer cell lines. *Food Chemistry*, 212, 695-702. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.030>

Castro-Gómez, P., Garcia-Serrano, A., Visioli, F. & Fontecha, J. (2015). Relevance of dietary glycerophospholipids and sphingolipids to human health. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 101, 41-51. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2015.07.004>

Charcosset, C. (2012). *Membrane Processes in Biotechnology and Pharmaceutics* (101-141). Oxford: Elsevier. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-56334-7.02001-3>

Chemat, F., Zill-e-Huma & Khan, M.K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835. doi: 10.1016/j.ultsonch.2010.11.023

Chen, G. Q., Leong, T. S. H., Kentish, S. E., Ashokkumar, M., & Martin, G. J. O. (2019). *Membrane Separations in the Dairy Industry*. En Galanakis, C.M. (Ed.), *Separation of Functional Molecules in Food by Membrane Technology*, 267-304. doi:10.1016/b978-0-12-815056-6.00008-5

Chen, W., Liang, G., Li, X., He, Z., Zeng, M., Gao, D., Qin, F., Goff, H.D. & Chen, J. (2019). Effects of soy protein and hydrolysates on fat globule coalescence and meltdown properties of ice cream. *Food Hydrocolloids*, 94, 279-286. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.045>

Chen, G. Q., Talebi, S., Gras, S. L., Weeks, M., & Kentish, S. E. (2018). A review of salty waste stream management in the Australian dairy industry. *Journal of Environmental Management*, 224, 406-413. doi: 10.1016/j.jenvman.2018.07.056.

Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H. & Catignani, G.L. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66,1219-1227. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(83)81926-2

Clarke, C. (2012). *The Science of Ice Cream*. Croydon, Reino Unido: RSC Publishing. Qué es?

Corredig, M., Roesch, R.R. & Dalgleish, D.G. (2003). Production of a Novel Ingredient from Buttermilk. *Journal of Dairy Science*, 86(9), 2744-2750. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73870-3

Jane, M. & Ahmad, C. (2017) Traditional fermented foods and beverages of Namibia. *Journal of Ethnic Foods*, 4(3), 145-153. doi: 10.1016/j.jef.2017.08.001

Daw, E., & Hartel, R. W. (2015). Fat destabilization and melt-down of ice creams with increased protein content. *International Dairy Journal*, 43, 33-41. doi:10.1016/j.idairyj.2014.12.001

Dalgleish, D. G. (2011). On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. *Soft Matter*, 7(6), 2265-2272. doi:10.1039/c0sm00806k

de Pinho, M.R. & Minhalma, M. (2019). Introduction in Membrane Technologies. En Galanakis, C.M. (Ed.), *Separation of Functional Molecules in Food by Membrane Technology* (1-29). Londres: Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815056-6.00001-2>

Deosarkar, S.S., Khedkar, C.D. & Kalyankar, S.D. 2016. Butter: Manufacture. En Caballero, B., Finglas, P.M. & Toldrá, F. (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (1, 529-534) Oxford: Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00094-5

Deosarkar, S.S., Khedkar, C.D., Kalyankar, S.D & Sarode, A.R. 2016. Ice Cream: Uses and Method of Manufacture. En Caballero, B., Finglas, P.M. & Toldrá, F. (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (1, 391-397) Oxford: Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00384-6

Deshwal, G. K., Singh, A. K., Kumar, D., & Sharma, H. (2020). Effect of spray and freeze drying on physico-chemical, functional, moisture sorption and morphological characteristics of camel milk powder. *LWT - Food Science and Technology*, 134, 1-10 (110117). doi:10.1016/j.lwt.2020.110117

Du, M., Xie, J., Gong, B., Xu, X., Tang, W., Li, X., Li, C. & Xie, M. (2018). Extraction, physicochemical characteristics and functional properties of Mung bean protein. *Food Hydrocolloids*, 76, 131-140. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.01.003

Durmaz, Y., Kilicli, M., Toker, O. S., Konar, N., Palabiyik, I., & Tamtürk, F. (2020). Using spray-dried microalgae in ice cream formulation as a natural colorant: Effect on physicochemical and functional properties. *Algal Research*, 47, 101811. doi:10.1016/j.algal.2020.101811

Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70-77. doi:10.1016/0003-9861(59)90090-6

Fauquant, J., Beaucher, E., Sinet, C., Robert, B. & Lopez, C. (2014). Combination of homogenization and cross-flow microfiltration to remove microorganisms from industrial buttermilks with an efficient permeation of proteins and lipids. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 21, 131-141. doi: 10.1016/j.ifset.2013.10.004

Frydenberg, R. P., Hammershøj, M., Andersen, U., Greve, M. T., & Wiking, L. (2016). Protein denaturation of whey protein isolates (WPIs) induced by high intensity ultrasound during heat gelation. *Food Chemistry*, 192, 415-423. doi:10.1016/j.foodchem.2015.07.037

Ganju, S., & Gogate, P. R. (2017). A review on approaches for efficient recovery of whey proteins from dairy industry effluents. *Journal of Food Engineering*, 215, 84-96. doi:10.1016/j.jfoodeng.2017.07.021

Goff, H.D. 2019. The Structure and Properties of Ice Cream and Frozen Desserts. En Melton, L., Shahidi, F. & Varelis, P. (Eds.), *Encyclopedia of Food Chemistry* (3, 47-54) Oxford: Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.21703-4

Goff, H.D. & Hartel, R.W. (2013). *Ice Cream* (7th Ed.). New York: Springer.

Goulas, A. & Grandison, A.S. (2008). Applications of Membrane Separation. En Britz, T.J. & Robinson, R.K. (Eds.) *Advanced Dairy Science and Technology* (35-74). Oxford: Blackwell Publishing. doi: 10.1002/9780470697634.ch2

Hansen, S.F., Patrat-Melin, B., Rasmussen, J.T., Larsen, L.B., Ostenfeld, M.S. & Wiking, L. (2018). Placing pasteurisation before or after microfiltration impacts the protein composition of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, 81, 35-41. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.12.015>

Harwood, M. L., Loquasto, J. R., Roberts, R. F., Ziegler, G. R., & Hayes, J. E. (2013). Explaining tolerance for bitterness in chocolate ice cream using solid chocolate preferences. *Journal of Dairy Science*, 96(8), 4938–4944. doi:10.3168/jds.2013-6715

Higuera-Barraza, O.A., Del Toro-Sanchez, C.L., Ruiz-Cruz, S. & Márquez-Ríos, E. (2016). Effects of high-energy ultrasound on the functional properties of proteins.

Ultrasonics Sonochemistry, 31, 558-562. doi:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.02.007>

Ho, T.M., Chan, S., Yago, A.J.E., Shravya, R., Bhandari, B.R. & Bansal, N. (2019). Changes in physicochemical properties of spray-dried camel milk powder over accelerated storage. *Food Chemistry*, 295, 224-233. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.05.122

Huppertz, T. & Gazi, I. (2016). Lactose in dairy ingredients: Effect on processing and storage stability. *Journal of Dairy Science*, 99(8), 6842-6851. doi: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10033>

Indu, C., Thangavel, K. & Amirtham, D. (2019). Influence of ultra-sonication on stability and physicochemical properties of coconut milk. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 3565-3570.

Ismail, H. A., Hameed, A. M., M.Refaey, M., Sayqal, A., & Aly, A. A. (2020). Rheological, Physio-chemical and Organoleptic Characteristics of Ice Cream Enriched with Doum Syrup and Pomegranate Peel. *Arabian Journal of Chemistry*, 13, 7346-7356. doi:10.1016/j.arabjc.2020.08.012

Jambrak, A.R., Lelas, V., Krešić, G., Badanjak, M., Brnči, S.R., Herceg, Z., Batur, V. & Grčić, I. (2011). Rheological, functional and thermo-physical properties of ultrasound treated whey proteins with addition of sucrose or milk powder. *Mljekarstvo*, 61(1), 79-91.

Jambrak, A.R., Mason, T.J., Lelas, V., Herceg, Z. & Herceg, I.L. (2008). Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, 86, 281-287. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2007.10.004

Ji, J., Fitzpatrick, J., Cronin, K., Maguire, P., Zhang, H., & Miao, S. (2016). Rehydration behaviours of high protein dairy powders: The influence of agglomeration on wettability, dispersibility and solubility. *Food Hydrocolloids*, 58, 194-203. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.02.030

Juliano, P., Torkamani, A.E., Leong, T., Kolb, V., Watkins, P., Aljouni, S. & Singh, T.K. (2014). Lipid oxidation volatiles absent in milk after selected ultrasound processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), 2165-2175. doi: https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.03.001

Kanurić, K.G., Milanović, S.D., Ikonić, B.B., Lončar, E.S., Iličić, M.D., Vukić, V.R. & Vukić, D.V. (2018). Kinetics of lactose fermentation in milk with kombucha starter. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(4), 1229-1234. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.02.002

Kaushik, P., Dowling, K., Adhikari, R., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2017). Effect of extraction temperature on composition, structure and functional properties of flaxseed gum. *Food Chemistry*, 215, 333–340. doi:10.1016/j.foodchem.2016.07.137

Keris-Sen, U.D., Sen, U., Soydemir, G. & Gurol, M.D. (2014). An investigation of ultrasound effect on microalgal cell integrity and lipid extraction efficiency. *Bioresource Technology*, 152, 407-413. doi:10.1016/j.biortech.2013.11.018

Khatkar, A. B., Kaur, A., Khatkar, S. K., & Mehta, N. (2018). Characterization of heat-stable whey protein: Impact of ultrasound on rheological, thermal, structural and morphological properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 49, 333-342. doi:10.1016/j.ultsonch.2018.08.026

Kondor, A., & Hogan, S. A. (2017). Relationships between surface energy analysis and functional characteristics of dairy powders. *Food Chemistry*, 237, 1155-1162. doi:10.1016/j.foodchem.2017.06.036

Kulozik, U. (2019). Ultra- and Microfiltration in Dairy Technology. En Basile, A. & Charcosset, C. (Eds.) *Current Trends and Future Developments on (Bio-) Membranes*, 1-28. Londres: Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-813606-5.00001-4

Kurt, A., & Atalar, I. (2018). Effects of quince seed on the rheological, structural and sensory characteristics of ice cream. *Food Hydrocolloids*, 82, 186-195. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.04.011

Lambert, S., Leconte, N., Blot, M., Rousseau, F., Robert, B., Camier, B., Gassi, J.-Y., Cauty, C., López, C. & Gésan-Guiziu, G. (2016). The lipid content and microstructure of industrial whole buttermilk and butter serum affect the efficiency of skimming. *Food Research International*, 83, 121-130. doi:10.1016/j.foodres.2016.03.002

Lee, J.C. & Timasheff, S.N. (1981). The stabilization of proteins by sucrose. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(14), 7193-7201. doi.org/10.1016/S0021-9258(19)68947-7

Leeb, E., Haller, N., & Kulozik, U. (2018). Effect of pH on the reaction mechanism of thermal denaturation and aggregation of bovine β -lactoglobulin. *International Dairy Journal*, 78, 103-111. doi:10.1016/j.idairyj.2017.09.006

Lin, Y., Kelly, A.L., Mahony, J.A.O. & Guinee, T.P. (2018). Effect of heat treatment, evaporation and spray drying during skim milk powder manufacture on the compositional and processing characteristics of reconstituted skim milk and concentrate. *International Dairy Journal*, 78, 53-64. doi: 10.1016/j.idairyj.2017.10.007

Liu, Y., Wei, Z-C., Deng, Y-Y., Dong, H., Zhang, Y., Tang, X-J., Li, P., Liu, G. & Zhang, M-W. (2020). Comparison of the effects of different food-grade emulsifiers

on the properties and stability of a casein-maltodextrin-soybean oil compound emulsion. *Molecules*, 25(3), 458-475. DOI: 10.3390/molecules25030458

Lo, B., Gorczyca, E., Kasapis, S., & Zisu, B. (2019). Effect of Low-Frequency Ultrasound on the Particle Size, Solubility and Surface Charge of Reconstituted Sodium Caseinate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 58, 1-10 (104525). doi:10.1016/j.ultsonch.2019.03.016

Ma, C.-Y. (2015). Soybean | Soy Concentrates and Isolates. Reference Module in Food Science, 1-15. doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.00170-0

Ma, S., Wang, C. & Guo, M. (2018). Changes in structure and antioxidant activity of β -lactoglobulin by ultrasound and enzymatic treatment. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 43, 227-236. doi: 10.1016/j.ultsonch.2018.01.017

Mahboubi, A., Ferreira, J. A., Taherzadeh, M. J., & Lennartsson, P. R. (2017). Value-added products from dairy waste using edible fungi. *Waste Management*, 59, 518-525. doi:10.1016/j.wasman.2016.11.017

Mahmoodani, F., Perera, C. O., Abernethy, G., Fedrizzi, B., & Chen, H. (2018). Lipid oxidation and vitamin D3 degradation in simulated whole milk powder as influenced by processing and storage. *Food Chemistry*, 261, 149-156. doi:10.1016/j.foodchem.2018.04.043

Marchesini, G., Balzan, S., Montemurro, F., Fasolato, L., Andrighetto, I., Segato, S. & Novelli, E. (2012). Effect of ultrasound alone or ultrasound coupled with CO₂ on the chemical composition, cheese-making properties and sensory traits of raw milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 391-397. doi: 10.1016/j.ifset.2012.09.003

Mather, I. H. (2011). Milk Lipids | Milk Fat Globule Membrane. En Fuquay, J.W. (Ed.) *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2nd Ed.), 680-690. doi:10.1016/b978-0-12-374407-4.00337-x

Metherel, A. H., Taha, A. Y., Izadi, H., & Stark, K. D. (2009). The application of ultrasound energy to increase lipid extraction throughput of solid matrix samples (flaxseed). *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81(5-6), 417-423. doi:10.1016/j.plefa.2009.07.003

Mohanty, B., Mulvihill, D. M., & Fox, P. F. (1988). Emulsifying and foaming properties of acidic caseins and sodium caseinate. *Food Chemistry*, 28(1), 17-30. doi:10.1016/0308-8146(88)90003-9

Morin, P., Jiménez-Flores, R., & Pouliot, Y. (2004). Effect of temperature and pore size on the fractionation of fresh and reconstituted buttermilk by microfiltration. *Journal of Dairy Science*, 87, 267-273. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73165-3

Morin, P., Jiménez-Flores, R. & Pouliot, Y. (2007). Effect of processing on the composition and microstructure of buttermilk and its milk fat globule membranes. *International Dairy Journal*, 17(10), 1179-1187. doi: 10.1016/j.idairyj.2007.03.010

Mujumdar, A. S., Law, C. L., & Woo, M. W. (2016). Freeze Drying: Effects on Sensory and Nutritional Properties. *Encyclopedia of Food and Health*, 99-103. doi:10.1016/b978-0-12-384947-2.00327-5

Nikolova, Y., Petit, J., Sanders, C., Gianfrancesco, A., Desbenoit, N., Frache, G., Franchius, G., Scher, J. & Gaiani, C. (2014). Is it possible to modulate the structure of skim milk particle through drying process and parameters? *Journal of Food Engineering*, 142, 179-189. doi:10.1016/j.jfoodeng.2014.05.026

Nishanthi, M., Vasiljevic, T., & Chandrapala, J. (2017). Properties of whey proteins obtained from different whey streams. *International Dairy Journal*, 66, 76-83. doi:10.1016/j.idairyj.2016.11.009

Olabi, A., Jinjara, S., Jiménez-Flores, R., Walker, J.H. & Daroub, H. (2015). Compositional and sensory differences of products of sweet-cream and whey buttermilk produced by microfiltration, diafiltration, and supercritical CO₂. *Journal of Dairy Science*, 98, 3590-3598. doi: 0.3168/jds.2014-9141

Park, S. H., Jo, Y.-J., Chun, J.-Y., Hong, G.-P., Davaatseren, M., & Choi, M.-J. (2015). Effect of Frozen Storage Temperature on the Quality of Premium Ice Cream. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(6), 793-799. doi:10.5851/kosfa.2015.35.6.793

Pilarska, A.A., Pilarski, K., Witaszek, K., Waliszewska, H., Zborowska, M., Waliszewska, B., Kolasiński, M. & Szwarz-Rzepka, K. (2016). Treatment of dairy waste by anaerobic co-digestion with sewage sludge. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 23(1), 99-115. doi: 10.1515/eces-2016-0007

Pintor-Jardines, A., Arjona-Román, J.L., Totosaús-Sánchez, A., Severiano-Pérez, P., González-González, L. & Escalona-Buendía, H.B. (2018). The influence of agave fructans on thermal properties of low-fat, and low-fat and sugar ice cream. *LWT - Food Science and Technology*, 93, 679-685. doi: 10.1016/j.lwt.2018.03.060

Rai, R., Jones Shangpliang, H.N., Tamang, J.P. (2017). Naturally Fermented Milk Products of the Eastern Himalayas. *Journal of Ethnic Foods*, 3(4), 270-275. doi: 10.1016/j.jef.2016.11.006.

Ramos, O.L., Pereira, R.N., Rodrigues, R.M., Teixeira, J.A., Vicente, A.A. & Malcata, F.X. (2016). Whey and whey powders: production and uses. En Caballero, B.,

Finglas, P.M. & Toldrá, F. (Eds.) *Encyclopedia of Food and Health* (498-505). Oxford: Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00747-9

Richards, E. & Fearon, A.M. (2003). BUTTER | The Product and its Manufacture. En *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition) (1, 718-726) Oxford: Academic Press. doi: 10.1016/B0-12-227055-X/00138-3

Rolon, M. L., Bakke, A. J., Coupland, J. N., Hayes, J. E., & Roberts, R. F. (2017). Effect of fat content on the physical properties and consumer acceptability of vanilla ice cream. *Journal of Dairy Science*, 100(7), 5217-5227. doi:10.3168/jds.2016-12379

Rossa, P. N., Burin, V. M., & Bordignon-Luiz, M. T. (2012). Effect of microbial transglutaminase on functional and rheological properties of ice cream with different fat contents. *LWT - Food Science and Technology*, 48(2), 224-230. doi:10.1016/j.lwt.2012.03.017

Saffon, M. (2013). Development of a new dairy ingredient from the utilization of buttermilk constituents. (Tesis de doctorado). Université Laval, Canadá. Toda la tesis?

Saffon, M., Jiménez-Flores, R., Britten, M. & Pouliot, Y. (2014). On the use of buttermilk components as aggregation nuclei during the heat-induced denaturation of whey proteins. *Journal of Food Engineering*, 132, 21-28. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2014.02.001

Sánchez-García, Y. I., Ashokkumar, M., Mason, T. J., & Gutiérrez-Méndez, N. (2019). Influence of ultrasound frequency and power on lactose nucleation. *Journal of Food Engineering*, 249, 34-39. doi:10.1016/j.jfoodeng.2019.01.007

Sánchez-García, Y. I., Gutiérrez-Méndez, N., Orozco-Mena, R. E., Ramos-Sánchez, V. H., & Leal-Ramos, Y. (2019). Individual and combined effect of pH and whey proteins on lactose crystallization. *Food Research International*, 116, 455-461. doi:10.1016/j.foodres.2018.08.061

Sarkar, P., Kumar, L., Dhumal, C., Panigrahi, S.S. & Choudary, R. (2015). Traditional and ayurvedic foods of Indian origin. *Journal of Ethnic Foods*, 2(3), 97-109. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jef.2015.08.003>

Sarode, A.R., Sawale, P.D., Khedkar, C.D., Kalyankar, S.D. & Pawshe, R.D. (2016). Casein and caseinate: methods of manufacture. En Caballero, B., Finglas, P.M. & Toldrá, F. (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health*, Vol. 1 (676-682). Oxford: Academic Press. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00122-7>

Schmitz-Schug, I., Kulozik, U. & Foerst, P. (2016). Modeling spray drying of dairy products – Impact of drying kinetics, reaction kinetics and spray drying conditions on lysine loss. *Chemical Engineering Science*, 141, 315-329. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.11.008>

Secretaría de Salud y Asistencia. (2002-presente). NORMA Oficial Mexicana NOM-185-SSA1-2002, Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias. Fecha de consulta: marzo 25, 2019, de Secretaría de Economía Sitio web: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/185ssa12.html>

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2020-presente). Boletín de Leche: Enero-Marzo 2019. Fecha de consulta: diciembre 11, 2020, de SAGARPA Sitio web: <http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Bolet%C3%ADn%20de%20Leche%20enero-marzo%202019.pdf>

Shanmugam, A., Chandrapala, J. & Ashokkumar, M. (2012). The effect of ultrasound on the physical and functional properties of skim milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 251-258. doi: 10.1016/j.ifset.2012.06.005

Sharma, A., Jana, A.H. & Chavan, R.S. (2012). Functionality of Milk Powders and Milk-Based Powders for End Use Application - A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 518-528. doi:10.1111/j.1541-4337.2012.00199.x

Shendurse, A.M. & Khekar, C.D. 2016. Lactose. En Caballero, B., Finglas, P.M. & Toldrá, F. (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (3, 509-516) Oxford: Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00415-3>

Shi, R., Liu, Y., Hu, J., Gao, H., Qayum, A., Bilawal, A., Munkh-Amgalan, G., Jiang, Z. & Hou, J. (2020). Combination of high-pressure homogenization and ultrasound improves physicochemical, interfacial and gelation properties of whey protein isolate. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 102450. doi:10.1016/j.ifset.2020.102450

Silva, J. V. C., & O'Mahony, J. A. (2016). Flowability and wetting behaviour of milk protein ingredients as influenced by powder composition, particle size and microstructure. *International Journal of Dairy Technology*, 70(2), 277–286. doi:10.1111/1471-0307.12368

Singh, H. 2011. Milk Protein Products | Functional Properties of Milk Proteins. En Fuquay, J.W. (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (1, 887-893) Oxford: Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00352-6

Slavov, A.K. (2017). General characteristics and treatment possibilities of dairy wastewater - a review. *Food Technology and Biotechnology*, 55(1), 14-28. doi: 10.17113/ft b.55.01.17.4520

Sodini, I. Morin, P. Olabi, A. Jiménez-Flores, R. (2006). Compositional and Functional Properties of Buttermilk: A Comparison Between Sweet, Sour, and Whey Buttermilk. *Journal of Dairy Science*, 89 (2), 525-536. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(06)72115-4

Soria, A. C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7), 323-331. doi:10.1016/j.tifs.2010.04.003

Subsecretaría de Salubridad. (1982). Alimentos para humanos. Mantequilla de leche o crema pasteurizada. Foods for human. Pasteurized milk or cream butter. Normas mexicanas. Dirección general de normas. Fecha de consulta: marzo 25, 2019, de Colegio de Posgraduados Sitio web: <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-010-1982.PDF>

Sui, X., Bi, S., Qi, B., Wang, Z., Zhang, M., Li, Y., & Jiang, L. (2017). Impact of ultrasonic treatment on an emulsion system stabilized with soybean protein isolate and lecithin: Its emulsifying property and emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 63, 727-734. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.10.024

Susheelamma, N. S., & Rao, M. V. L. (1974). Surface-active principle in black gram (*Phaseolus mungo*) and its role in the texture of leavened foods containing the legume. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25(6), 665-673. doi:10.1002/jsfa.2740250608

Svanborg, S., Johansen, A-G., Abrahamsen, R.K. & Skeie, S.B. (2015). The composition and functional properties of whey protein concentrates produced from

buttermilk are comparable with those of whey protein concentrates produced from skimmed milk. *Journal of Dairy Science*, 98(9), 5829-5840. doi: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-9039>

Szkolnicka, K., Dmytrów, I., & Mituniewicz-Małek, A. (2020). Buttermilk ice cream—New method for buttermilk utilization. *Food Science & Nutrition*, 00, 1-10 doi:10.1002/fsn3.1429

Szuhaj, B.F. (2016). Phospholipids: Properties and Occurrence. En Caballero, B., Finglas, P.M. & Toldrá, F. (Eds.) *Encyclopedia of Food and Health*, Vol. 4 (5414-4519). Oxford: Academic Press. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00541-9>

Tao, Y., & Sun, D.-W. (2014). Enhancement of Food Processes by Ultrasound: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(4), 570-594. doi:10.1080/10408398.2012.667849

Teijeiro, M., Pérez, P.F., De Antoni, G.L. & Golowczyc, M.A. (2018). Suitability of kefir powder production using spray drying. *Food Research International*, 112, 169-174. doi: 10.1016/j.foodres.2018.06.023

Terefe, N.S., Sikes, A.L. & Juliano, P. (2016). Ultrasound for Structural Modification of Food Products. En Knoerzer, K., Juliano, P. & Smithers, G. (Eds.), *Innovative Food Processing Technologies: Extraction, Separation, Component Modification and Process Intensification* (209-230). Duxford: Woodhead Publishing. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100294-0.00008-0>

Thompson, K.R., Chambers, D.H. & Chambers, E. IV. (2009). Sensory characteristics of ice cream produced in the U.S.A. and Italy. *Journal of Sensory Studies*, 24, 396-414. doi: 10.1111/j.1745-459X.2009.00217.x

Tiwari, B.K. & Mason, T.J. (2012). Ultrasound Processing of Fluid Foods. En Cullen, P.J., Tiwari, B.K. & Valdramidis, V.P. (Eds.) *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods* (135-165). Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-381470-8.00006-2

Trivedi, M.V., Laurence, J.S. & Siahian, T.J. (2009). The role of thiols and disulfides in protein chemical and physical stability. *Current Protein & Peptide Science*, 10(6), 614-625.

Wong, P.Y.Y. & Kitts, D.D. (2003). A Comparison of the Buttermilk Solids Functional Properties to Nonfat Dried Milk, Soy Protein Isolate, Dried Egg White, and Egg Yolk Powders. *Journal of Dairy Science*, 86 (3),746-754. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(03)73655-8

Waghmare, R. B., Perumal, A. B., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2021). Recent Developments in Freeze Drying of Foods. Reference Module in Food Science. doi:10.1016/b978-0-12-815781-7.00017-2

Wu, H., Hulbert, G.J. & Mount, J.R. (2000). Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1, 211-218. doi: [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(00\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00020-5)

YanJun, S., Jianhang, C., Shuwen, Z., Hongjuan, L., Jing, L., Lu, L., Uluko, H., Yanlin, S., Wenming, C., Wupeng, G. & Jiaping, L. (2014). Effect of power ultrasound pretreatment on the physical and functional properties of reconstituted milk protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, 124, 11-18. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.09.013

Zafar, T.A., Waslien, C., AlRaefaei, A., Alrashidi, N. & AlMahmoud, E. (2013). Whey protein sweetened beverages reduce glycemic and appetite responses and food intake in young females. *Nutrition Research*, 33(4), 303-310. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2013.01.008>

Zayas, J.F. (1997). *Functionality of Food Proteins*. Würzburg, Alemania: Springer Science & Business Media.

Zhang, C.-W., Wang, C.-Z., Tao, R., & Fang, C. (2016). Enzymolysis-based ultrasound extraction and antioxidant activities of polyphenol lipids from *Ginkgo biloba* leaves. *Process Biochemistry*, 51(3), 444-451. doi:10.1016/j.procbio.2015.12.008

Zhang, R., Pang, X., Lu, J., Liu, L., Zhang, S., & Lv, J. (2018). Effect of high intensity ultrasound pretreatment on functional and structural properties of micellar casein concentrates. *Ultrasonics Sonochemistry*, 47, 10-16. doi:10.1016/j.ultsonch.2018.04.011