



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción**

“Estudio preliminar de la fermentación de suero lácteo empleando
microorganismo *Lactobacillus paracasei subs.paracasei.*”

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

(TESIS DE GRADO)

Previo la obtención del Título de:

INGENIERAS EN ALIMENTOS

Presentado por:

Leonor Teresa Paucar Andrade

Andrea del Rocío Pérez Chávez

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2014

AGRADECIMIENTO

A Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar.

A mis padres Efraín Paucar y María Andrade quienes durante todos estos años confiaron y creyeron en mí por su infinito amor, cariño, comprensión y todo el apoyo que me brindaron. Gracias papi y mami los amo con mi vida.

A mis hermanos Carolina, Anamari, y Diego por estar conmigo y apoyarme siempre los amo mucho.

A mi esposo que ha sido el impulso durante toda mi carrera, que con su apoyo constante y amor incondicional ha sido mi amigo y compañero inseparable, Gracias Mory.

A mi querido hijo y a mi hermosa sobrina que le dan luz y sentido a mi vida con esa pequeña sonrisa que tienen los amo Marquito y Scarlett.

A mi compañera de proyecto Andrea gracias por aceptar recorrer este camino juntas, por el entusiasmo y empeño que pusiste para lograr nuestro objetivo.

A mis amigos y familiares, gracias por estar conmigo, por su confianza y cariño.

Agradezco de manera muy especial a nuestra directora, Dra. Olga Sánchez Collazo, quien con sus conocimientos y apoyo nos supo guiar en el presente proyecto desde su inicio hasta su culminación.

Leonor Teresa Paucar Andrade

AGRADECIMIENTO

En primer lugar doy las gracias a Dios por brindarme su amor y bendiciones.

A mi papá por enseñarme a nunca rendirme ante los problemas, y a mi mamá por enseñarme que el amor es la fuerza más grande que existe, ustedes son los seres a quienes más valoro en el mundo.

A mis hermanos que son mis mejores y más incondicionales amigos y a mi gemelo que sé que desde el cielo siempre me está cuidando y protegiendo.

A mi novio Omar por su amor incondicional y sincero.

A mi compañera Teresa por la amistad brindada y dedicación a este proyecto.

A la Dra. Olga Sánchez, mujer de elevada fortaleza y sapiencia que nos ha guiado durante la realización de esta tesis.

Andrea del Rocío Pérez Chávez

DEDICATORIA

A mis padres Efraín y María pilares fundamentales en mi vida, por el amor y el apoyo incondicional que he recibido.

A mi esposo Marco por todo el apoyo, el amor y por ser mi compañero inseparable día tras día.

A mi hijo Marco Saúl para quien ningún sacrificio es suficiente y que con su luz ha iluminado mi vida.

A mi sobrina Scarlett que le da luz y sentido a mi vida.

A mis hermanos Carolina, Anamari y Diego los quiero mucho.

A mis Abuelitos por sus oraciones y todo su cariño.

Leonor Teresa Paucar Andrade

DEDICATORIA

A Dios por las bendiciones recibidas a lo largo de mi vida.

A mis padres por su amor y apoyo incondicional.

A mis hermanos por ser mis mejores amigos.

A mi gemelo que siempre lo llevo en mi mente y en mi corazón

A mi novio Omar por su amor sincero y por su paciencia ante mis momentos de arrebatos.

Andrea del Rocío Pérez Chávez

TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

Dr. Kleber Barcia V., Ph.D.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE

Ph.D. Olga Sánchez C.
DIRECTORA

MSc. María Fernanda Morales R.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este Trabajo Final de Graduación, nos corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

Leonor Teresa Paucar Andrade

Andrea del Rocío Pérez Chávez

RESUMEN

El lactosuero es un subproducto resultante de los procesos artesanales e industriales en los cuales la leche es transformada en queso; este líquido de color amarillento es generado después de la separación de la cuajada y en el mismo se encuentran gran cantidad de los más valiosos nutrientes de la leche entre los cuales se encuentran proteínas que tienen un aporte nutricional significativo para el organismo.

La cantidad de este subproducto disponible en el país es considerable, ya que de acuerdo a datos presentados en el año 2013 anualmente se obtienen de la fabricación del queso 4.6×10^8 litros de suero lácteo y específicamente en la zona 5 en la cual se centra la investigación existe una producción estimada en 2.5 millones de litros; de los cuales la mayoría son desechados a ríos y suelos, debido al desconocimiento de sus bondades nutricionales y el difícil acceso a tecnologías que ayuden a su manejo y procesamiento.

En este trabajo de investigación se pretendió presentar una alternativa asequible para el aprovechamiento del lactosuero; para lo cual se realizó la caracterización físico-química del suero lácteo el mismo que procedía de una industria quesera privada perteneciente a la Zona 5. Posteriormente se efectuó un proceso de fermentación; el mismo que se realizó mediante

corridas experimentales a nivel de laboratorio empleando el lactosuero como sustrato para la fermentación del *Lactobacillus paracasei subs. paracasei*.

En el proceso de fermentación se utilizaron dos cantidades del microorganismo *Lactobacillus paracasei subs. paracasei* (0.6 g, 1.0 g), dos valores de agitación (80 rpm y 100 rpm) y dos diferentes temperaturas (30°C y 37 °C) respondiendo a un diseño experimental de 2³. Finalizado el proceso de fermentación se caracterizó físico-químicamente cada una de las muestras, y los resultados relacionados a las cantidades de compuestos nitrogenados fueron sometidos a pruebas estadísticas con un 95% de confianza aplicando el programa STATGRAPHICS CENTURION XVI con el objetivo de determinar si las variables escogidas tenían influencia sobre los mismos. De acuerdo a los análisis estadísticos efectuados, las variables con mayor significancia en la producción de compuestos nitrogenados son: la cantidad de microorganismo y temperatura; de los niveles tomados para la experimentación se determinó que los mejores resultados se obtuvieron para 1 g (cantidad de microorganismo) y una temperatura de 37° C.

Esta investigación pretende que en el futuro se siga profundizando para lograr la incorporación del lactosuero a procesos industriales de forma eficiente contribuyendo a disminuir la contaminación ambiental.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	ii
INDICE GENERAL.....	iv
ABREVIATURAS.....	vii
SIMBOLOGIA.....	viii
INDICE DE FIGURAS.....	ix
INDICE DE TABLAS.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
 CAPÍTULO 1	
1. GENERALIDADES.....	4
1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.2. Objetivos.....	5
1.2.1. Objetivo General.....	6
1.2.2. Objetivos específicos.....	6
1.3. Metodología de desarrollo.....	6
 CAPÍTULO 2	
2. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1. Lactosuero: Definición, composición y características.....	8
2.2. Producción de suero en la zona 5.....	32

2.3.	Contaminación ambiental por lactosuero	34
2.4.	Procesos tecnológicos convencionales para la extracción de la proteína del suero de leche.....	35
2.5.	Procesos tecnológicos alternativos para concentrar la proteína del suero	40

CAPÍTULO 3

3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
3.1.	Caracterización de la materia prima.....	51
3.2.	Caracterización del lactosuero fermentado.....	53
3.3.	Diseño experimental.....	54
3.4.	Descripción del proceso.....	56

CAPÍTULO 4.

4.	Análisis y discusión de resultados.....	60
4.1.	Resultados estadísticos de pruebas Físico-Químicas realizadas a la materia prima.....	60
4.2.	Resultados estadísticos de pruebas Físico-Químicas realizadas al productos final	63

CAPÍTULO 5.

5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	78
----	-------------------------------------	----

5.1. Conclusiones.....	78
5.2. Recomendaciones	80

APÉNDICES

ANEXOS

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

6-PG/PI	6 fosfogluconato/ fosfocetolasa
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ATP	Adenosín trifosfato
Aw	Actividad de Agua
BAL	Bacterias ácido lácticas
BCCA	Cadena de aminoácidos ramificados
DBO	Demanda Bioquímica de Oxígeno
DQO	Demanda Química de Oxígeno
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalizacion
MF	Microfiltración
MIPRO	Ministerio de Industrias y Productividad
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NF	Nanofiltración
NK	células natural killer
OI	Ósmosis Inversa
Rpm	Revoluciones por minuto
UF	Ultrafiltración
UFC	Unidades formadoras de colonia

SIMBOLOGÍA

°C	Grados Celsius
g	gramos
Kg	Kilogramo
mL	mililitros
Pa	Pascal
%	Porcentaje

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Esquema Básico del Fundamento Operativo de Sistemas de Separación por Membranas.....	36
Figura 2.2	Árbol Filogenético de los Géneros de BAL.....	41
Figura 2.3	Vía Homofermentativa de la Glucosa por BAL.....	44
Figura 2.4	Vía Heterofermentativa de la Glucosa por Bacterias Ácido Lácticas.....	45
Figura 2.5	Diagrama de los Sistemas Proteolíticos de Bacterias de Ácido Láctico.....	47
Figura 3.1	Diagrama de flujo de la experimentación	57
Figura 4.1	Curva de acidificación del proceso de fermentación.....	63
Figura 4.2	Diagrama de Pareto.....	71
Figura 4.3	Efectos principales para compuestos nitrogenados referidos a proteína.....	73
Figura 4.4	Diagrama de cajas.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Composición del Suero Dulce y el Suero Ácido INEN.....	11
Tabla 2	Requisitos microbiológicos para el suero de leche líquido... ..	12
Tabla 3	Composición en aminoácidos esenciales (g/100 g de proteína)..	22
Tabla 4	Propiedades de las proteínas del lactosuero.....	23
Tabla 5	Contenidos en vitaminas del lactosuero.....	25
Tabla 6	Selectividad por tamaño, ΔP como fuerza motriz, transferencia de materia en una fase líquida.....	37
Tabla 7	Diseño experimental (Parte 1).....	58
Tabla 8	Diseño experimental (Parte 2).....	58
Tabla 9	Conteos Celulares iniciales en Suero Lácteo Esterilizado.....	60
Tabla 10	Conteos Celulares iniciales en Suero Lácteo Esterilizado.....	61
Tabla 11	Composición del Suero Lácteo (%) (Valores promedio).....	62
Tabla 12	Composición del Suero Lácteo Fermentado (%) (Valores promedio).....	64
Tabla 13	Conteos celulares realizados en el lactosuero fermentado.....	65
Tabla 14	Análisis de varianza para la cantidad de compuestos nitrogenados referidos a proteínas.....	70
Tabla 15	Comparación de medias lactosuero sin fermentar y fermentado.	76

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador la escasa importancia que se le ha dado a la investigación y la falsa creencia de que la industria no se encuentra ligada a ésta ha provocado que la matriz productiva del Ecuador se vea delimitada por modelos externos que no necesariamente se adaptan a la realidad nacional, por la no utilización eficiente de subproductos con alto potencial nutritivo y cuyo desperdicio puede generar grandes impactos ambientales.

En la presente investigación se ha considerado al lactosuero, que es un subproducto resultante de los procesos artesanales e industriales en los cuales la leche es transformada en queso; este líquido de color amarillento es generado después de la separación de la cuajada y en este se encuentran gran cantidad de los más valiosos nutrientes de la leche entre los cuales se hallan proteínas que están implicadas en una variedad de efectos nutricionales y fisiológicos (22) (33) (46) (72) (84) (104).

Es de conocimiento general que el potencial nutricional, funcional y tecnológico del suero lácteo en la industria alimentaria del país es altamente infravalorado y por ende mal manejado; siendo el mismo vertido en las afluentes líquidas causando el aumento del DBO y el DQO de las mismas o esparcido en suelos poniendo en peligro la estructura física y química de los mismos, reduciendo los rendimientos de cultivos (15).

Frente a la problemática ambiental que acaece en el medio por el indebido manejo de este subproducto y también considerando los problemas de desnutrición que sufren los sectores más vulnerables del Ecuador; se planteó la siguiente hipótesis: “La fermentación del suero lácteo puede resultar una alternativa interesante para emplear el efluente lactosuero y proporcionar un valor nutricional agregado para en el futuro desarrollar alimentos funcionales”.

Por tal razón, en el presente trabajo se tiene como objetivo general: “Realizar un estudio preliminar empleando *Lactobacillus paracasei subs. paracasei*, utilizando suero lácteo como sustrato para la fermentación proveniente de una industria de la Zona 5 del Ecuador para en el futuro desarrollar alimentos funcionales”.

Para alcanzar el objetivo se realizó primero la caracterización de suero lácteo, y posteriormente se efectuaron corridas experimentales a nivel de laboratorio empleando suero lácteo como sustrato y microorganismo *Lactobacillus paracasei subs. paracasei*.

Es necesario señalar, que cada capítulo contenido en esta tesis, se encuentra estratégicamente planificado para lograr una mejor comprensión de la investigación realizada. En el primer capítulo se exponen las generalidades de este proyecto investigativo; las mismas que abarcan los

objetivos, hipótesis, planteamiento del problema y la metodología empleada. La segunda sección comprende el marco teórico del lactosuero y el microorganismo utilizado; posteriormente en el tercer capítulo se detallan los materiales y los métodos utilizados para el desarrollo de la experimentación. En el cuarto apartado se decidió realizar un análisis estadístico y una discusión de los resultados obtenidos en la experimentación y en el último capítulo se exponen las conclusiones y las recomendaciones.

Con esta investigación lo que se busca es promover la incentivación para el aprovechamiento productivo del efluente lactosuero que contamina el medio ambiente.

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES.

1.1. Planteamiento del Problema.

En el país la industria láctea es un importante sector de la economía siendo uno de sus productos más representativos el queso; que durante su elaboración tiene como residuo el lactosuero.

El suero de leche representa un problema de disposición en las industrias debido a la falta de conocimiento por parte de las mismas de su potencial nutricional y de la difícil accesibilidad a tecnologías que ayuden a su manejo y procesamiento; hecho por el cual este subproducto es generalmente descartado como efluente provocando consecuentemente graves problemas medio ambientales en suelos y agua debido a su alta demanda de oxígeno y elevado contenido de materia orgánica.

Debido al aumento de la presión a las industrias por parte de la sociedad que cada vez es más consciente de la importancia de la conservación del medio ambiente; sumado al hecho de que en el país existen sectores de bajo poder adquisitivo con elevados niveles de desnutrición, se ha planteado realizar este estudio preliminar el cual presenta una opción asequible para el futuro aprovechamiento del suero del queso en el desarrollo de alimentos funcionales. Esta investigación se realizó por medio del empleo de una bacteria ácido láctica denominada **Lactobacillus paracasei subs. paracasei** utilizando suero lácteo como sustrato para la fermentación proveniente de la industria privada, Chivería, que se encuentra dentro de la Zona 5 del Ecuador ; la misma que está integrada por las provincias del Guayas (excepto los cantones de Guayaquil, Samborondón y Duran), Los Ríos, Santa Elena, Bolívar y Galápagos

1.2. Objetivos.

1.2.1. Objetivo General.

Realizar un estudio preliminar del comportamiento del microorganismo **Lactobacillus paracasei subs. paracasei**

empleando suero lácteo como sustrato para en el futuro desarrollar alimentos funcionales.

Hipótesis

La fermentación del suero lácteo puede resultar una alternativa interesante para emplear el efluente lactosuero y proporcionar un valor nutricional agregado para en el futuro desarrollar alimentos funcionales.

1.2.2. Objetivos Específicos.

- Caracterizar suero lácteo procedente de la industria quesera privada, Chivería, perteneciente a la Zona 5.
- Realizar corridas experimentales a nivel de laboratorio empleando suero lácteo como sustrato y microorganismo ***Lactobacillus paracasei subs. paracasei.***
- Incentivar el aprovechamiento productivo del efluente lactosuero que contamina el medio ambiente.

1.3. Metodología de Desarrollo

La metodología empleada para desarrollar este estudio preliminar se llevó a cabo realizando como paso previo a cada una de las

experimentaciones la caracterización físico- química del lactosuero sin fermentar proveniente de la empresa Chivería, para tener conocimiento de la composición del mismo y compararlo con la bibliografía. Posteriormente se efectuaron corridas experimentales en laboratorio que respondían a un diseño experimental factorial 2^3 , en el cual se hizo uso de dos cantidades de microorganismo **Lactobacillus paracasei subs. paracasei** (0.6 g, 1.0 g) en 250 mL de suero lácteo, dos valores de agitación (80 rpm y 100 rpm) y dos diferentes temperaturas (30°C y 37 °C); cada una estas corridas se realizaron por triplicado y fueron físico-químicamente caracterizadas para determinar la cantidad de compuestos nitrogenados presentes en el suero del queso después de la fermentación realizada por el microorganismo. Se realizaron pruebas estadísticas que sirvieron para determinar si las variables escogidas en el diseño experimental tenían alguna influencia en la producción de compuestos nitrogenados en el suero del queso fermentado.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO.

2.1. Lactosuero: Definición, composición y características.

En la industria de los lácteos, durante la elaboración del queso, el principal subproducto generado es el lactosuero. El suero de leche, puede ser definido, como el líquido remanente que se produce luego de la separación de la cuajada al momento de la fabricación del queso o también al separar la caseína luego de la coagulación de ésta.

Finalizada la elaboración del queso éste tiende a retener aproximadamente el 80% de las proteínas de la leche las que son principalmente caseínas y el 20% restante permanece en el suero; por lo cual en su conjunto son denominadas proteínas séricas. El queso posee un 20% a 30% de grasa dependiendo de su tipo, sin embargo queda grasa remanente en el lactosuero. La cantidad de lactosa del suero de leche es similar a la concentración de lactosa

de la leche utilizada la elaboración del queso (36). Generalmente, la apariencia del suero es opaca y de coloración verde-amarilla (9) (31) (55) (57). A partir de 10 litros de leche se produce de 1 a 2 kg de queso y de 8 a 9 kg de suero de leche (10); existen principalmente dos tipos de suero: el suero “dulce” y el suero “ácido”.

Suero Dulce

El suero dulce se obtiene en la coagulación enzimática de la leche mediante el uso de enzimas proteolíticas o “cuajo”, que actúan sobre las caseínas de la leche y las “cortan”, provocando que éstas se desestabilicen y precipiten; dándose este fenómeno bajo condiciones específicas de temperatura (15-50°C), pH levemente ácido (5,9-6,6) producto de la incorporación de cultivos lácteos e iones calcio.

La enzima más utilizada para realizar esto, es la quimosina o renina, la cual es propia del aparato digestivo de los rumiantes, por tal razón, en la antigüedad esta enzima se obtenía a partir del estómago de estos animales. En la actualidad, esta enzima se produce a partir de una síntesis bioquímica (36).

Suero Ácido

Por otro lado, como se mencionó anteriormente está el suero “ácido”; el cual se genera por la precipitación ácida de la caseína que se realiza disminuyendo el pH de la leche a un valor de 4,5 a 4,6. A este pH, se alcanza el punto isoeléctrico de la mayoría de las caseínas presentes; lo cual produce que la micela de caseína se desestabilice y precipite, dejando en solución solamente las proteínas de tipo séricas (36).

Requisitos físicos y químicos para suero de leche líquido NORMA INEN 2594:2011 (52)

El suero de leche líquido ensayado, de acuerdo con las normas correspondientes, debe cumplir con lo establecido en la tabla 1.

TABLA 1
REQUISITOS FÍSICO-QUÍMICOS DEL SUERO DE LECHE
LÍQUIDO

Requisitos	Suero de leche dulce		Suero de leche ácido		Método de ensayo
	Min.	Máx.	Min.	Máx.	
Lactosa % (m/m)	--	5,0	--	4,3	AOAC 984.15
Compuestos nitrogenados, % (m/m) (1)	0,8	--	0,8	--	NTE INEN 16
Grasa Láctea, % (m/m)	--	0,3	--	0,3	NTE INEN 12
Ceniza, % (m/m)	--	0,7	--	0,7	NTE INEN 14
Acidez titulable, % (calculada como ácido láctico)	--	0,16	0,35	--	NTE INEN 13
pH	6,8	6,4	5,5	4,8	AOAC 973.41
(1)El contenido de compuestos nitrogenados es igual a 6.38 por el % nitrógeno total determinado					

Fuente: Norma INEN 2594: 2011

Se observa en la TABLA 1 los requisitos establecidos por la norma para los dos tipos de suero, siendo las únicas diferencias significativas entre ambos la acidez y el pH.

Requisitos microbiológicos. NORMA INEN 2594:2011 (52)

El suero de leche líquido ensayado de acuerdo con las normas correspondientes, debe cumplir con lo establecido en la tabla 2.

TABLA 2
REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL SUERO DE
LECHE LÍQUIDO.

Requisito	N	M	M	c	Método de ensayo
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos ufc/g.	5	30 000	100 000	1	NTE INEN 1529-5
Recuento de Escherichia coli ufc/g.	5	<10	-	0	NTE INEN 1529-8
Staphylococcus aureus ufc/g.	5	<100	100	1	NTE INEN 1529-14
Salmonella /25g.	5	Ausencia	-	0	NTE INEN 1529-15
Detección de Listeria monocytogenes /25g.	5	Ausencia	-	0	ISO 11290-1

Fuente: Norma INEN 2594:2011

Dónde:

n = Número de muestras a examinar

m = índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.

M = índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.

C = número de muestras permisibles con resultados entre m y M

Proteínas del suero

El suero contiene un multitud de proteínas y péptidos biológicamente activos; estos y otros componentes han formado la base para el uso del suero en aplicaciones medicinales durante los siglos XVII y XVIII (49). Además, de la principales proteínas del suero de leche (β -lactoglobulina y α -lactoalbumina) el suero contiene un numero de otras proteínas con potente bioactividad. Todas las proteínas del suero han estado implicadas por lo menos en una variedad de efectos nutricionales y fisiológicos, incluyendo rendimiento (i) físico, recuperación después del ejercicio y prevención de la atrofia muscular. (22) (33) (46) (72) (84) (104), (ii) saciedad y control del peso (72) (105) (106), (iii) Salud cardiovascular (72) (80), (iv) efectos anticancerígenos (18) (42) (66), (v) cuidado y reparación de heridas (86)(99), (vi) tratamiento de las infecciones (18) (81) (85), (vii) nutrición infantil (24) (48), y (viii) envejecimiento saludable (98).

β -Lactoglobulina

Conforma aproximadamente el 48-58% del contenido de la proteína de suero de leche. Es una proteína cuya solubilidad en agua pura es nula. La molécula está constituida por una única cadena polipeptídica de 162 residuos de aminoácidos con dos puentes disulfuro y un grupo tiol libre. Se conocen cuatro variantes genéticas de esta proteína (A, B, C y D) en las razas bovinas. La β -Lactoglobulina es una molécula muy compacta cuya cadena está fuertemente plegada (106). El papel biológico específico de esta proteína es desconocido, pero se tiene conocimiento de que liga minerales por ejemplo (zinc, calcio, etc.), a vitaminas solubles en grasa por ejemplo (vitamina A y E), y a lípidos y por consiguiente es importante para varios procesos fisiológicos. Contiene una concentración alta de BCAA. La β -Lactoglobulina es secretada en leches de rumiantes con alta resistencia a la digestión gástrica, lo cual provoca intolerancia y/o alergenicidad en los seres humanos, sin embargo, gracias a tratamientos industriales como la esterilización, el calentamiento o la presión hidrostática alta y la hidrólisis se ve mejorada la digestibilidad de esta proteína del lactosuero (71).

α -Lactoalbúmina

Forman el 13-19% de la proteína de suero. Es una proteína muy soluble en agua a pH 6, pero mucho menos soluble en la zona de pH 4 - 4.6. La composición en aminoácidos así como la secuencia de la molécula de α -Lactoálbumina son hoy conocidas. Su única cadena peptídica está constituida por 123 residuos de aminoácidos con 4 puentes disulfuro. Su estructura ha sido comparada a la de la lisozima, aunque las dos proteínas provienen de la duplicación de un gen ancestral que se vio afectado en el momento del paso de los reptiles a los mamíferos. Se sabe en efecto que la α -Lactoalbúmina no existe más que en los mamíferos mientras que la lisozima parece encontrarse muy difundida en las especies animales; puede pensarse que la aparición de la α -Lactoalbúmina está ligada a la diferenciación de la glándula mamaria. El papel biológico de la α -Lactoalbúmina ha sido descubierto recientemente y se sabe que interviene en la biosíntesis de la lactosa, de la cual se sabe que está bajo el control de tres enzimas, uno de las cuales, la lactosa sintetasa, está constituida por dos subunidades proteicas A y B. La proteína B no es otra que la α -Lactoalbúmina (106). En recientes investigaciones, se ha encontrado que esta proteína ayuda a proteger el organismo contra infecciones, es ansiolítica ya que regula la neurotransmisión serotoninérgica y por ende disminuye el

cortisol (64), ayuda a mejorar la falta de atención incrementando la biodisponibilidad del triptófano en plasma, e inhibe organismos enteropatógenicos (E Coli, Salmonella). Brinda protección frente a **Klebsiella pneumoniae**, es agonista opioide (67), antihipertensiva (94), y anticancerígena. Al ser inyectada intratumoralmente se ha demostrado que es capaz de matar células cancerígenas del glioblastoma, induciendo la apoptosis sin afectar a las células sanas. Este mismo fenómeno ha sido demostrado en otros 40 tipos de cáncer. Se ha encontrado que esta proteína tiene efectos destacados sobre la composición corporal en modelos animales: en una investigación se alimentó ratas obesas con aislados de proteína de suero, α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina o lactoferrina; las ratas que perdieron más peso y más porcentaje de grasa fueron aquellas que recibieron α -lactoalbúminas y lactoferrina (95).

Albúmina Sérica Bovina

Es una que se identifica con la seroalbúmina sanguínea. Es muy soluble en agua. Su molécula contiene un grupo tiol y 17 puentes disulfuro intrapeptídicos (106). Representa el 6% de la proteína de suero. No se ha estudiado mucho su potencial bioactivo. Se ha descubierto, que en cultivos de células de cáncer de mama impide

el desarrollo tumoral, además de inhibir la genotoxicidad en un modelo de exposición inducida mediada por carcinógenos (59).

Inmunoglobulinas

Constituyen el 8-12% del lactosuero. Esta proteína es producida en respuesta ante una determinada carga microbiana, formando de esta manera una defensa especializada que se encarga de identificar patógenos. Las inmonuglobulinas son proteínas monoméricas (IgG) diméricas (IgA) o pentaméricas (IgM). Estas se caracterizan por sobrevivir a la digestión llegando a alcanzar el intestino y son altamente efectivas neutralizando bacterias, virus y otros microorganismos patógenos con anticuerpos específicos (106).

Lactoferrina

La lactoferrina o lactotransferrina está constituida por una proteína con una única cadena polipeptídica, contiene glúcidos (7%) hierro (0,1%) y cistina (5%). La lactoferrina puede fijar reversiblemente el hierro adquiriendo una coloración rosa que se desarrolla dependiendo de la cantidad de hierro conjugado. La fijación de hierro por la transferrina es fuertemente dependiente del pH y de la presencia iones carbónicos.

Se encuentra en la proteína de suero en proporciones del 2%. Debido a su capacidad esta tiene propiedades antimicrobianas, antivíricas y antibacterianas, ya que los organismos patógenos suelen tener requerimientos de hierro para su propagación. Robustece la función inmune innata y adaptativa, y regula la respuesta inflamatoria en artritis infecciosa y autoinmune disminuyendo la inflamación articular. Modula la respuesta oxidativa (1), y previene la sepsis, es antimicrobiana, bactericida Gram+ y Gram-, antivírica, antimicótica y antitumoral (65) (66). En una investigación realizada en 2009 se llegó a descubrir que en recién nacidos con bajo peso la administración de esta proteína reduce el riesgo de sepsis, que afecta al 20% logrando disminuir este porcentaje de incidencia hasta el 6%. En varios estudios se ha logrado demostrar su capacidad de inhibir tumores; entre ellos la disminución del desarrollo y metástasis de tumores de colon, pulmones y esófago en ratas expuestas a cancerígenos químicos, además acelera la reconstitución de la respuesta inmune en ratones expuestos a inmunosupresión quimioterápica (7). Estimula la respuesta inmune de las células asesinas NK, retrae el virus de la hepatitis C y regula la respuesta fagocitótica de células macrófagos. Es necesario también mencionar que la lactoferrina ayuda mejorar la respuesta inmune en pacientes post quirúrgicos (107), aumenta

el colesterol HDL y reduce los niveles de triglicéridos, retardando de esta manera la acumulación de lípidos en el hígado (102).

Glicomacropéptido

Esta proteína es un glicopéptido C-terminal que se separa de la molécula de kappa caseína por actividad de la quimosina mientras se da la precipitación de las caseínas durante la elaboración del queso. El glicomacropéptido se caracteriza por ser una proteína hidrofílica y se encuentra en suspensión en la fracción del suero mientras que la sección restante de la K-caseína se precipita para formar parte del cuajo. El glicomacropéptido engloba un 50 a 60% de carbohidratos en su composición (galactosa, N-acetil-galactosamina y ácido N- neuramínico). Es especialmente abundante en aminoácidos de cadena ramificada y deficiente en metionina y no contiene fenilalanina. Conformar el 12-20% de la composición del suero. Tiene la particularidad de adherirse a enterotoxinas inhibiendo de esta manera la adhesión vírica y bacteriana, demostrando eficacia frente a E.Coli y cólera (71). Se ha probado en modelos animales y su administración demostró que ayuda a mejorar el desarrollo cognitivo (20). Regula la respuesta inflamatoria en ratas con colitis (27). Además estimula la síntesis de colecistoquinina, señal que regularizadora del apetito provocando

por tanto un efecto saciante. Induce el desarrollo de flora bacteriana beneficiosa en el intestino y también posee actividad antitrombótica e inmunomoduladora (78).

Lactoperoxidasa

La lactoperoxidasa constituye el 0.5 % de las proteínas del suero lácteo. Es una metaloproteína bioactiva que fija el hierro. Es parte del sistema bactericida (106), su acción en bacterias que causan deterioro en la leche ha sido investigada y se ha determinado que tiene la particularidad de inhibir bacterias gram-positivas y de causar la muerte en bacterias gram-negativas (41).

Fracción Proteosa-Peptónas

Es la fracción de las proteínas de la leche que no se precipitan por el calentamiento a 95°C en un tiempo de 30 minutos posteriormente seguida de la acidificación a pH 4,6. Suele representar aproximadamente el 10% de las proteínas del lactosuero. Es muy heterogénea y aun no se encuentra perfectamente definida. Abarca principalmente 4 componentes, denominados componentes 3, 5, 8 rápido y 8 lento. El componente 3 se caracteriza por encontrarse exclusivamente en el suero lácteo. Es abundante en hexosas (7%), hexosaminas (6%) y ácido siálicos, pero pobre en fósforo (0.5%).

Las otras proteasas-petónas, tienen en menos abundancia de glúcidos y ácido siálico pero son más ricas en fósforo; estas suelen encontrarse tanto en lactosuero como en las micelas (106).

Calidad proteica del suero lácteo

Como anteriormente se mencionó, las proteínas del lactosuero suelen desempeñar un papel nutritivo importante ya que son una rica y balanceada fuente de aminoácidos esenciales (46) (51); además estas proteínas son de elevado valor biológico (son ricas en leucina, triptófano, lisina y aminoácidos azufrados), tienen una calidad equivalente a las proteínas del huevo y no presentan deficiencias de ningún aminoácido. Esto puede ser observado en la TABLA 3 en la cual se compara el contenido de aminoácidos del lactosuero con respecto al huevo, pudiendo observar que la leucina y la lisina son aminoácidos que se encuentran en mayor proporción (12).

TABLA 3
COMPOSICIÓN EN AMINOÁCIDOS ESENCIALES (G/100 G
DE PROTEÍNA)

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

Fuente: (Linden *et al.*, 2012)

Proteínas del Lactosuero en la Industria Alimentaria

Las proteínas del suero son utilizadas en muchas aplicaciones en la industria alimentaria por su funcionalidad y valor nutritivo (87); sus usos se dan en una gran variedad de alimentos debido a sus excelentes propiedades gelificantes y emulsificantes, siendo la β -lactoglobulina uno de los mayores agentes gelificantes (2) (100). Los geles de la proteína del suero de leche pueden ser utilizados como hidrogeles de pH-sensitivos, los cuales son redes

tridimensionales que tienen la habilidad de hincharse en agua y logran retener una fracción significativa de la misma en el interior de esta estructura (45). Las proteínas del lactosuero favorecen propiedades funcionales tales como la como solubilidad (51), la emulsificación, la retención de agua/grasa, son un excelente espumante, espesantes y tienen buenas propiedades de gelificación; estas cualidades hacen de este subproducto un interesante ingrediente alimenticio (44).

TABLA 4
PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO.

Propiedades	Proteínas del lactosuero
Hidratación	Capacidad de retención de agua que se incrementa con la desnaturalización de proteína
Solubilidad	Insolubles a pH 5 si son termodesnaturalizados
Gelificación	Gelificación térmica desde 70 °C: influencia de pH y sales
Viscosidad	Soluciones no tan viscosas excepto si son termodesnaturalizadas
Propiedades emulsificantes	Excelentes propiedades emulsificantes excepto a pH 4.5 si es termodesnaturalizada
Retención de sabores	Retención muy variable a la desnaturalización
Propiedades espumado	Excelente estabilidad espumante

Fuente: (Hui, Y. 2012)

Carbohidratos del lactosuero

La lactosa es el carbohidrato que en mayor cantidad se encuentra en la leche. Además otro tipo de azúcares que también son hallados pero en mínimas cantidades; son los denominados poliósidos, que incluyen fucosa y glúcidos nitrogenados (101). Durante la fabricación del queso, un 95% de la lactosa suele perderse en el lactosuero (37); siendo la proporción de la lactosa en el mismo del 4,5-5% m/v. La hidrólisis enzimática también es posible. Algunas levaduras y numerosas bacterias poseen una lactasa que puede provocarla. La evolución más frecuente y a la vez, más importante, es su transformación en ácido láctico la cual es llevada a cabo por las bacterias lácticas (101).

Según el tipo de microorganismos presente, la lactosa sufrirá fermentaciones, que producirán diferentes productos secundarios (31) (56) (101).

Vitaminas

El lactosuero posee un contenido vitamínico significativo, especialmente en vitaminas del complejo B y de ácido ascórbico. En el subproducto investigado, las vitaminas liposolubles suelen ser muy escasas debido a que carece de materia grasa suficiente (10) (43).

TABLA 5
CONTENIDOS EN VITAMINAS DEL LACTOSUERO.

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

Fuente: (Linden *et al.*, 2012)

Productos alimentarios que usan lactosuero

En los últimos años debido al crecimiento del sector industrial quesero en el mundo y al aumento de la contaminación ambiental por el deshecho del lactosuero; la industria empezó una concientización y ahora busca aprovechar las bondades nutricionales que ofrece este subproducto, desarrollando de esta manera una diversidad de productos.

Fórmulas Infantiles

El desarrollo de sustitutos de leche materna forma una parte integral en la historia de la pediatría. Aún no han sido desarrolladas fórmulas pediátricas que tengan la capacidad de igualar las propiedades inmunológicas y la digestibilidad de la leche materna, las fórmulas infantiles durante muchos años han sido sometidas a un sin número revisiones (79).

En la actualidad, el objetivo principal de la industria que se dedica a elaborar fórmulas infantiles, no ha sido el imitar la sorprendente complejidad de la leche humana por medio de preparaciones industriales de leche de vaca. De hecho su objetivo es fabricar el segundo mejor alimento disponible logrando identificar las diferencias de mayor peso entre la leche humana y las formulas infantiles. Este hecho ha dado como resultado, que algunos fabricantes de fórmulas infantiles hayan preferido enriquecer sus formulaciones a base de leche de vaca complementándola con proteínas de suero, esto se debe a que en la leche humana predomina la proteína del suero y en la leche de vaca predomina la caseína. La proporción del suero: caseína de la leche materna es 60:40 y en la leche de vaca es 18:82 o 20:80 (62).

Lácteos

El lactosuero es usado para la fabricación de una gran variedad de productos lácteos, dentro de los cuales están bebidas fermentadas de gran valor nutritivo, que tienen la propiedad de rehidratar y tienden a ser menos ácidas que los jugos de frutas. Además de lo anteriormente mencionado, la industria también se dedica a elaborar quesillos con este subproducto que no son más que un queso de pasta hilada (76). Es necesario mencionar que generalmente los quesos son elaborados por razones de preservación, versatilidad, conveniencia y reducción de costos, el lactosuero en forma de polvo o concentrados de proteína de lactosuero (WPC) son incorporados dentro del proceso del queso para aumentar el rendimiento (4) (60) (50).

Alimentos dietéticos

Las proteínas del lactosuero son una fuente dietética de una gran variedad aminoácidos esenciales de absorción rápida y que ayudan a elevar los aminoácidos plasmáticos; lo cual brinda las bases para preservar y recuperar la masa muscular, la fuerza y mejorar rendimiento atlético (109). El suero del queso también contribuye a mejorar el metabolismo de las grasas, limpiando la sangre de toxinas y permitiendo que fluya mejor la misma; además

favorece la eliminación de los líquidos retenidos por su efecto depurativo y laxante. Es por esta razón que de ahí se comprende que ayuda a las personas obesas o con sobrepeso (6) fenómeno por el cual se han desarrollado una gran variedad de alimentos a base de suero que ayuden a complementar la dieta.

Alimentos funcionales

En la modernidad cada vez se ha acrecentado un interés de parte del consumidor en la prevención de enfermedades o en la mejora de la salud en general (16); debido a este hecho se ha empezado a emplear lactosuero para elaborar alimentos que además de nutrir, mejoren el bienestar de la salud en general(físico, mental y social). Se entiende por bienestar físico a la capacidad para realizar cualquier tipo ejercicio y en esto contribuye el consumo del lactosuero mediante la preservación y recuperación de masa muscular (109). El bienestar mental comprende el estado emocional y la autoaceptación de la persona; el lactosuero beneficia al mismo gracias a las propiedades del triptófano que contribuye la α -lactoalbúmina ya que este elemento estimula la producción de serotonina (un neuro transmisor deficitario en cuadros de depresión) (6); de la mano al bienestar mental va el bienestar social.

Farmacéuticos

El azúcar que se encuentra en mayor abundancia en el lactosuero es la lactosa. La lactosa por sus características físico-químicas es utilizada como un buen excipiente en el área farmacéutica, lo que quiere decir que esta puede ser usada como recubrimiento de fármacos (36).

Cárnicos y pescadería

El lactosuero es utilizado como extensor cárnico de costo económico (3); esto quiere decir que es un subproducto de la industria quesera, rico en proteínas de elevado valor biológico con la capacidad de sustituir proporciones variables correspondientes a la carne sin que ello necesariamente signifique afectar la calidad nutricional del producto finalmente obtenido. Desde hace algún tiempo en la industria cárnica ha incrementado el interés de utilizar materias primas que equilibren el bajo costo con una la elevada calidad proteica, todo esto con el fin de apoyar la seguridad alimentaria (73). Además de todo lo anteriormente mencionado; el lactosuero contribuye a mejorar el sabor, la palatabilidad y la retención de agua en estos productos (3).

Panadería

El lactosuero en la elaboración del pan puede ser utilizado como un reemplazo del agua; de esta manera se ven beneficiados los gastos de agua y se agregan valiosos nutrientes al producto. En la actualidad, se ha empezado a utilizar en mayor medida el suero en polvo, el cual es añadido a la harina durante la elaboración del pan, generando un pan más nutritivo cuyas propiedades organolépticas son distintas a las del pan tradicional (36).

Confitería

El lactosuero es un subproducto lácteo de bajo costo (25 a 40% menos del precio de sólidos no lácteos no grasos) en la industria confitera. En la mayoría de productos de confitería se usa hasta un 3% de lactosuero dulce en polvo y por lo menos el 10% de lactosa. Además gracias a las propiedades gelificantes que poseen las proteínas del lactosuero, sobre todo la β -lactoglobulina; se ha empezado a utilizar en el procesamiento de jaleas y mermeladas (34).

Snacks y cereales

Los beneficios nutricionales que ofrece el lactosuero y un mercado cada vez más interesado en el bienestar de la salud; ha contribuido

al hecho de que la proteína del lactosuero sea añadido a snacks crujientes y cereales. Este proceso se realiza extruyendo las proteínas nativas del suero combinadas con carbohidratos hasta formar los snacks crujientes (34).

Películas y recubrimientos comestibles

Estas películas son utilizadas para proporcionar una alta calidad y productos alimenticios seguros. Las películas y recubrimientos comestibles elaborados en base a proteínas han incrementado la curiosidad en los últimos años; esto se debe a sus propiedades funcionales y características nutricionales (74).

La proteína del suero de leche tiene la particular habilidad de crear películas que son insolubles en H₂O (17) además de formar una barrera selectiva para humedad, gases y migración de solutos (38); y además es un excelente transportador de ingredientes funcionales tales como antioxidantes, agentes antimicrobianos, especies, colorantes, sabores y olores, lo mismo que contribuyen a la funcionalidad de materiales de empaquetamiento (108). Estas películas tienen la característica de ser transparentes lo cual brinda ciertas propiedades mecánicas (89). Además algo importante en estas películas y recubrimientos es que son enteramente

biodegradables y pueden ser utilizadas en varios tipos de alimentos (77), (78).

2.2. Producción de suero lácteo en la zona 5 del Ecuador

De acuerdo con los últimos levantamientos de información de la industria quesera del país, anualmente son producidos 4.6×10^8 litros de suero lácteo; y específicamente en la zona 5, en la cual se centra la investigación existe una producción estimada de 2,5 millones de litros de lactosuero (68).

Situación Actual del Lactosuero en el Contexto Nacional

En el Ecuador durante mucho tiempo el consumo de suero lácteo no ha sido bien empleado inclusive ha sido utilizado como adulterante; derivando así en el desperdicio de enormes cantidades de este subproducto. En la actualidad este hecho está cambiando, habiendo empresas que utilizan suero pulverizado e importado, además de la reciente introducción de una bebida a base de esta sustancia elaborado por Reybanpac (29).

Uso ilegal

Se encuentra asociado generalmente con la adulteración de leche cruda o procesada (68). En el año 2010 se estima que más de

100.000 litros diarios de leche fueron mezclados con este sub producto y vendidos en ciudades y poblaciones ecuatorianas, a personas de escasos recursos a las que se les engaña con un valor menor al litro de leche de calidad, producido por algunas industrias conocidas (96).

Uso legal

Ampliamente permitido en todo el mundo como materia prima o ingrediente de productos alimenticios, farmacéuticos y cosméticos (108).

Normas técnicas relacionadas con la industrialización del suero

El INEN ha implementado una serie de normas que se acoplan de acuerdo al lactosuero como materia prima y a sus productos finales:

- NTE INEN 2585:2011 Suero de leche en polvo. Requisitos
- NTE INEN 2594:2011 Suero de leche líquido. Requisitos
- NTE INEN 2609:2012 Bebidas de suero. Requisitos
- NTE INEN 2584:2013 Norma general para quesos de suero y quesos de proteínas de suero. Requisitos

2.3. Contaminación ambiental por lactosuero

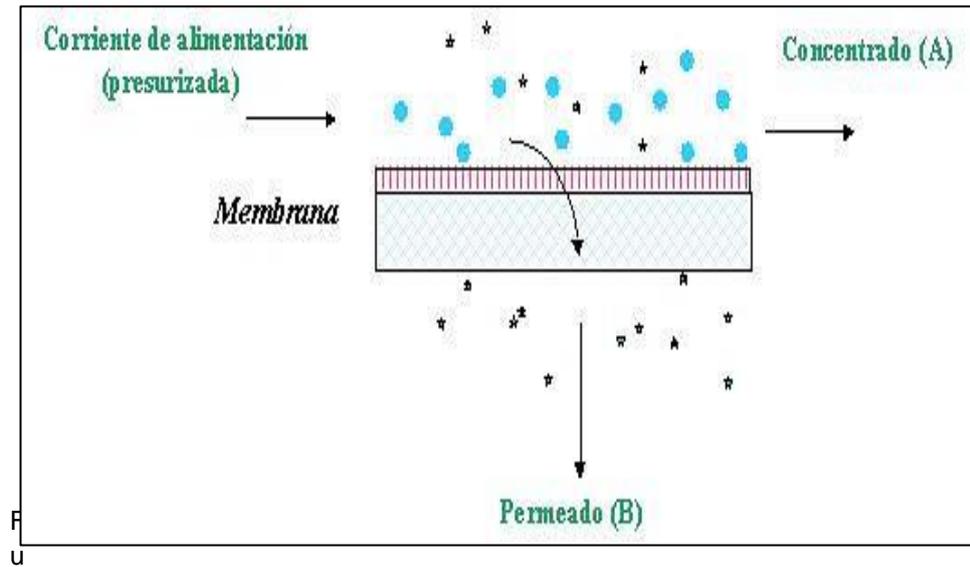
“Una industria quesera que produzca diariamente 400.000 litros de suero sin depurar, está produciendo una contaminación diaria similar a una población de 1.250.000 habitantes” (92). Lo cual resulta en una pérdida de una fuente alimentaria; causando problemas graves de contaminación ya que el suero del queso contiene una elevada carga orgánica con valores de DBO de 40 000- 60 000 mg/L y DQO 50 000-80 000 mg/L. (15) (35).

Generalmente más del 90% de la DBO y DQO del suero de leche proviene de la lactosa del mismo (57) (63). Así de esta manera, el problema de la disposición del lactosuero ha ido empeorando debido a que la continua descarga de este subproducto no solo en fuentes acuíferas; sino también en el suelo llegando a poner en peligro la estructura física y química del mismo, disminuyendo los rendimientos de los cultivos y consecuentemente también provocando serios problemas de contaminación de las fuentes de agua subterránea (15).

2.4. Procesos Tecnológicos Convencionales para la Extracción de la Proteína del Suero de Leche.

Tecnología de membranas

Los procesos de tecnología de membrana están basados en la separación que ejerce una membrana sobre una mezcla líquida de composición compleja; esta acción se lleva a término mediante el uso de la presión, la misma que provoca el paso de especies químicas con la capacidad de atravesar los poros de la membrana (Figura 2.1). Generalmente es realizada una filtración tangencial, por la cual el fluido circula paralelamente a la interfase, con el objetivo de impedir la colmatación de las membranas y prolongar su vida media. Al final de este proceso son obtenidas dos corrientes líquidas: el permeado o agua filtrada y el concentrado (103).



Fuente: (Portal Lechero, 2013)

FIGURA 2.1 ESQUEMA BÁSICO DEL FUNDAMENTO OPERATIVO DE SISTEMAS DE SEPARACIÓN POR MEMBRANAS

El tamaño de poro de las membranas es uniforme, igual al peso molecular de una molécula patrón a partir de la cual se produce la retención de más del 95% del soluto. De acuerdo al tamaño del poro, los procesos se clasifican de mayor a menor tamaño como microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa (TABLA 6).

TABLA 6
SELECTIVIDAD POR TAMAÑO, ΔP COMO FUERZA MOTRIZ,
TRANSFERENCIA DE MATERIA EN UNA FASE LIQUIDA (88)

Proceso	Membrana	Rango de ΔP	Especies retenidas
MF	Porosas 0.1 – 5 mm	$0.1 \times 10^5 - 3 \times 10^5$ Pa	Células, bacterias, hongos, almidón, gránulos, glóbulos de aceite, etc...
UF	Porosas 5 – 100 nm	$1 \times 10^5 - 10 \times 10^5$ Pa	Polisacáridos, proteínas, taninos, virus, etc.
NF	Porosas 1 – 5 nm	$10 \times 10^5 - 50 \times 10^5$ Pa	Azúcares, ácidos orgánicos, polifenoles, compuestos aromáticos, etc.
OI hiperfiltración	No porosas	$10 \times 10^5 -$ 100×10^5 Pa	Sales

Fuente: (Rúales Jenny, 2014)

Microfiltración (MF)

La microfiltración (MF) se caracteriza por utilizar membranas porosas de 0.1-5 mm y un rango de presión de $0.1 \times 10^5 - 0.3 \times 10^5$ Pa (88), con un parámetro de corte de 8.3×10^{-23} a 8.3×10^{-22} kg. Aquí se producen la retención de grasas y proteínas del suero con peso molecular alto más no de proteínas de suero pequeñas, nitrógeno no proteico (NPN), lactosa y minerales de un peso molecular menor. Este proceso es aplicado en la remoción de grasa para la

producción de WPI (aislados de proteína de Suero): Las limitaciones en la remoción de grasa del suero por separación mecánica da como resultado un alto nivel de concentrados de proteína de Suero (WPC) altos en grasas. Este nivel alto de grasas limita el contenido máximo de proteína en el polvo final de WPCs, por lo general de 80-84% dependiendo de la calidad del material alimentado (103).

Ultrafiltración (UF)

La ultrafiltración (UF) se caracteriza por el uso de membranas de 5-100 nm y presión de 1×10^5 - 10×10^5 Pa. (88) además de poseer un rango de corte de peso molecular (MWCO) de 4.9×10^{-24} a 1.6×10^{-22} kg. En este proceso se fraccionan y se retienen la grasa y proteínas del suero con un peso molecular alto, además de nitrógeno no proteico (NPN), lactosa y minerales de un peso molecular menor. Se utiliza para la producción de concentrados de proteína de suero del 70% al 85%. Se requiere la remoción de grasa por microfiltración dependiendo de las características del producto alimentado. Se requiere Diafiltración (97).

Nanofiltración (NF)

La nanofiltración (NF) se caracteriza por el uso de membranas de 1-5nm y presión de 10×10^5 - 50×10^5 Pa; además de poseer un rango de corte de peso molecular (MWCO) menor de 1.6×10^{-25} a 1.6×10^{-24} kg. La membrana de la NF retiene todos los solutos salvo los iones cargados monovalentes. El permeado es agua, sales monovalentes y algunos ácidos orgánicos que imitan la estructura tetraédrica del agua (103).

Osmosis inversa (OI)

La Ósmosis Inversa (OI) se caracteriza por el uso de membranas no porosas y una presión de 10×10^5 - 100×10^5 Pa; tiene un rango de corte de peso molecular (MWCO) menor a 3.32×10^{-25} kg. La membrana de la OI retiene los solutos del suero. El permeado es agua y ciertos ácidos orgánicos que imitan la estructura tetraédrica del agua. Con las membranas de Ósmosis Inversa, se puede obtener un máximo del 20% de sólidos totales en la concentración de suero y de permeados de UF (103).

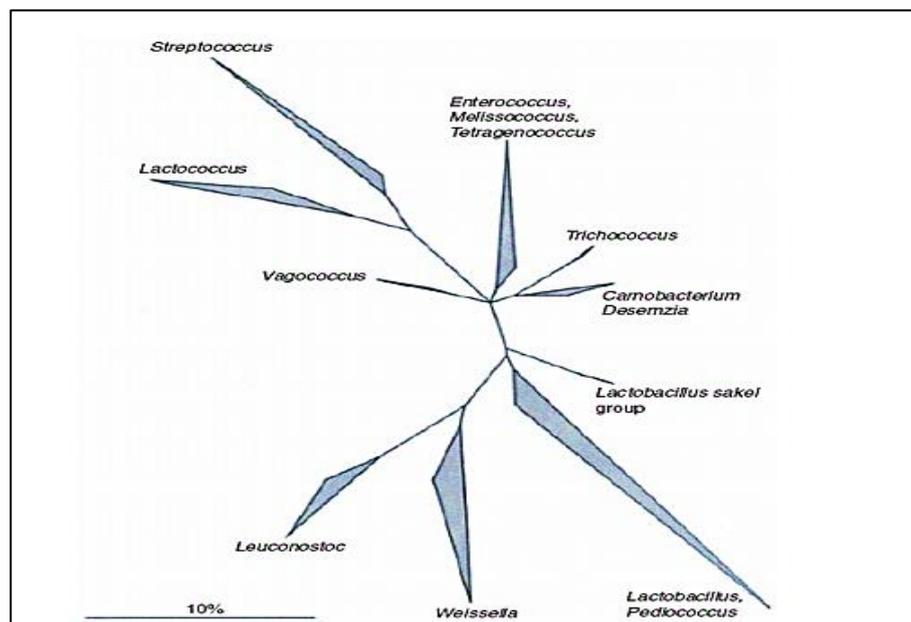
2.5. Procesos tecnológicos alternativos para concentrar la proteína del suero

En las últimas décadas, se han buscado alternativas de bajo costo para concentrar la proteína del suero, ya que el uso de procesos tecnológicos convencionales más específicamente el de tecnología de membranas no resulta viable económicamente para el pequeño y mediano productor debido a los elevadísimos costos de inversión inicial; citando un ejemplo una planta de secado de suero con un procesamiento de 300.000 litros por día estaría costando aproximadamente U\$ 11.000.000 (23). Dentro los procesos tecnológicos alternativos, que están abriéndose paso en cuanto a la concentración de la proteína del suero se encuentra su fermentación por bacterias ácido lácticas; este estudio específicamente tratara sobre la fermentación del lactosuero por ***Lactobacillus paracasei ssp. paracasei***.

Importancia de las bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas han sido importantes en los alimentos por siglos por su considerable contribución al valor de los productos. Debido a varias de sus propiedades metabólicas, las bacterias lácticas desempeñan un papel importante en la industria alimentaria por su contribución significativa al sabor, olor, textura,

características sensoriales, propiedades terapéuticas y valor nutricional de los productos alimentarios (76). De acuerdo a la filogenética las BAL han sido divididas en doce géneros, siendo los mismos: **Lactobacillus**, **Lactococcus**, **Leuconostoc**, **Streptococcus**, **Pediococcus**, **Vagococcus**, **Enterococcus**, **Aerococcus**, **Tetragenococcus**, **Carnobacterium**, **Alloicoccus** y **Weissella**. Estos géneros se encuentran taxonómicamente en el phylum Firmicutes, en la clase Bacilli, orden Lactobacillales (57) (70). En la investigación se utilizará una bacteria proveniente del genero Lactobacillus.



Fuente: (Hammes W, et al., 2011)

**FIGURA 2.2 ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LOS GÉNEROS DE
BAL**

Fermentación del lactosuero por *Lactocillus paracasei ssp. paracasei*.

Lactobacillus paracasei subs. paracasei es un microorganismo Gram-positivo, no esporulado, no pigmentado, catalasa negativo (21). Una de las características taxonómicas más destacadas del género lactobacillus es su forma de bastón. *Lactobacillus paracasei subs. paracasei* es un microorganismo microaerofílico, cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra en un rango de entre 15 y 45°C (8) (63) (60), este lactobacillus puede crecer bien en medios ligeramente ácidos con pH inicial de 6.4 a 4.5 y con un óptimo desarrollo entre 5.5 y 5.8. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores de 3,6 (14).

El *Lactobacillus paracasei subs. paracasei* presenta una forma de bastón con un tamaño de entre 0.7-1.1 x 2.0-4.0 µm, es resistente a medios ácidos, no posee la capacidad de sintetizar porfirinas y su principal producto metabólico es el ácido láctico. Dentro de sus requerimientos nutricionales se encuentran la necesidad de la presencia de riboflavina, ácido fólico, pantotenato de calcio y factores de crecimiento de niacina (8) (54).

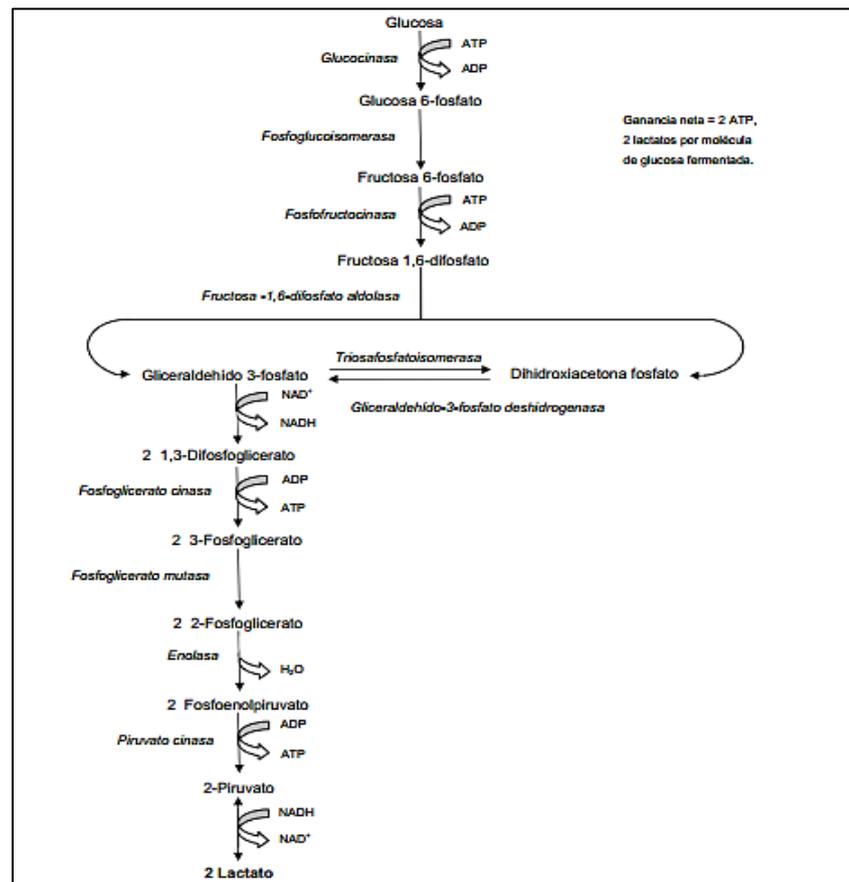
El metabolismo de este microorganismo al igual que el resto de las BAL es fermentador y de acuerdo a los productos finales del mismo;

sean solo ácido láctico u este acompañado de otros compuestos se puede decir que ha tomado la vía metabólica de la glucólisis o la vía metabólica de la 6-fosfogluconato/fosfocetolasa; esto quiere decir que este microorganismo es heterofermentativo facultativo (21). De acuerdo a las dos vías de fermentación antes mencionadas, es necesario explicar lo que es un microorganismo heterofermentativo facultativo.

Un microorganismo heterofermentativo facultativo es aquel que tiene la peculiaridad de poder utilizar tanto la vía metabólica de las BAL homolácticas como la de las heterolácticas siendo homofermentativo su principal metabolismo. Al modificar ciertas condiciones en el medio de cultivo, tales como la concentración de glucosa y la restricción de determinados nutrientes, se puede inducir la fermentación por la vía 6-PG/PK provocando de esta manera la fermentación heteroláctica (53) (8).

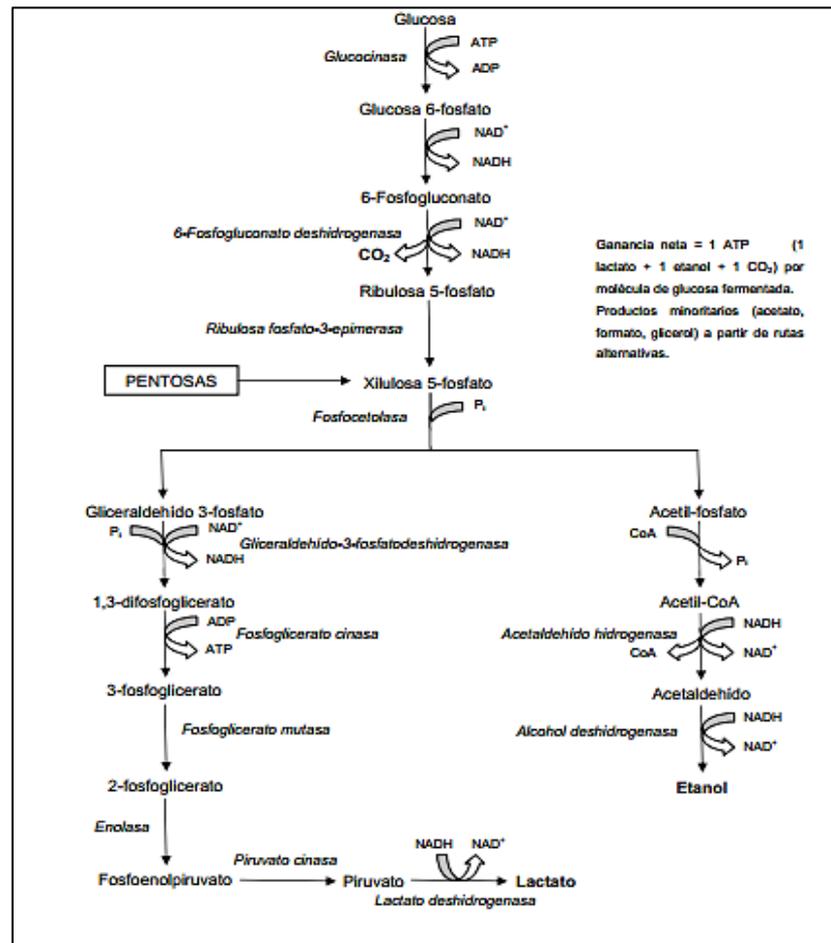
Esta transformación no se atribuye a que el metabolismo de los azúcares se desvíe hacia la vía 6-fosfogluconato/fosfocetolasa, sino que se observa un cambio en la manera en la que se metaboliza el piruvato; ya que hay una menor producción de lactato y el resto de piruvato es convertido a acetil-CoA. En condiciones de escasas

de nutrientes la concentración de intermediarios catabólicos de azúcares es elevada y el piruvato es metabolizado a etanol y acetato, esto sucede como una adaptación que logra permitir un uso más eficiente de la cantidad limitante de azúcar (28).



Fuente: (Axelsson Lars, 2012)

**FIGURA 2.3 VÍA HOMOFERMENTATIVA DE LA GLUCOSA
POR BAL**



Fuente: (Fuente: (Axelsson Lars, 2012)

FIGURA 2.4 VÍA HETEROFERMENTATIVA DE LA GLUCOSA POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

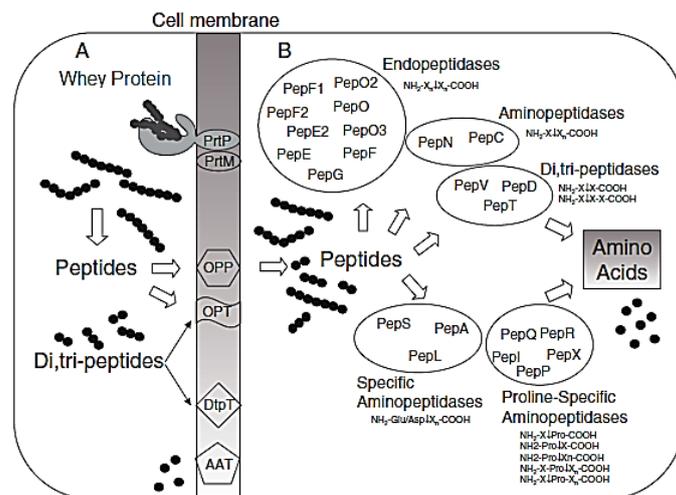
Como se observa en las figuras 2.3 y 2.4, la diferencia entre la vía metabólica de la glucólisis y de la 6-fosfogluconato/fosfoacetolasa está dada por la ausencia o presencia de la enzima aldolasa. Las BAL heterolácticas suelen carecer de esta aldolasa y por ende no pueden romper la fructosa 1,6-difosfato; en cambio, oxidan la

glucosa 6-fosfato a 6-fosfogluconato y posteriormente lo descarboxilan hasta xilulosa 5-fosfato que se divide en gliceraldehído 3-fosfato y acetil-fosfato mediante la fosfoacetolasa. El gliceraldehído 3-fosfato posteriormente se convierte en ácido láctico con la producción de una molécula de ATP (Adenosina trifosfato), entretanto que el acetil-fosfato acepta electrones del NADH que se ha formado durante la generación de la xilulosa 5-fosfato, produciendo directamente a etanol sin producir ATP. Es por tal razón, que las BAL heterofermentativas únicamente producen 1 mol de ATP de la glucosa en vez de 2 como lo hacen las BAL homofermentativas. Es necesario recalcar que las BAL heterolácticas suelen descarboxilar el 6-fosfogluconato, y producen por tanto CO₂ como producto de fermentación (82).

Proteólisis

Existe un sistema por medio del cual las BAL logran la degradación de las proteínas, el mismo que implica una proteinasa que está unida a su pared celular (19); en el caso del *Lactobacillus paracasei subs. paracasei* esta se denomina PrtP que es una serina proteasa que pertenece a la familia subtilisina, además de poseer otra enzima que ayuda a la activación de la primera denominada PrtM (93). La proteinasa genera oligopéptidos,

productos de la degradación, que posteriormente son internalizados por medio de sistemas de transportes de oligopéptidos y permeasas; cuando estos ya se encuentran en el interior celular, los mismos son divididos por peptidasas intracelulares, dando como resultado final aminoácidos y péptidos pequeños. De esta forma se puede concluir, que si bien las BAL pueden no poseer la capacidad de sintetizar ciertos aminoácidos, cuya naturaleza y número varía según la cepa considerada, pueden llegar a obtenerlos gracias a su actividad proteolítica a través de las proteínas que se encuentran en el medio en el cual se desarrollan (19).



Fuente: (Baltasar M, *et al.*, 2010)

FIGURA 2.5 DIAGRAMA DE LOS SISTEMAS PROTEOLÍTICOS DE BACTERIAS DE ÁCIDO LÁCTICO.

Razones por la cual se seleccionó la cepa Lactobacillus paracasei subs. paracasei para la investigación

- El ácido láctico producido por esta cepa en la fermentación de la lactosa por lo general corresponde al L-isómero (26), el mismo que es metabolizado por el organismo humano.
- Esta BAL produce una fermentación con sabor ácido suave y bajo cuerpo (25), lo cual podría conferirle características organolépticas agradables cuando se decida desarrollar un producto.
- Se seleccionó esta cepa debido a que es un microorganismo mesófilo.
- La selección del Lactobacillus paracasei subs. paracasei se debe a que en una investigación realizada por Drgalic en el año 2005 se obtuvieron excelentes conteos celulares.
- Este microorganismo tiene una excelente resistencia a empaques de bajo costo y cuya barrera de oxígeno sea débil (45); por lo que para desarrollar un producto, esta característica se convierte en una ventaja.
- El uso de esta bacteria ácido láctica Lactobacillus paracasei subsp. paracasei, posee una gran estabilidad y resistencia además de mejorar la salud intestinal (25).

- Desde una perspectiva de negocios esta BAL constituye una excelente alternativa ya que es un microorganismo probiótico; esto se debe a que hoy en día, debido al aumento de conciencia en cuanto a hábitos alimenticios por parte de los consumidores, existe una tendencia hacia el consumo de productos saludables y funcionales (97).
- La cepa **LC-01**, es altamente resistente la acidez gástrica y llega sin problema alguno al intestino del consumidor (25).
- Esta cepa ha presentado la capacidad de adherirse sin problemas a las células de la pared celular; además tiene la característica de inducir la producción de citoquinas por parte de los leucocitos (32) (91).
- En una investigación se pudo observar que *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* tuvo mayor estabilidad en comparación con las cepas de *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) y *Bifidobacterium bifidus* (BB-12) en el suero (45).
- Se ha observado que el adicionar esta BAL a la alimentación de los infantes da como resultado su desarrollo normal con un aumento del número de bifidobacterias fecales (58) (90) (69).

- **Lactobacillus paracasei subs. paracasei** ha mostrado efectos beneficiosos en el tratamiento de diarrea en niños (40).

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1. Caracterización de la Materia Prima.

La experimentación se realizó en los laboratorios de la Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción (FIMCP) y del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), ambos pertenecientes a la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). El suero utilizado en la experimentación fue proporcionado por la industria Láctea "PROLACHIV" ubicada en el Km. 32,5 vía a Daule, que se encuentra dentro de los límites de la Zona 5. El lactosuero fue recolectado en diferentes días después de la producción de la cuajada de la marca Chivería; trasladando el mismo a las instalaciones anteriormente mencionadas. Las pruebas físico-químicas tales como pH, humedad y cenizas fueron llevadas a cabo en el laboratorio de bromatología de la carrera Ingeniería en

Alimentos de la ESPOL; mientras que la experimentación se llevó a cabo en los laboratorios del CIBE.

Pruebas físico-químicas

Norma técnica Ecuatoriana NTE INEN 2594:2011 requisitos para suero lácteo. (52)

Esta norma establece los requisitos que debe cumplir el suero de leche líquido destinado a posterior procesamiento como materia prima o como ingrediente.

Requisitos físico-químicos del suero de leche líquido

- DETERMINACION DE LOS COMPUESTOS NITROGENADOS (AOAC 991.20)

Para la determinación de los compuestos nitrogenados se utilizó el método Kjeldahl el cual determina la concentración de nitrógeno presente en la muestra para luego ser transformado a través de un factor en proteína.

- DETERMINACIÓN DE GRASA (Soxhlet) (NMX- AA005-SCFI-2000)

Se realizó la extracción total de la materia grasa libre por soxhlet.

- DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS (por diferencia)

Se determinó por diferencia entre ceniza y humedad.

- DETERMINACION DE LA HUMEDAD (AOAC 950.46)
- DETERMINACIÓN DE LA CENIZAS (AOAC 940.26)
- CALCULO DE PH (pH-metro Thermo Scientific modelo: 3-Star Plus Benchtop)

3.2. Caracterización del lactosuero fermentado

Una vez transcurrido el tiempo de fermentación se procedió a centrifugar el lactosuero fermentado y posteriormente se procedió a realizar su respectiva caracterización la cual implicó los mismos análisis que fueron efectuados para el suero sin fermentar.

Conteo inicial lactosuero

Como paso previo a la experimentación se desarrolló un conteo inicial del lactosuero recién inoculado; el mismo que se realizó por triplicado utilizando Erlenmeyers de 500 mL. Se realizaron tres diluciones por cada cantidad de microorganismo de las cuales se escogió la segunda dilución para realizar el conteo respectivo. Las diluciones se realizaron en tubos de ensayo estériles de 10 mL utilizando la cámara de flujo laminar con la finalidad de evitar cualquier tipo de contaminación. Posteriormente, de la dilución escogida se tomó 10 μ L y se procedió con el conteo utilizando la cámara de Neubauer BOECO Bright Line Marienfeld modelo Tiefe

Depth Profondeur (0.100mm-0.0025mm²) y el microscopio Zeiss modelo: Axiostar lo cual permitió que se efectuó un conteo rápido y eficaz.

3.3. Diseño Experimental

Para realizar el diseño experimental se utilizaron dos cantidades del microorganismo *Lactobacillus paracasei subs. paracasei* (0.6 g, 1.0 g) en 250 mL de suero lácteo, dos valores de agitación (80 rpm y 100 rpm) y dos diferentes temperaturas (30°C y 37 °C) conformando de esta manera las variables independientes; la variable dependiente en este diseño de acuerdo con la investigación son los compuestos nitrogenados respondiendo de así a un diseño experimental de 2³. Además, se efectuaron pruebas estadísticas con un 95% de confianza mediante el programa STATGRAPHICS CENTURION XVI al conjunto de resultados obtenidos.

3.4. Descripción del proceso

Etapa del pre inóculo

Como primer paso se esterilizó el lactosuero para evitar algún tipo de contaminación no deseada, se utilizaron Erlenmeyers de 500 mL y se realizó por triplicado la experimentación; la misma que consiste

en un pre inóculo en el cual se empleara dos cantidades de microorganismo *Lactobacillus paracasei subs. paracasei* de 0,6 g y 1g. Una vez finalizada la pre inoculación se dejó en fermentación los Erlenmeyer por un tiempo de 24 horas en un shaker incubadora New Brunswick Scientific modelo C10. Acorde a información bibliográfica revisada, las temperaturas que ejercen una influencia favorable en la fermentación láctica en lactosuero por el microorganismo *Lactobacillus paracasei subs. paracasei* son 30°C y 37°C (13), (75), (25).

Etapas de Fermentación

Una vez que transcurrieron las 24h se realizó una nueva inoculación:

- Se tomaron Erlenmeyers esterilizados de 500 mL y se agregaron 50 mL de lactosuero anteriormente inoculado (pre inóculo) de cada una de las cantidades de microorganismo más 150mL de lactosuero sin fermentar previamente esterilizado; este procedimiento se realizó por triplicado.
- Una vez realizado esta nueva inoculación se procedió a dejar los Erlenmeyers en fermentación en el Shaker incubadora durante un periodo de 48 h a la temperatura y rpm establecidas de acuerdo al diseño experimental.

- Concluido el tiempo anteriormente mencionado se tomó pH a cada una de las muestras y se realizó un conteo de cada una de las cantidades de microorganismo en la cámara de Neubauer BOECO Bright Line Marienfeld modelo Tiefe Depth Profondeur (0.100mm-0.0025mm²) con ayuda del microscopio Zeiss modelo: Axiostar.
- Efectuado el conteo final, se realizaron las respectivas caracterizaciones físico-químicas del producto resultante; para lo cual se centrifugo las muestras por medio de una centrífuga Thermo Scientific modelo: *Multifuge X1R*. Este procedimiento se realizó a una temperatura de 4°C en un tiempo de 10 minutos y a 5000 rpm.

A continuación se muestra un esquema en el que se resume y se grafica los pasos seguidos en el método experimental.

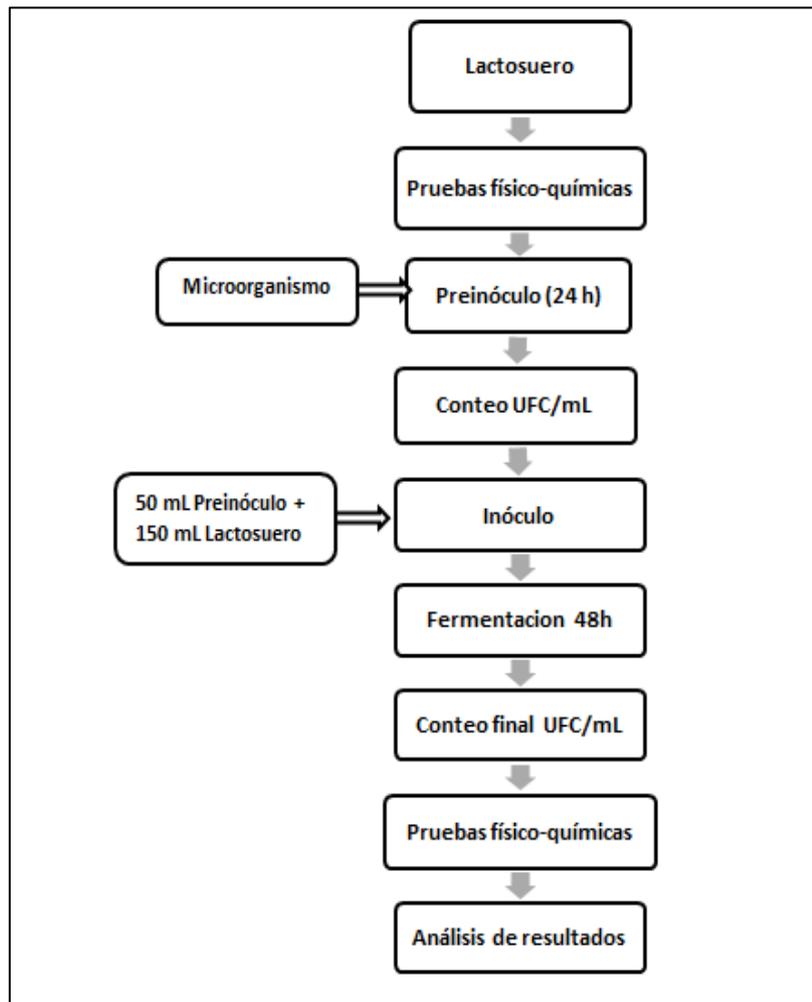


FIGURA 3.1 DIAGRAMA DE FLUJO DE LA EXPERIMENTACIÓN

De acuerdo al diseño experimental planteado 2³ se realizaron las respectivas corridas experimentales que se observan en las Tablas 6 y 7

TABLA 7
DISEÑO EXPERIMENTAL (PARTE 1)

Cantidad del microorganismo (g)	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)
0.6 g (x3)	37	80
	30	80
	30	100
	37	100

TABLA 8
DISEÑO EXPERIMENTAL (PARTE 2)

Cantidad del microorganismo (g)	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)
1.0 g (x3)	30	100
	30	80
	37	80
	37	100

Una vez que se concluyeron las corridas experimentales se procedió a realizar los respectivos análisis estadísticos por medio

del programa STATGRAPHICS CENTURION XVI; esto se hizo con el fin de determinar la influencia de las variables independientes sobre la variable dependiente (compuestos nitrogenados).

CAPÍTULO 4

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

4.1. Resultados Estadísticos de Pruebas Físico-Químicas Realizadas a la Materia Prima

Se esterilizó el lactosuero a pesar de que este provenía de la industria Chivería ya pasteurizado; esto se lo realizó como medida preventiva frente a una posible contaminación debido a que el lactosuero se lo utilizó como un medio de cultivo para el microorganismo.

TABLA 9

CONTEOS CELULARES INICIALES EN SUERO LÁCTEO ESTERILIZADO

0,6 g	1,0 g	1,5 g
0.54 x 10 ⁶ UFC/mL	0.76 x 10 ⁶ UFC/mL	0.81x 10 ⁶ UFC/mL
0.53 x 10 ⁶ UFC/mL	0.73 x 10 ⁶ UFC/mL	0.77 x 10 ⁶ UFC/mL
0.62 x 10 ⁶ UFC/mL	0.78 x 10 ⁶ UFC/mL	0.79 x 10 ⁶ UFC/mL

Con objeto de escoger aquellas cantidades que contribuyan con datos que ayuden a definir el comportamiento de *Lactobacillus paracasei subs. paracasei* más eficazmente a la presente investigación, se realizaron conteos celulares bacterianos por triplicado; tal y como puede ser visualizado en la Tabla 9 las cantidades que presentaron menos diferencias significativas comparando sus valores, fueron 1,0 y 1,5 g razón por la cual se decidió eliminar el valor de 1,5 g ya que el mismo representa una mayor utilización de cantidad de microorganismo, menos variabilidad en los datos y por ende mayores costos en la adquisición de la bacteria en estudio.

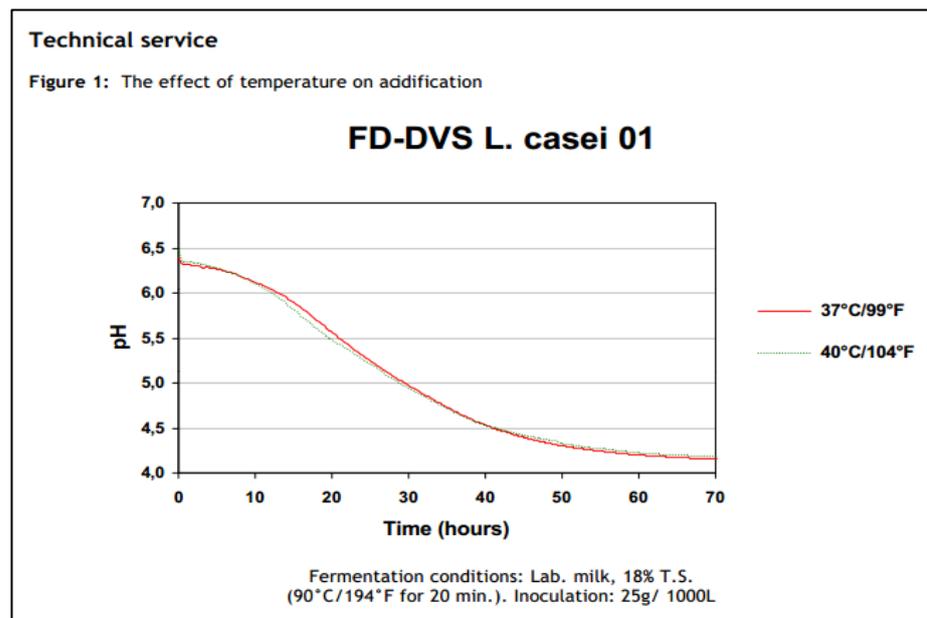
TABLA 10
CONTEOS CELULARES INICIALES EN SUERO
LÁCTEO ESTERILIZADO

0,6 g	1,0 g
0.54 x 10 ⁶ UFC/MI	0.76 x 10 ⁶ UFC/mL
0.53 x 10 ⁶ UFC/mL	0.73 x 10 ⁶ UFC/mL
0.62 x 10 ⁶ UFC/mL	0.78 x 10 ⁶ UFC/mL

TABLA 11
COMPOSICIÓN DEL SUERO LÁCTEO (%) (VALORES
PROMEDIO)

Parámetros	Suero Lácteo
Compuestos nitrogenados	1.02
Carbohidratos	5.2
Grasa Total	0.90
Ceniza	0.62
Humedad	91.71
pH	6.65

4.2. Resultados Estadísticos de Pruebas Físico-Químicas Realizadas al Producto Final



Fuente: (Chr-Hansen, 2001)

FIGURA 4.1 CURVA DE ACIDIFICACIÓN DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN

De acuerdo a la ficha técnica Chr-Hansen(2001) se puede visualizar el descenso de pH a lo largo del tiempo a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo. En relación a la experimentación realizada se obtuvo un pH cercano al presentado en la gráfica en un tiempo de 48 horas.

TABLA 12
COMPOSICIÓN DEL SUERO LÁCTEO FERMENTADO
(%) (VALORES PROMEDIO)

Parámetros	Suero Lácteo
Compuestos nitrogenados	1.38
Carbohidratos	4.52
Grasa Total	0.40
Ceniza	0.54
Humedad	93.20
pH	3.76

Se realizaron conteos celulares al lactosuero fermentado para observar si hubo un incremento en el número de células viables; posteriormente las muestras fueron sometidas a análisis físico-químicos para determinar si hubo un aumento en la cantidad de compuestos nitrogenados

TABLA 13
CONTEOS CELULARES REALIZADOS EN EL LACTOSUERO
FERMENTADO

Condiciones de Fermentación	Cantidad inicial de Lactobacillus (g)	Conteo Final del Fermentado (UFC/mL)	Compuestos Nitrogenados (%)
T: 37°C RPM:80 pH inicial:6.45 pH final:3.53	0,6	6.2×10^6	1.25
	0,6	7.6×10^6	1.34
	0,6	7.3×10^6	1.33

Condiciones de Fermentación	Cantidad inicial de Lactobacillus (g)	Conteo Final del Fermentado (UFC/mL)	Compuestos Nitrogenados (%)
T: 30°C RPM:100 pH inicial:6.75 pH final:3.85	1,0	10.3×10^6	1.47
	1,0	8.8×10^6	1.39
	1,0	9.2×10^6	1.42

Condiciones de Fermentación	Cantidad inicial de Lactobacillus (g)	Conteo Final del Fermentado (UFC/mL)	Compuestos Nitrogenados (%)
T: 30°C RPM:80 pH inicial:6.70 pH final:3.62	0,6	5.4×10^6	1.15
	0,6	5.1×10^6	1.12
	0,6	5.6×10^6	1.17

Condiciones de Fermentación	Cantidad inicial de Lactobacillus (g)	Conteo Final del Fermentado (UFC/mL)	Compuestos Nitrogenados (%)
T: 30°C RPM:80 pH inicial:6.70 pH final:3.68	1,0	10.5×10^6	1.54
	1,0	9.7×10^6	1.44
	1,0	10.1×10^6	1.46

Condiciones de Fermentación	Cantidad inicial de Lactobacillus (g)	Conteo Final del Fermentado (UFC/mL)	Compuestos Nitrogenados (%)
T: 37°C RPM:80 pH inicial:6.65 pH final:3.42	1,0	11.7×10^6	1.60
	1,0	12.5×10^6	1.65
	1,0	12.0×10^6	1.63

Condiciones de Fermentación	Cantidad inicial de Lactobacillus (g)	Conteo Final del Fermentado (UFC/mL)	Compuestos Nitrogenados (%)
T: 30°C RPM:100 pH inicial:6.58 pH final:3.71	0,6	4.9×10^6	1.11
	0,6	4.2×10^6	1.06
	0,6	5.3×10^6	1.15

Condiciones de Fermentación	Cantidad inicial de Lactobacillus (g)	Conteo Final del Fermentado (UFC/mL)	Compuestos Nitrogenados (%)
T: 37°C RPM:100 pH inicial:6.65 pH final:4.06	0,6	6.2×10^6	1.28
	0,6	7.4×10^6	1.37
	0,6	8.3×10^6	1.39

Condiciones de Fermentación	Cantidad inicial de Lactobacillus (g)	Conteo Final del Fermentado (UFC/mL)	Compuestos Nitrogenados (%)
T: 37°C RPM:100 pH inicial:6.68 pH final:3.72	1,0	11.6×10^6	1.60
	1,0	12.8×10^6	1.68
	1,0	12.1×10^6	1.64

Los valores obtenidos en los análisis del lactosuero sin fermentar (Tabla 13) concuerdan con aquellos establecidos por los requisitos de la NTE INEN 2594:2011 (Proteína: 0.8%, Carbohidratos: 5%, Grasa total: 0.3%, Ceniza: 0.7%, pH: 6.4-6.8) Suero de leche líquido; por lo que el suero lácteo utilizado resulto ser ideal para proceder con la experimentación. Es necesario mencionar que el único valor que difirió en el análisis con respecto a la fuente anteriormente mencionadas fue el porcentaje de grasa, mismo que según Drgarlic (2005) puede variar debido a que la composición del suero puede cambiar de acuerdo a la calidad de la leche y el tipo de queso del cual proviene.

Para una mejor comprensión de la influencia de las variables en la investigación se decidió realizar un análisis individual y posteriormente un análisis unificado para comprender en mayor medida el comportamiento del microorganismo.

Efecto de la cantidad del microorganismo

Al proceder con el estudio de la influencia de la cantidad del microorganismo en el aumento de compuestos nitrogenados; se pudo observar que el mayor porcentaje obtenido fue de 1.68 mientras que el menor fue de 1.06 ambos correspondientes a un tamaño de inóculo de 1 y 0.6 g respectivamente.

De la observación anteriormente mencionada, la utilización del tamaño de inóculo de 1 g es aquel que presenta la mayor producción de compuestos nitrogenados.

Efecto de la temperatura

Con la finalidad de encontrar la temperatura óptima para la producción de compuestos nitrogenados, se incubo el medio después de la inoculación a dos temperaturas: 30 y 37 °C. Se encontró que la mayor producción de compuestos nitrogenados se produjo a la temperatura de 37 °C, corroborando de esta manera lo expuesto por Panesar (2010), Chr-Hansen (2001) y Drgarlic (2005) que la temperatura óptima para fermentar este microorganismo es la anteriormente mencionada.

Esto se da, debido a que la temperatura es un factor decisivo, que tiene una gran influencia en la actividad de las enzimas

metabólicas/celulares; es decir las enzimas suelen ser más activas a la temperatura óptima del microorganismo al cual pertenecen (87).

Efecto de la agitación

En esta investigación otra variable de estudio fue la agitación; la misma que se realizó a 80 rpm y 100 rpm en el shaker. Se determinó que la agitación por si sola no interviene en la producción de compuestos nitrogenados, este hecho podría ser debido a la naturaleza microaerofílica de *Lactobacillus paracasei subs. paracasei*.

En diferentes estudios realizados por Gandhi en el año 2000, esta cepa bacteriana no se ve influenciada por la agitación.

Producción de compuestos nitrogenados

Al hacer una comparación entre la composición físico-química del lactosuero sin fermentar y el lactosuero fermentado se puede notar que los valores de los compuestos nitrogenados incrementaron su valor; lo mismo que se debe a que este es un microorganismo eficiente capaz de absorber nitrógeno que se encuentra en forma de sales en el suero. El nitrógeno es metabolizado por el microorganismo propiciando una reacción de sustitución, donde los grupos hidroxílicos de las moléculas polilácticas son reemplazadas

por grupos aminos, aumentando la cantidad de compuestos nitrogenados en la fase sólida o precipitada (5).

TABLA 14
ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA CANTIDAD DE COMPUESTOS
NITROGENADOS

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Microorganismo	0,208012	1	0,208012	16641,00	0,0049
B:Temperatura	0,0703125	1	0,0703125	5625,00	0,0085
C:Agitación	0,0001125	1	0,0001125	9,00	0,2048
AB	0,0001125	1	0,0001125	9,00	0,2048
AC	0,0000125	1	0,0000125	1,00	0,5000
BC	0,0036125	1	0,0036125	289,00	0,0374
Error total	0,0000125	1	0,0000125		
Total (corr.)	0,282187	7			

Para realizar el diseño experimental se han tomado tres factores cuantitativos que comprenden dos niveles cada uno para observar si estos influyen en la cantidad de compuestos nitrogenados producidas en el lactosuero fermentado; como se puede observar el factor A y el factor B referidos al tamaño del inóculo y la

temperatura respectivamente tienen un valor $p < 0,05$, lo cual indica que estos factores influyen en la variable en estudio.

Con respecto a la agitación se puede observar que esta independientemente no tiene influencia en la cantidad de compuestos nitrogenados presentes en el lactosuero fermentado, pero que al interactuar con el factor temperatura esta tiene un cierto nivel influencia sobre la variable de estudio.

G

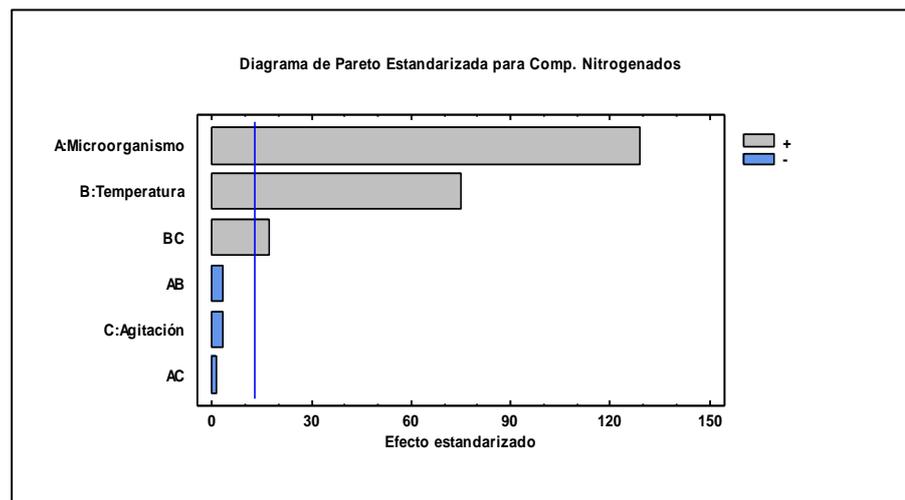


FIGURA 4.2 DIAGRAMA DE PARETO

Se ha hecho uso de un diagrama de Pareto para explicar de manera visual el efecto de los factores en la producción de compuestos nitrogenados.

El gráfico 4.1, muestra que los factores que tienen influencia sobre los compuestos nitrogenados son: microorganismo

($p=0.0049$), temperatura ($p=0.085$) y la interacción entre temperatura y agitación. Se puede observar en la figura que los efectos estandarizados son mayores al valor crítico. Además los valores p mencionados son menores a un $\alpha=0.05$ por lo tanto existe suficiente evidencia estadística que indica que los factores antes mencionados tienen influencia en la cantidad de compuestos nitrogenados.

En este caso se puede observar que la mayor influencia en la cantidad final de compuestos nitrogenados, la ejerce el factor A (tamaño del inóculo), seguido del factor B (Temperatura) y por último por la interacción entre BC (Temperatura y Agitación).

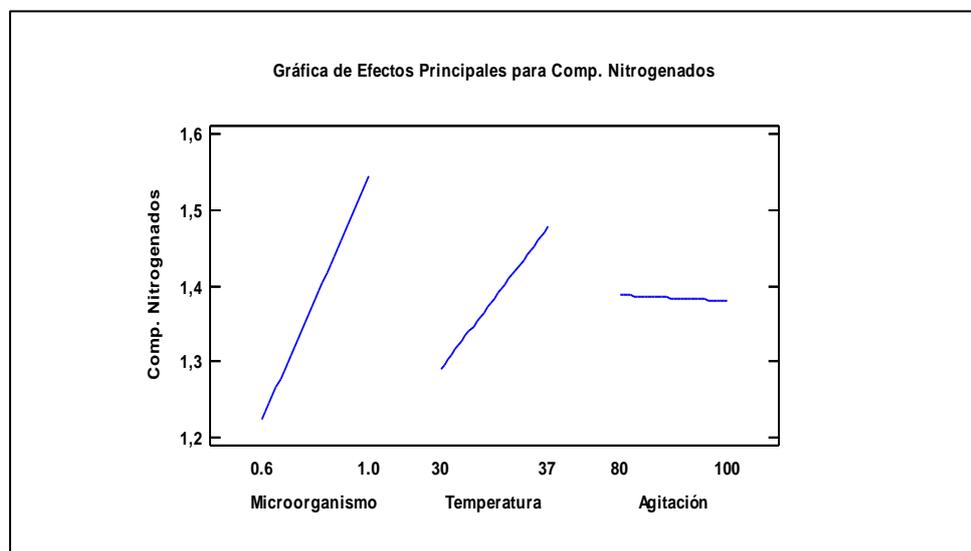


FIGURA 4.3 EFECTOS PRINCIPALES PARA COMPUESTOS NITROGENADOS

En el diagrama de efectos principales se puede observar que la mayor influencia la tiene la cantidad de microorganismo o tamaño del inóculo en la producción de compuestos nitrogenados, seguido por el factor temperatura. El factor agitación no ejerce por si solo ninguna influencia en la producción de compuestos nitrogenados referidos a proteína en el lactosuero fermentado.

Comparación de medias

El fin de este análisis fue comparar los dos grupos de observaciones obtenidos a lo largo de la experimentación (compuestos nitrogenados) antes y después de la fermentación del lactosuero. Es necesario recalcar que en este análisis de tipo estadístico es necesario distinguir si las series son dependientes o independientes.

En este caso en particular las series de datos fueron dependientes ya que evalúan un mismo dato más de una vez en cada elemento de la muestra; es decir que lo que se pretendió comprobar en los datos es si realmente se produjo un aumento significativo en la cantidad de compuestos nitrogenados referidos a proteína en el lactosuero después de someterlo a fermentación.

Es por tal razón, que resultó intuitivo trabajar con la diferencia de ambas observaciones (aumento de la cantidad de compuestos nitrogenados), de modo que se requirió contrastar la hipótesis:

$$H_0: \mu_A - \mu_D = 0$$

$$H_1: \mu_A - \mu_D \neq 0$$

μ_A = media de los compuestos nitrogenados antes de la fermentación

μ_D = media de los compuestos nitrogenados después de la fermentación

La veracidad de esta hipótesis pudo ser contrastada mediante la prueba t de Student; obteniendo los siguientes resultados:

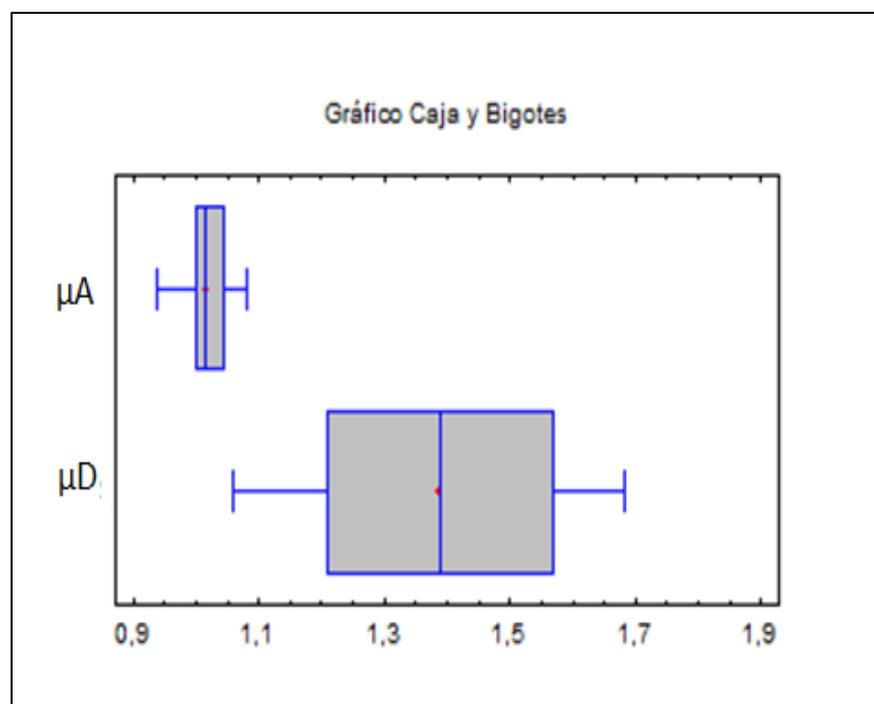


FIGURA 4.4 DIAGRAMA DE CAJAS

Se puede corroborar mediante el gráfico 4.3, que existe una diferencia significativa entre la media de compuestos nitrogenados antes de la fermentación y la media de compuestos nitrogenados después de la fermentación.

TABLA 15
COMPARACIÓN DE MEDIAS LACTOSUERO SIN FERMENTAR Y
FERMENTADO

SnaoStal: Comparación de dos muestras		
	μA	μD
Recuento	24	24
Promedio	1.01667	1.385
Desviación estándar	0.0352219	0.193214
Coefficiente de variación	3.48445%	13.9502%
Mínimo	0.94	1.06
Máximo	1.08	1.68
Rango	0.14	0.62
Sesgo Estandarizado	-0.959038	-0.172188
Curtosis Estandarizada	-0.0844916	-1.17445
Comparación de medias		

Hipótesis nula: diferencia=0	
Estadístico t=-91879	Valor-P Bilateral=0,0000

De acuerdo a los resultados de la tabla 15, se puede observar una marcada diferencia entre la desviación estándar de la cantidad de compuestos nitrogenados en el lactosuero antes de la fermentación (0.0352219) y de compuestos nitrogenados del lactosuero después de la fermentación (0,193211). Además se obtuvo un valor $p < 0,05$, razón por la cual la hipótesis nula ha sido rechazada en favor de la hipótesis alterna, lo mismo que significa que ha existido una diferencia significativa entre la cantidad de compuestos nitrogenados en el lactosuero sin fermentar y lactosuero fermentado.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se pudo concluir que el suero lácteo es un excelente sustrato para el desarrollo de la fermentación por parte del microorganismo láctico *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*; debido a que se obtuvo excelentes conteos celulares y un considerable aumento en la cantidad de compuestos nitrogenados en el lactosuero fermentado.
- Se determinó estadísticamente, que los factores que influyen después de la fermentación son la cantidad utilizada de microorganismo (g) y la temperatura de incubación (°C); mientras que la agitación por sí sola no ejerce ningún efecto sobre la variable de estudio, sin embargo al interactuar esta con la temperatura se pudo

observar que ejercía una pequeña influencia sobre la cantidad de compuestos nitrogenados.

- Dentro de los factores que influyen se determinó que para obtener una mayor cantidad de los compuestos nitrogenados, la cantidad de microorganismo corresponde a 1 g y la temperatura de fermentación es de 37°C.
- Se concluyó que este microorganismo por sus características intrínsecas y por el comportamiento que presenta en el lactosuero podría ser utilizado en el futuro a escala industrial.

5.2. Recomendaciones

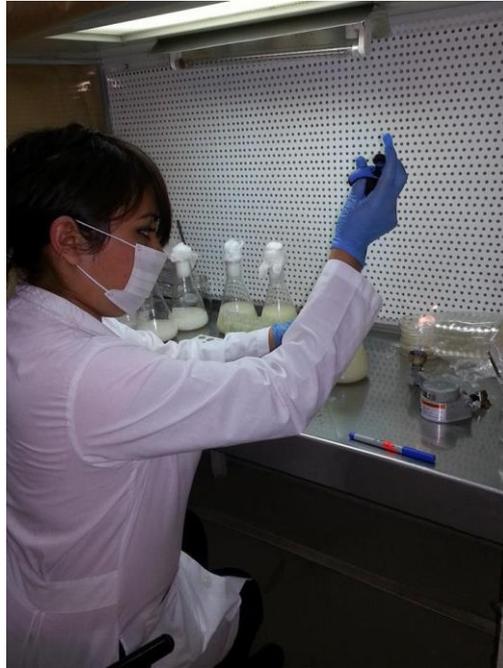
- Se recomienda profundizar el estudio del comportamiento y la fermentación producida por *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* en el lactosuero, utilizando rangos diferentes dentro de las variables utilizadas (cantidad de microorganismo, temperatura y agitación) en este proyecto con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas de crecimiento de esta bacteria.
- De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, el empleo de *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* para la fermentación en suero lácteo resulta una

alternativa interesante para en el futuro desarrollar alimentos funcionales; por lo que se recomienda que se realice un análisis técnico-económico previamente al desarrollo de un producto.

APÉNDICES

APÉNDICE A

INOCULACION DEL MICROORGANISMO



APÉNDICE B

CAMARA DE FLUJO LAMINAR



APÉNDICE C

SHAKER INCUBADORA FERMENTADOR



APÉNDICE D

CAMARA DE NEUBAUER



APÉNDICE E

CONTEOS CELULARES



APÉNDICE F

MEDICION DE Ph



ANEXOS

ANEXO A

MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS

MATERIALES	OBSERVACIONES
Materiales De Laboratorio <ul style="list-style-type: none">• Erlenmeyers de 500mL• Pipetas• Beakers• Espátula• Lápiz graso• Probetas	Vidriería mínima para la experimentación según lo planteado
INDUMENTARIA <ul style="list-style-type: none">• Cofia• Mandil• Guantes• Mascarilla	Son necesarias por nomas de seguridad industrial de cualquier laboratorio
EQUIPOS DE LABORATORIO	
Agitador incubadora Shaker New Brunswick Scientific modelo: <i>C10</i>	Material básico de laboratorio para prácticas.
Cámara de flujo laminar modelo: C4	
Cámara De Neubauer BOECO Bright Line Marienfeld modelo Tiefe Depth Profondeur (0.100mm-0.0025mm ²)	
Microscopio Zeiss modelo: Axiostar	
Estufa Memmert modelo: UM-500	
Centrífuga Thermo Scientific modelo: <i>Multifuge X1R</i>	
pH-metro Thermo Scientific modelo: 3-Star Plus Benchtop	
Mufla Thermo Scientific	
Autoclave Market Forge Sterilmatic modelo: STME-L	
INSUMOS PARA LA EXPERIMENTACIÓN	

Algodón	Material básico para la experimentación
Gasa	Material básico para la experimentación
Papel aluminio	Material básico para la experimentación
Agua destilada	Material básico de laboratorio para practicas
Lactosuero	Sustrato a emplearse en la experimentación.
Microorganismo fermentador (Lactobacillus paracasei ssp. paracasei)	Microorganismo a utilizarse en la experimentación

Elaborado por: Paucar y Pérez 2014

ANEXO B

FICHA TECNICA DEL MICROORGANISMO

CHR. HANSEN

FD-DVS L.casei-01 - nu-trish®

Product Information

Description	Mesophilic Lactic Culture. Defined strain culture containing <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> . According to Bergey's Manual, 1986 the strain is classified as <i>Lactobacillus casei</i> . L.casei-01 is supplied in a convenient freeze-dried form.						
Application	L.casei-01 will produce a fermented milk with mild acidic flavor and low body.						
Packing	<table><thead><tr><th>Packing size</th><th>Item number</th></tr></thead><tbody><tr><td>5 x 25 g pouch</td><td>100088</td></tr><tr><td>10 x 250 g pouch</td><td>100231</td></tr></tbody></table>	Packing size	Item number	5 x 25 g pouch	100088	10 x 250 g pouch	100231
Packing size	Item number						
5 x 25 g pouch	100088						
10 x 250 g pouch	100231						
Availability	L.casei-01 is also available in frozen form as well as in convenient to use DVS blends with other cultures.						
Storage and shelf life	Freeze-dried cultures should be stored at -18°C (0°F) or below. If the cultures are stored at -18°C (0°F) or below, the shelf life is at least 24 months. At +5°C (41°F) the shelf life is at least 6 weeks.						
Instructions for use	Remove the cultures from the freezer just prior to use. DO NOT THAW THESE CULTURES. Sanitize the top of the pouch with chlorine. Open the pouch and pour the freeze-dried granules directly into the pasteurized product using slow agitation. Agitate the mixture for 10-15 minutes to distribute the culture evenly.						
Dosage	L.casei-01 is mostly applied in combination with other acidifying strains. The required dosage will in such cases mainly depend on fermentation time and temperature. Below recommended dosage range for freeze-dried L.casei-01 is applicable in above cases.						

DVS inoculation in g of FD-DVS	Amount of milk to be inoculated			
	500 l	1,000 l	250 gallon	1000 gallon
	25 g	50 g	50 g	200 g
50 g	100 g	100 g	400 g	

Kosher status L.casei-01 is Kosher approved (Circle K D) for year-round use, excluding Passover.

A8r/L.casei-01-FD-R/nov 2001/1.2

Chr. Hansen A/S, 10-12 Bøge Allé, DK-2970 Hørsholm. Tel: +45 45 747474. Fax: +45 45 748813. Web: chr-hansen.com

F-DVS L.casei-01 nu-trish®

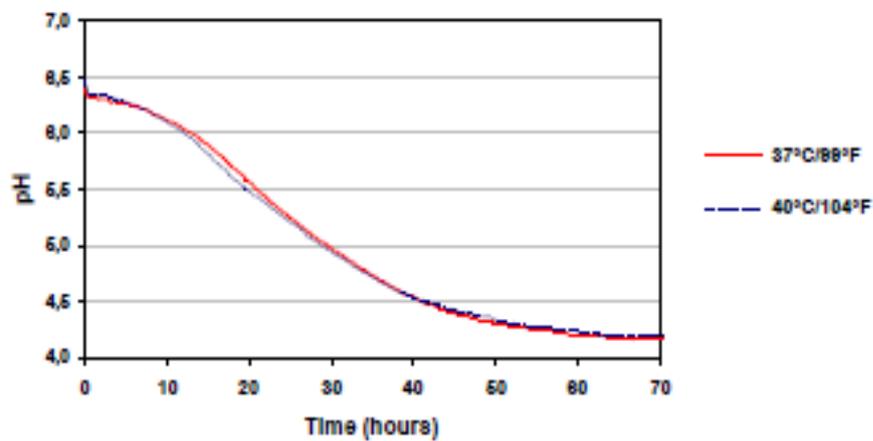
Product Information

Description	Mesophilic Lactic Culture. Defined strain culture containing <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> . According to Bergey's Manual, 1986 the strain is classified as <i>Lactobacillus casei</i> . L.casei-01 is supplied in a convenient frozen pellet form.									
Application	L.casei-01 will produce a fermented milk with mild acidic flavor and low body.									
Packing	<table border="0"> <tr> <td style="text-align: left;">Packing size</td> <td style="text-align: left;">Item number</td> </tr> <tr> <td>500 g carton</td> <td>501710</td> </tr> </table>	Packing size	Item number	500 g carton	501710					
Packing size	Item number									
500 g carton	501710									
Availability	L.casei-01 is also available in freeze-dried form as well as in convenient to use DVS blends with other cultures.									
Storage and shelf life	Frozen cultures should be stored at -45°C (-49°F) or below. If the cultures are stored at -45°C (-49°F) or below, the shelf life is at least 12 months.									
Instructions for use	Remove the cultures from the freezer just prior to use. DO NOT THAW THESE CULTURES. Sanitize the gable top of the carton with chlorine. Open the carton and pour the frozen pellets directly into the pasteurized product using slow agitation. Agitate the mixture for 10-15 minutes to distribute the culture evenly.									
Dosage	<p>L.casei-01 is mostly applied in combination with other acidifying strains. The required dosage will in such cases mainly depend on fermentation time and temperature.</p> <p>Below recommended dosage range is applicable in above cases.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Number of 500 g cartons</th> <th>Amount of milk to be inoculated</th> <th>Inoculation Rate</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">2</td> <td>10,000 litres/2,640 gallons</td> <td style="text-align: center;">0.01%</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td>10,000 litres/2,640 gallons</td> <td style="text-align: center;">0.005%</td> </tr> </tbody> </table>	Number of 500 g cartons	Amount of milk to be inoculated	Inoculation Rate	2	10,000 litres/2,640 gallons	0.01%	1	10,000 litres/2,640 gallons	0.005%
Number of 500 g cartons	Amount of milk to be inoculated	Inoculation Rate								
2	10,000 litres/2,640 gallons	0.01%								
1	10,000 litres/2,640 gallons	0.005%								
Kosher status	L.casei-01 is Kosher approved (Circle K D) for year-round use, excluding Passover.									

Technical information

Figure 1: The effect of temperature on acidification

F-DVS L. casei 01



NB: Note that the accuracy of these curves is relative and subject to experimental error. Please also note that the curve is taken based on the freeze-dried culture.

Technical service

Chr. Hansen's worldwide facilities and the personnel of our application and technology center are at your disposal with assistance and instructions.

References

References and analytical methods are available upon request.

The information contained herein is to our knowledge true and correct and presented in good faith. However, no warranty, guarantee, or freedom from patent infringement is implied or inferred. This information is offered solely for your consideration and verification.

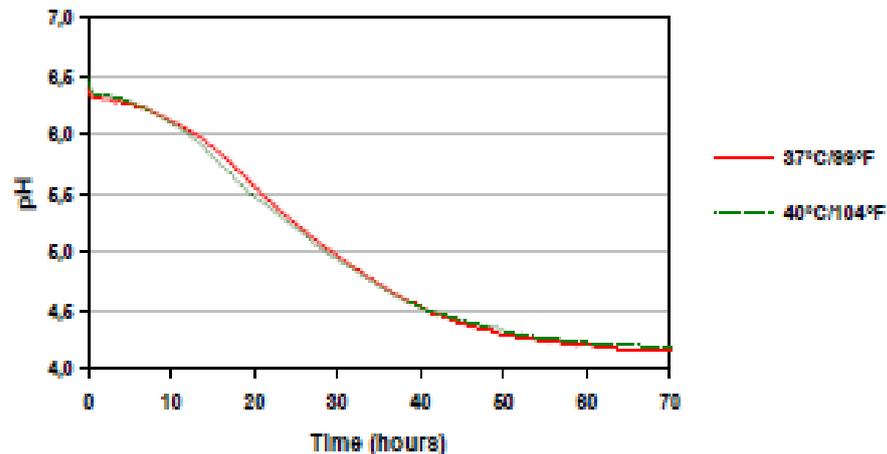
EN-L.casei-01-Frozen-PI-1001

ABr/L.casei-01-Fro-PI/nov2001/2.2

Technical service

Figure 1: The effect of temperature on acidification

FD-DVS L. casei 01



Fermentation conditions: Lab. milk, 18% T.S.
(90°C/194°F for 20 min.). Inoculation: 25g/ 1000L

NB: Note that the accuracy of these curves is relative and subject to experimental error.

Technical service

Chr. Hansen's worldwide facilities and the personnel of our application and technology center are at your disposal with assistance and instructions.

References

References and analytical methods are available upon request.

The information contained herein is to our knowledge true and correct and presented in good faith. However, no warranty, guarantee, or freedom from patent infringement is implied or inferred. This information is offered solely for your consideration and verification.

EN-L.casei-01-FD-PI-1101

ANEXO C

DETERMINACION DE NITROGENO TOTAL (AOAC 991.20)

Fundamento

El método se basa en la determinación de la cantidad de Nitrógeno orgánico contenido en productos alimentarios, compromete dos pasos consecutivos:

- a) La descomposición de la materia orgánica bajo calentamiento en presencia de ácido sulfúrico concentrado.
- b) El registro de la cantidad de amoníaco obtenida de la muestra

Durante el proceso de descomposición ocurre la deshidratación y carbonización de la materia orgánica combinada con la oxidación de carbono a dióxido de carbono. El nitrógeno orgánico es transformado a amoníaco que se retiene en la disolución como sulfato de amonio. La velocidad del proceso puede ser incrementarse adicionando sales que abaten la temperatura de descomposición (sulfato de potasio) o por la adición de oxidantes (peróxido de hidrógeno, tetracloruro, persulfatos o ácido crómico) y por la adición de un catalizador. (Nollet, 2005)

INSTRUMENTAL

- **Aparato de Kjeldahl**, para digestión y destilación.
- **Matraz Kjeldahl** de 50 cm³.
- **Matraz Erlenmeyer** de 500 cm³.
- **Bureta** de 50 cm³.
- **Balanza analítica**. Sensible al 0,1 mg.

REACTIVOS

- Ácido sulfúrico concentrado
- Solución 0,1 N de ácido sulfúrico, debidamente estandarizado.
- Solución concentrada de hidróxido de sodio.
- Solución 0,1 N de hidróxido de sodio, debidamente estandarizado.
- Solución de sulfuro alcalino o solución de tiosulfato de sodio.
- Sulfato de potasio o sulfato de sodio anhidro.
- Óxido de mercurio, o mercurio metálico, reactivo para análisis.

- Solución alcohólica de rojo de metilo.

Preparación de la muestra

1. Llevar la muestra a una temperatura aproximada de 20 °C y mezclarla mediante agitación suave hasta que este homogénea, cuidando que no haya separación de grasa por efecto de la agitación.
2. Si se forman grumos de crema y estos no se dispersan, calentar la muestra en baño María hasta 35° - 40 °C, mezclando cuidadosamente e incorporando cualquier partícula de crema adherida al recipiente, y enfriar rápidamente hasta 18° -20°C. Si quedan partículas blancas o grumos de grasa adheridos a las paredes del recipiente, la determinación no dará resultados exactos.

Procedimiento

1. La determinación debe realizarse por duplicado sobre la misma muestra preparada,
2. Pesar, con aproximación al 0,1 mg, aproximadamente 5g de muestra.
3. Transferir la muestra al matraz Kjeldahl y agregar el catalizador, formado por 0,7g de óxido mercuríco y 15 g de sulfato de potasio en polvo.
4. Agregar 25 cm³ de ácido sulfúrico concentrado, y un trozo pequeño de parafina para reducir la formación de espuma durante la digestión.
5. Agitar el matraz y colocarlo en forma inclinada en la hornilla del aparato kjeldahl. Calentar suavemente hasta que no se observe formación de espuma.
6. Agregar aproximadamente 200 cm³ de agua destilada, enfriar la mezcla hasta una temperatura inferior a 25 °C, agregar 25cm³ de la solución de sulfuro alcalino y agitar la mezcla para precipitar el mercurio,
7. Agregar unas pocas granallas de zinc para evitar proyecciones durante la ebullición.
8. Inclinarse el matraz y verter por sus paredes, cuidadosamente, para que se formen dos capas, 50 cm³ de la solución concentrada de hidróxido de sodio.
9. Inmediatamente, conectar el matraz kjeldahl al condensador mediante la ampolla de destilación. El extremo de salida del condensador debe estar sumergido en 50cm³ de la solución 0,1 N de ácido sulfúrico

contenida en el matraz Erlenmeyer de 500 cm³ a la cual se han agregado unas gotas de la solución alcohólica de rojo de metilo.

10. Agitar el matraz kjeldahl hasta mezclar completamente su contenido y luego calentarlo.
11. Destilar hasta que todo el amoníaco haya pasado a la solución acida contenida en el matraz Erlenmeyer.
12. Usando la solución 0,1 N de hidróxido de sodio, titular el exceso de ácido contenido en el matraz Erlenmeyer.
13. Realizar un solo ensayo en blanco con todos los reactivos, sin la muestra y siguiendo el mismo procedimiento descrito a partir del paso 3, para cada determinación o serie de determinaciones.

CALCULOS:

El contenido de proteínas en la leche se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$P = (1,40) (6,38) \frac{(V_1N_1 - V_2N_2) - (V_3N_1 - V_4N_2)}{m}$$

Siendo:

P= contenido de proteínas en la leche, en porcentaje de masa.

V1= volumen de la solución de ácido sulfúrico empleado para recoger el destilado de la muestra, en cm³.

N1=normalidad de la solución de ácido sulfúrico.

V2=volumen de la solución de hidróxido de sodio empleado en la titulación, en cm³.

N2= normalidad de la solución de hidróxido de sodio,

V3= volumen de la solución de ácido sulfúrico empleado para recoger el destilado del ensayo en blanco, en cm³.

V4= volumen de la solución de hidróxido de sodio empleado en la titulación del ensayo en blanco, en cm³.

m= masa de la muestra de la leche, en g.

ANEXO D

DETERMINACIÓN DE GRASA (NMX-AA005-SCFI-2000)

Método de Soxhlet

Fundamento

Es una extracción semicontinua con un disolvente orgánico. En este método el disolvente se calienta, se volatiliza y condensa goteando sobre la muestra la cual queda sumergida en el disolvente. Posteriormente éste es sifoneado al matraz de calentamiento para empezar de nuevo el proceso. El contenido de grasa se cuantifica por diferencia de peso (Nielsen, 2003)

-MATERIAL Y EQUIPO

- Sistema extractor Soxhlet
- Balanza analítica
- Papel filtro o dedal de celulosa
- Baño termorregulado
- Estufa de aire 103 + 2°C
- Tamiz de malla de 1 mm
- Manto calefactor o rotavapor
- Material usual de laboratorio

REACTIVOS

- Eter etílico P.E. 40-60°C
- Eter de petróleo P.E. 40-60°C

PROCEDIMIENTO

Preparación de la muestra:

- En muestras con mucha humedad homogeneizar y secar a 103+ °C en estufa de aire considerando el tipo de muestra.
- Moler y pasar por tamiz de malla de 1 mm

- Pesar en duplicado 2 a 5 gramos de muestra preparada en el dedal de extracción o papel filtro previamente pesado y tapado con algodón desgrasado. Registrar m
- Secar el matraz de extracción por 30 min a 103+ 2°C.
- Pesar el matraz de extracción Registrar m1
- Poner el matraz de extracción en el sistema soxhlet el dedal en el tubo de extracción y adicionar el solvente al matraz.
- Extraer la muestra con el solvente por 6 a 8 horas a una velocidad de condensación de 3-6 gotas/seg.
- Una vez terminada la extracción eliminar el solvente por evaporación en rotavapor o baño Maria bajo campana. Hasta que no se detecte olor a éter.
- Secar el matraz con la grasa en estufa a 103+ 2°C por 10 min, enfriar en desecados y pesar. Registrar m2.

CÁLCULO Y EXPRESION DE RESULTADOS

$$\% \text{ grasa cruda} = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100$$

Dónde: m peso de la muestra

m1 tara del matraz solo

m2 peso matraz con grasa.

$$\% \text{ grasa cruda en base seca} = \% \text{grasa cruda} \times \frac{100}{100 - \% \text{humedad}}$$

Dónde : m peso de la muestra

m1 tara del matraz solo

m2 peso matraz con grasa.

Los resultados se informan en % de materia grasa en base seca o húmeda. Promediar los valores obtenidos y expresar el resultado con 2 decimales.

Repetitividad: La diferencia de los 2 resultados no debe ser superior al 2 % del promedio.

ANEXO E

DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Fundamento

Carbohidratos se realiza por diferencia entre ceniza y humedad

ANEXO F

DETERMINACION DE LA HUMEDAD (AOAC 950.46)

Fundamento

Se calienta el producto a 105 °C hasta eliminar completamente la materia volátil, y se determina la humedad a partir de la diferencia de peso.

Instrumental:

- Beakers
- Balanza Analítica.
- Estufa.
- Desecador.
- Varilla agitadora de vidrio.

Procedimiento:

1. Pesar de 2 a 5 g de muestra previamente homogenizada,
2. Pasar la muestra a cápsula de aluminio, pesa filtro o vaso de precipitación con arena más un agitador.
3. Llevar a la estufa por un tiempo de 4 horas y a la temperatura de 105 °C hasta peso constante.

CALCULOS:

El contenido de humedad se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\% H = \frac{M1-M2}{M1-M} \times 100$$

Siendo:

H= contenido de humedad en porcentaje de masa.

M=masa de la capsula con arena y varilla en g.

M1=masa de la capsula con arena y varilla y muestra en g.

M2=masa de la capsula con arena y varilla y residuo seco en g.

ANEXO G

DETERMINACIÓN DE LA CENIZAS (AOAC 940.26)

Fundamento

En este método toda la materia orgánica se oxida en ausencia de flama a una temperatura que fluctúa entre los 550 -600°C; el material inorgánico que no se volatiliza a esta temperatura se conoce como ceniza. (Nollet, 2005)

Instrumental

Balanza analítica, sensible a 0,1 mg.

Capsula de platino de otro material inalterable a las condiciones del ensayo, de fondo plano, con diámetro de 50-60 mm y altura de 20-25 mm.

Estufa, con ventilación y regulador de temperatura, ajustada a $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Mufla, con regulador de temperatura ajustado a $530^{\circ}\text{C} \pm 20^{\circ}\text{C}$.

Desecador, con cloruro de calcio anhidro u otro deshidratante adecuado.

Procedimiento

1. Lavar cuidadosamente y secar la capsula en estufa ajustada a $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. Dejar enfriar en el desecador y pesar con aproximación 0,1 mg.
2. Transferir a la capsula la muestra preparada inmediatamente y pesar con aproximación a 0,1 mg aproximadamente 5 g de muestra.
3. Transferir la capsula a estufa ajustada a $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y calentar durante 3 h.
4. Colocar la capsula cerca de la puerta de la mufla abierta y mantenerla allí durante unos pocos minutos para evitar pérdidas por proyección de material que podrían ocurrir si la capsula se introduce directamente en la mufla.
5. Introducir la capsula e la mufla $530^{\circ}\text{C} \pm 20^{\circ}\text{C}$ hasta obtener cenizas libres de partículas de carbón (esto se obtiene al cabo de 2 a 3 h).
6. Sacar la capsula (con las cenizas), dejar enfriar en el desecador y pesar con aproximación al 0,1mg. Repetir la incineración por

periodos de 30 min, enfriando y pesando hasta que no haya disminución en la masa

El contenido de cenizas se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$C = \frac{M3-M}{M2-M} \times 100$$

Siendo:

C: cantidad de cenizas, en porcentaje de masa;

m: masa de la capsula vacía, en gramos;

m2: masa de la capsula con la leche (antes de la desecación), en g

m3: masa de la capsula con las cenizas (después de la incineración), en g.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Actor, Jeffrey; Shen-An, Hwang; y Marian Kruzel. Lactoferrin as a natural immune modulator. *Curr Pharm Des*, 2010;15 (17):1956-73.
- (2) Akhtar, Mahmood; y Eric, Dickinson. Whey protein-maltodextrin conjugates as emulsifying agents: An alternative to gum arabic. *Journal Food Hydrocolloid*, UK, 2012; 21(4): 607-616.
- (3) Alava, Clemencia; y Fernando, Quintana. *Procesos Lácteos*, 2011, formato htm, Disponible en internet:
http://datateca.unad.edu.co/contenidos/211613/Modulo_zip/index.html
- (4) Angulo, Claudio Rafael. Factibilidad de producción y estudio de rendimiento de queso chanco con incorporación de suero en polvo. Tesis Maestría en Ciencias y Tecnología de la Leche, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, 2013.
- (5) Aprovechamiento del suero lácteo de una empresa del norte antioqueño mediante microorganismos eficientes, 2009, fomato pdf, disponible en internet:
<http://www.lasallista.edu.co/fxcu/medial/pdf/RevistaLimpia/Vol4n2/65-74.pdf>
- (6) Artículo Discovery Salud, 2014, formato htm, Disponible en internet:
<http://www.dsalud.com/index.php?pagina=articulo&c=966>
- (7) Artym, Jolanta; y Michal, Zimecki. The role of lactoferrin in the proper development of newborns. *Postepy Hig Med Dosw*, 2013; 59:421-432.

- (8) Axelsson, Lars. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: Salmien, S., Von Wrigh, A., Ouwehand, A. (Eds.), Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. Tercera revision. Editorial Marcel Dekker, New York, 2012, p. 1-66.
- (9) Badui, Salvador. Propiedades y Uso del Suero de Leche. Revista Tecnológica Alimentos, Enero- Febrero, 2011.
- (10) Badui, Salvador. Química de los Alimentos. Pearson Educación, Cuarta Edición, México, 2010, p. 627.
- (11) Baltasar, Mayo; Tamara, Aleksandrak-Piekarczyk; María, Fernandez; Magdalena, Kowalczyk; Pablo, Álvarez-Martín; y Jacek, Bardowski. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. Editorial Wiley-Blackwell, USA, 2010, p. 11-14.
- (12) Baro, Luis; José, Jiménez; Antonio, Martínez; y Julio, Bouza. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. J. Ars. Pharmaceutica. 2011; 42 (3-4):135-145.
- (13) Barraón, Moya Angela; y María Lourdes, Pulido García. Aprovechamiento de lactosueros por fermentación, producción de ácido L-láctico. Universidad de Castilla La Mancha; España, 2013.
- (14) Batt, Carl. Characteristics of the Lactobacillus Species. Cornell University, Academic Press , New York, 2012.

- (15) BEN-HASSAN RM, Ghaly AE. Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 2000. p. 89–105.
- (16) Berterreche, Javier. Aspectos nutracéuticos y funcionales en productos lácteos. Universidad Santiago de Compostela, España, 2010. Formato pdf. Disponible en internet: http://www.fepale.org/sitio_viejo/lechosalud/documentos/Javier%20Berterreche%20Alim%20Funcionales.pdf
- (17) Bodnar, Igor; Arno, Alting; y Maykel, Verschueren. Structural effects on the permeability of whey protein films in an aqueous environment. *Food Hydrocolloids*. 2012; (5-6): 889-895.
- (18) Bounous, Gustavo; Sylvain, Baruchel; Julian Falutz ; y Phil Gold,. Whey proteins as a food supplement in HIV-seropositive individuals. *Clinical and Investigative Medicine*. 2013;(16): 204–209.
- (19) Brennan, Eileen; y Stella Reginensi. Aislamiento, identificación y estudio de características de interés tecnológico de bacterias ácido lácticas nativas de leche pertenecientes a la familia Streptococcaceae. Universidad de la República de Montevideo, Uruguay, 2011.
- (20) Brody, Ernest. P. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*. 2012;84 Suppl. 1:S39-S46.

- (21) Cabeza Herrera Enrique Alfonso. Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica. Universidad de León España, 2009. p. 1-5.
- (22) Carey, Kathleen; Anderson Larsen; Mike, Rowney; y David, Cameron-Smith. Application of whey proteins to enhance the molecular adaptations and strength gains following resistance exercise training. In Proceedings of the fourth international wheyconference. Elmhurst, IL, USA: American Dairy Products Institute. Chicago, USA, 2004, (pp. 36–46).
- (23) Castells Maria Laura, Desarrollo de productos a partir del suero de quesería. VI Foro del Sector Lechero Ecuatoriano. Ecuador, 2014.
- (24) Chatterton, Dew. Digestion of novel milk protein ingredients for use in infant formulas: Relationship to bioactivity. In Proceedings of the fourth international whey conference, Elmhurst, IL, USA: American Dairy Products Institute. Chicago, USA, 2012, (pp. 170–184).
- (25) CHR-HANSEN. Ficha técnica L-Casei-01 (2011).
- (26) Curry, Brook; y Vicent, Crow. Lactobacillus spp. In: Roginski, H., Fuquay, J and Fox, P. Encyclopedia of Dairy Sciences. Elsevier. Londres, 2010, p. 1479-1511.
- (27) Daddaoua, Abdelali; Antonio, Zarzuelo; María, Suarez; Fermín, Medina; y Olga, Martinez-Agustin. Bovine Glycomacropeptide is anti-

inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *Journal of Nutrition* (2013), 135, 1164-1170.

- (28) Delgadillo, Fernando; John, De Roissart; Stefano, Torriani; Madelyn, Curk; y Dayna, Janssens. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *Bactéries lactiques*. De Roissart H, Luquet F. Volumen 1. France, 2014, p.25-27
- (29) Diario Hoy, Quito 2012, formato htm, disponible en internet: <http://www.hoy.com.ec/noticias-ecuador/lenutrit-una-bebida-de-suero-premiada-por-g20-555882.html>
- (30) Drgalic, Ida; Ljubica, Tratnik; y Rajka, Bozanic. Growth and Survival of probiotic bacteria in reconstituted whey, Zagreb, 2010, p. 171-179
- (31) Early, Robert. *Tecnología de los Productos Lácteos*, Acribia, Zaragoza, Segunda Edición. (2012)
- (32) Esquivel, Guillermo. Los probioticos ¿realidad o moda? *Cuadernos de Nutrición*. (2013). p. 24-25
- (33) Farnfield, Michelle; Kate, Carey; y David, Cameron-Smith. Whey protein supplementation and resistance training to enhance muscle growth in young and older adults. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, (2010). 14 (Suppl.), S69.
- (34) Faryabi, Babak; Scott, Mohr; Charles, Onwulata; y Steven, Mulvaney. Whey processing, functionality and health benefits. (2010), p. 213-215.

- (35) Fournier, David; Schwitzguebel, JP; Pert, Peringer. Effect of different heterogeneous inocula in acidogenic fermentation of whey permeate. *Biotechnol*, 2011, p. 627– 632.
- (36) Franchi, Oscar. (2010). formato htm, disponible en internet: <http://es.scribd.com/doc/47261459/Suero-de-lechepropiedades-y-usos>
- (37) Furtado, Múcio. Principais Problemas dos Queijos: Causas e Prevencao, Fonte comunicações e Editora, Sao Paulo (2011)
- (38) Galletta, Giovanni; Federico, Harte; Daniel, Molinari; Rossana, Capdevielle; y Washington, Diano. Aumento de la vida útil postcosecha de tomate usando una película de proteína de suero de leche. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* (2012). 6(002): 117-123.
- (39) Gandhi Darshmed; Rohid, Patel; Anil, Wadhwa; Nidhi, Bansal; Mandi, Kaur; y Gowthan, Kumar. Effect of agro-based by-products on production of lactic acid in whey permeate medium. *J. Food Sci.Technol.* (2010), p.292-295.
- (40) Gaon, David; Hugo, García; y Luis, Winter. Effect of *Lactobacillus* strains and *Saccharomyces boulardii* on persistent diarrhea in children. *Medicina (B Aires)*. (2013). 63, 293-298
- (41) García, Mariano; Rofolfo, Quintero; y Agustín, Munguía. *Biotecnología alimentaria*. México (2013), p. 6, 162.

- (42) Gill, Harsharnjit; y Martin, Cross. Anticancer properties of bovine milk. *British Journal of Nutrition*, (2010) 84, S161–S166.
- (43) Gillies MT. *Whey Processing and Utilization*. Noyes Data Corporation, New Jersey. (2011).
- (44) González, Carlos; Miguel, Becerra; Maite, Cháfer; Andres, Albors; Jose, Carot; y Amparo, Chiralt. Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. *Trends in Food Science y Technology* 2012.13(9-10): 334-340.
- (45) Gutiérrez Font Edgar, Desarrollo de una bebida de suero dulce derivado de la fabricación de queso fresco, fermentado con cultivos *Lactobacillus helveticus* y *Streptococcus salivarius* var *thermophilus* (TCC-20), adicionada con cultivos probióticos *Lactobacillus paracasei* subs. *paracasei* LC-01. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. (2012).
- (46) HA Ernest and Zemel Michael. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: Mechanisms underlying health benefits for active people. *Journal of Nutritional Biochemistry*, (2003). 14, 251–258.
- (47) Hammes Walter; y Cristhian, Hertel. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *Prokaryotes*. Tercera Edición. Editorial Springer. Volumen 4. (2011), p. 320-430.

- (48) Heine, Willi; Peter, Klein; y Paul, Reeds. The importance of alpha-lactalbumin in infant nutrition. *Journal of Nutrition*, (2013). 121, p. 277–283.
- (49) HUI, Y. *Dairy Science and Technology Handbook 1. Principles and properties*. Primera edición. VCH Published, New York. 2012, p. 398
- (50) Hinrichs, Ruth; Joachim, Gotz; Michael, Noll; Alan, Wolfschoon; Hermann, Eibel; y Horst, Weisser. Characterization of different treated whey protein concentrates by means of low-resolution nuclear magnetic resonance. *International Dairy Journal* 2011. 14(9): 817-827.
- (51) Ibrahim, Fatima; Elfadil, Babiker; Nabila, Yousif; y El, Tinay. Effect of fermentation on biochemical and sensory characteristics of sorghum flour supplemented with whey protein. *Food Chemistry* 2010. 92(2): 285-292.
- (52) Instituto Ecuatoriano de Normalización. *Suero de leche líquido. Requisitos*. NTE INEN 2594. Primera edición. Quito-Ecuador. (2011).
- (53) Jay, James. *Microbiología moderna de los alimentos*. Cuarta edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. (2010), p. 19-27, 106-108, 441-475.
- (54) Keating, Patrick. *Introducción a la Lactología*, Limusa, México. (2002).
- (55) Kisaalita, William; Kenneth, Pinder. L. Influence of whey protein on continuous acidogenic degradation of lactose. *Biotechnol. Bioeng.* (2010), p. 642–645.

- (56) Kosikowski, Frank. Cheese and Fermented Milk Foods. Segunda Edición. Kosikowski and Associates, New York, USA, 2011, p. 21.
- (57) Konig, Helmut. Uden Gottfried and Frohlich, Jurgen. Lactic acid bacteria. Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Primera Edición. Springer Editorial, Mainz, Germany, 2010. p. 3-30.
- (58) Langhendries, Jean Paul. Effect of a fermented infant formula containing viable bifidobacteria on the fecal flora composition and pH of healthy full-term infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr. Amberes, Netherlands, 2013, p. 177 – 181.
- (59) Laursen, Inga; Per, Briand and Anne, Lykkesfeldt. Serum albumin as a modulator of the human breast cancer cell line MCF-7. Anticancer Research. Copenhagen, Denmark, 2010, p. 343-352.
- (60) Lee, Siew Kim and Skelte, Anema. The effect of the pH at cooking on the properties of processed cheese spreads containing whey proteins. Food Chemistry. Palmerston North, New Zealand, 2011, p. 1373-1380.
- (61) Linden, Guy y Denis, Lorient. Bioquímica Agroindustrial: revalorización alimentaria de la producción agrícola. Editorial Acribia, Zaragoza, España, 2012, p. 454.
- (62) Lloyd, Beate. Aplicación de productos de suero lácteo en formulas infantiles. Soluciones de investigación mundial. Johnstown, EE.UU, 2010, p. 7.

- (63) Malaspina, Fabrizio; Carmela, Cellamare and Andrea Tilche. Anaerobic treatment of cheese-whey with a downflow-upflow hybrid reactor. *Bioresource Technology*. Bologna, Italia, 2013, p. 131–139.
- (64) Markus, Rob; Oliver, Berend; Geert, Panhuysen; Jan Van der, Guten; Martine, Alles and Adriaan, Tuiten. The bovine protein alfa-lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress. *Am J Clin Nutr*. Utrecht, Nederland, 2010, p.1536-44.
- (65) Mcintosh, Graeme; Garland, Regester; Rong, Le Leu; Royle Parker and Gautier Smithers. Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats (Part 1). *Journal of Nutrition*. Maine, USA, 2010, p. 21 .
- (66) Mcintosh, Graeme; Garland, Regester; Rong, Le Leu; Royle, Parker and Gautier Smithers. Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats (Part 2). *Journal of Nutrition*. Maine, USA, 2010, p. 56.
- (67) Meisel, Hans. Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Current Medicinal Chemistry*. Karlsruhe, Germany, 2010, p. 1905-1919.
- (68) MIPRO, Políticas industriales en el sector de alimentos, 2013, formato PDF, disponible en internet: <http://www.scpm.gob.ec/wp->

content/uploads/2013/09/2.6-David-Villegas-MIPRO-Politica-Industrial-de-Desarrollo-en-el-Sector-de-Alimentos.pdf

- (69) Mohan, Ruchika; Corinna, Koebnick; Janko, Schildt. Effects of Bifidobacterium lactis Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. Journal Clinical of Microbiology. Berlin, Germany, 2012, p. 4025-4031.
- (70) Morais, Joaquim. Estudio de adecuación de cepas lácticas autóctonas aisladas de leche cruda de oveja Guirra para la elaboración de queso. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España, 2012, p. 38-40.
- (71) Nakajima, Kouhei; Tamura, Norimitsu; Kobayashi-Hattori, Kazuo; Yoshida, Tadashi; Hara-Kudo, Yukiko; Ikedo, Masanari; Sugita-Konishi, Yoshiko and Hattori, Makoto, Prevention of intestinal infection by Glycomacropeptide. University of Agriculture and Technology. Kyoto, Japan, 2010, p. 2294-2301.
- (72) Ohr, Linda. Nutraceuticals and functional foods. Food Technology. Chicago, USA, 2011, p. 71–74.
- (73) Oliveira, Jorge. Extensores en la industria cárnica, 2010, formato htm, disponible en internet: <http://oliveiragarzon.blogspot.com/2009/11/extensores-en-la-industria-carnica.html>

- (74) Ozdemir, Mahmut and John, Floros. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties. *Journal of Food Engineering*. Istanbul, Turkey, 2011, 116-123.
- (75) Panesar, Parmjit; John, Kennedy; Charles, Knill and Maria, Kosseva. Production of L(+) Lactic Acid using *Lactobacillus casei* from Whey. School of Chemical and Bioprocess Engineering University College Dublin. Volume 53, Dublin, United Kingdom, 2010, p. 219-226.
- (76) Parra, Ricardo. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Grupo de Investigación en Química y Tecnología de los alimentos de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja, Colombia, 2010, p. 96-98.
- (77) Parra, Ricardo. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. Escuela de Ciencias Químicas de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja, Colombia, 2011, p. 4970-4972.
- (78) Pal Sebely, Vanessa Ellis, and Satvinder Dhaliwal. "Effects of whey protein isolate on body composition, lipids, insulin and glucose in overweight and obese individuals." *British Journal of Nutrition*. Perth, Australia, 2010, p. 716-723.
- (79) Patiño, Jose. *Metabolismo, Nutrición y Shock*. Cuarta Edición. Bogota, Colombia, 2012, p. 438.

- (80) Pins, Joel; Joseph Keenan. The effects of hydrolyzed whey peptides on cardiovascular disease risk factors in mildly hypertensive men and women. Proceedings of the fourth international whey conference. Elmhurst, USA, 2011, p. 99–114.
- (81) Playford, Raymond. Bovine colostrum is a health food supplement which prevents NSAID induced gut damage. London, England, 2010, p. 653–658.
- (82) Prescott, Lansing; John, Harley; Donald, Klein. Microbiología. Cuarta Edición. Editorial Mc-Graw-Hill Interamericana. Zaragoza, España, 2012, p. 515-518.
- (83) Prioult, Guénolée; Sophie, Pecquet; Ismael Fliss . Stimulation of interleukin-10 production by acidic beta-lactoglobulin-derived peptides hydrolyzed with *Lactobacillus paracasei* NCC2461 peptidases. Quebec, Canada, 2010, p.32-35.
- (84) Ranki, Dan and Alice, Darragh. Dietary protein in an endurance exercise recovery beverage—What is the value of whey?. American Dairy Products Institute. Elmhurst, USA, 2010, p. 13–24.
- (85) Regester, Geoffrey and David, Belford. New therapeutics from a dairy by product—Cheese whey. Drug Development Research. Volume 46, North Adelaide Australia, 2010, p. 286–291.
- (86) Regester, Geoffrey and David, Belford. Development of minor dairy components as therapeutic agents: Whey growth factor extract, a case

- study. Australian Journal of Dairy Technology. Volume 58. North Adelaide, Australia, 2013, p. 104–106.
- (87) Renner, Edmund and El-Salam, Abd. Applications of ultrafiltration in the dairy industry. Elsevier Applied Science. London, United Kingdom, 2012,p. 268.
- (88) Ruales, Jenny. Desarrollo tecnológico para la concentración y secado de suero en ecuador. Dept. Ciencia de Alimentos y Biotecnología de la Escuela Politécnica Nacional. VI Foro del sector lechero ecuatoriano. Quito, Ecuador, 2014.
- (89) Rungsinee, Sothornvit; Jong, Whan Rhim and Seok, In Hong. Effect of nano-clay type on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/clay composite films. Journal of Food Engineering Volume 91. Muangun, Korea, 2010, p. 468-473.
- (90) Saavedra, José; Adel, Abi-Hanna and Nancy, Moore. Long term of consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. The American Journal of Clinical Nutrition. Volumen 79. New York. USA, 2013, p. 261-267.
- (91) Salminen, Seppo. Lactic Acid Bacteria in Health and Disease, Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspect. Second Edition. Marcel Dekker, New York, USA, 2013, p.11-16.
- (92) Schmidt, Erica. Aprovechamiento del lactosuero: aspectos vinculados a su calidad como materia prima e impacto ambiental, 2010, formato

htm, disponible en internet:

<http://www.inti.gov.ar/lacteos/pdf/Calidad.pdf>

- (93) Siezen, Roland. Multi - domain, cell - envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. Volumen 76. Nijimegen, Holanda, 2010, p. 139 – 155.
- (94) Sipola, Marika; Piet, Finckenberg; Heikkim Vapaatalo; Anne, Pihlanto-Leppälä; Hann, Korhonen; Riitta, Korpela and Marja-Leena ,Nurminen. α -lactorphin and β -lactorphin improve arterial function in spontaneously rats . *Life Sciences*. Volumen 71, Helsinki, Finlandia, 2012, p. 1245-1253.
- (95) Sipola, Marika; Piet, Finckenberg; Heikkim Vapaatalo; Anne, Pihlanto-Leppälä; Hann, Korhonen; Riitta, Korpela and Marja-Leena ,Nurminen. Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *J. Dairy res.* Volume 69. Helsinki, Finland, 2012, p. 103-111.
- (96) Situación del Lactosuero en el Ecuador, 2010, formato htm, disponible en internet: <http://www.burodeanálisis.com/2010/12/10/el-suero-de-leche-amenaza-al-productor-y-al-consumidor/>
- (97) Sloan, Elizabeth. Top 10 Functional Food Trends. *Food Technology*. Volume 18, Chicago, USA, 2010, p. 22-40.

- (98) Smilowitz, Jennifer; Cora Dillard and Bruce, German. Milk beyond essential nutrients: The metabolic food. *Australian Journal of Dairy Technology*. Volume 60. Sidney, Australia, 2011, p. 77–83.
- (99) Smithers, Geoffrey. Isolation of growth factors from whey and their application in the food and biotechnology industries—A brief review. *International Dairy Journal*. Volume 389. Melbourne, Australia, 2013, p. 16–19.
- (100) Spahn, Gissella; Rosa, Baeza; Liliana Santiago and Ana, Pilosof. Whey protein concentrate/ λ -carrageenan systems: Effect of processing parameters on the dynamics of gelation and gel properties. *Food Hydrocolloids*. Volumen 22. Santa Fe, Argentina, 2010, p.1504-1512.
- (101) Spreer, Edgar. *Lactología Industrial, Caracteres, composición y estructura de la leche*. Segunda Edición. Editorial Acribia, Zaragoza, España, 2011, p. 371-372
- (102) Takeuchi, Takashi; Hiroshi, Kitagawa and Etsumori, Harada. Evidence of lactoferrin transportation into blood circulation from intestine via lymphatic pathway in adult rats. *Exp Physiol*. Volumen 89. Tottori Japan, p. 263-270.
- (103) Tecnología de membranas Portal Lechero, 2013, formato htm, disponible en internet: <http://www.portalechero.com/innovaportal/v/3374/1/innova.front/tecnolo>

gia_de_membranas:_aplicables_a_la_recuperacion_de_productos_de
_corrientes_liquidadas:.html

- (104) Tipton, Kevin; Tabatha, Elliott; Melanie, Cree; Steven, Wolf; Arthur, Sanford and Robert, Wolfe. Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Volume 36. Gavelston, Texas, 2011, p. 2073-2081.
- (105) Tome, Daniel. Whey proteins and their consequences in weight control, glucose homeostasis, and insulin sensitivity. American Dairy Products Institute. Chicago, USA, 2012, p. 70-81.
- (106) Veisseyre, Roger. *Lactología técnica*. Segunda Edición. Editorial Acribia, Zaragoza, España, 2012. p: 372-374.
- (107) Zimecki Michal. Lactoferrin increases the output of neutrophil precursors and attenuates the spontaneous production of TNF-alpha and IL-6 by peritoneal blood cells. *Arch Immunol Ther Exp*. Volume 47. Pennsylvania, USA, 2011, p. 113-118.
- (108) Zinoviadou Kiki and Costas Biliaderis. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Science*. Volume 82. Salónica, Grecia, 2010, p. 338-345.
- (109) Zudaire, Maite. Proteína de suero de leche para aumentar músculo, 2011, formato htm, disponible en internet:

[http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comer_bien/
deporte/2011/08/30/202696.php](http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comer_bien/deporte/2011/08/30/202696.php)