



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL HIPOCOLESTEROLÉMICO
DE UNA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA DURANTE SU
PERFILAMIENTO TECNOLÓGICO Y VIDA ÚTIL**

Por:

Miguel Enrique Pérez Blanco

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

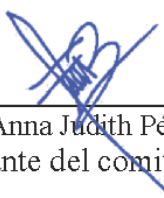
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Miguel Enrique Pérez Blanco, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias



Dr. Aaron Fernando González Córdova
Director de tesis



Dra. Belinda Vallejo Galland
Integrante del comité de tesis



Dra. Anna Judith Pérez Báez
Integrante del comité de tesis



M. en C. Ricardo Reyes Díaz
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Evaluación del Potencial Hipocolesterolémico de una Bebida Láctea Fermentada durante su Perfilamiento Tecnológico y Vida Útil” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Miguel Enrique Pérez Blanco, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos

Dra. Graciela Caire Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico que me concedió durante mi trabajo en el programa de maestría en ciencias, aún como extranjero.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) por recibirme y darme la oportunidad de obtener el grado de maestro en ciencias.

Al Dr. Aarón Fernando González Córdova por aceptarme en su grupo de trabajo, apoyarme durante todo el proceso del posgrado y permitirme desarrollar un proyecto con base en mis intereses profesionales.

A mis asesores, la Dra. Belinda Vallejo Galland, la Dra. Anna Judith Pérez Báez, el M. en C. Ricardo Reyes Díaz, el Dr. Adrián Hernández Mendoza y la M. en C. Libertad Zamorano García, por apoyarme en las reuniones de comité y ayudarme a resolver dudas durante el posgrado.

A la M. en C. María del Carmen Estrada Montoya, los Drs. María de Jesús Torres Llenez, Miguel Mazorra Manzano, Manuel Vargas Ortiz, Jose Isidro Méndez Romero, Joel Said García Romo, Lourdes Santiago López, Lilia María Beltrán Barrientos por su apoyo técnico y profesional durante diferentes etapas del posgrado.

Al panel entrenado de evaluación sensorial que me apoyó a llevar a cabo la formulación del prototipo, así como la evaluación de vida útil de la bebida: Amelia Alejandra López, Ramsés de Jesús Cruz Valencia, Juan de Dios Colorado González, Teresita Castillo, Jesús Ayala Zavala, Lourdes Santiago López, Daniela Medina, Adrián Hernández Mendoza, Manuel Vargas Ortiz, Juan Pablo Durazo Moreno, Lilia María Beltrán Barrientos, Oscar Espejel Espejel, Maritza Castro Salomón, Joel Said García Romo y Ricardo Reyes Díaz

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Calidad y Autenticidad de los Alimentos, y Química y Biotecnología de Productos Lácteos. En especial al M en C. Jesús Ayala Zavala, al Q.A. Juan Pablo Durazo y al Dr. Miguel Ángel Rendón Rosales por su apoyo en el laboratorio en momentos difíciles, dentro y fuera del trabajo. Todos formaron una parte importante de mi formación como tecnólogo en alimentos. ¡Viva la casa de los Lactosos!

A mi familia, mis padres Julio César Pérez Fuentes y María Antonieta Blanco de Pérez y a mis hermanos Juan Andrés Pérez Blanco y Luis Daniel Pérez Blanco, por su apoyo incondicional

durante mi proceso de mudanza a Hermosillo y todo el tiempo que pasé aquí, completando la maestría. Sin ellos, nada de lo que hago sería posible.

A mi esposa, Camila Andrea Gassan Ramos, la que me apoyó desde el día 1 en este proceso, la que me ayudó a encontrar la manera de seguir empujando cuando las cosas se ponían difíciles. Gracias a ti pude convertirme en mejor persona emocional y profesionalmente. Gracias.

A mi familia adquirida, Camilo Miguel Gassan Bello, Karina Yudith Ramos Subero, Karen Andrea Gassan Ramos, Edgar Yael Barrera Palacios y Julia Sofía Barrera Gassan, por recibirme en Hermosillo y tratarme siempre como un hijo/hermano más.

A todos mis compañeros y amigos con los que compartí momentos durante este tiempo en México. En el CIAD, en el fútbol, en el pádel y en la fiesta. Disfruté cada uno de esos momentos.

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
CONTENIDO.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE CUADROS.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. ANTECEDENTES.....	15
2.1. Retos que Presenta la Formulación de una Leche Fermentada.....	15
2.1.1. Retos de Olor.....	15
2.1.2. Retos de Sabor.....	16
2.1.3. Retos de Textura.....	17
2.1.4. Retos de Vida Útil.....	18
2.2. Cambios en las Propiedades Funcionales de un Alimento Fermentado Durante su Procesamiento.....	19
2.3. Productos Lácteos Fermentados como Coadyuvantes en la Salud Cardiovascular: ¿Qué Falta?.....	20
2.4. Perfilamiento Tecnológico de una Bebida Láctea Fermentada con Efecto Hipocolesterolémico.....	22
3. HIPÓTESIS.....	26
4. OBJETIVOS.....	27
4.1. Objetivo General.....	27
4.2. Objetivos Específicos.....	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.1. Elaboración de Leches Fermentadas.....	28
5.1.1. Cultivo Láctico Iniciador y Fermentación de la Leche.....	28
5.1.2. Formulación de la Leche Fermentada.....	28
5.2. Análisis Sensorial.....	29
5.2.1. Selección y Entrenamiento del Panel Sensorial.....	29
5.2.2. Evaluación Sensorial de Textura.....	30
5.2.3. Evaluaciones Sensoriales de Dulzor y Sabor.....	31
5.2.4. Evaluación Sensorial de Percepción General.....	32
5.3. Evaluación de Vida Útil.....	33
5.3.1. Producción y Formulación de Leche Fermentada.....	33
5.3.2. Análisis Microbiológico.....	33

CONTENIDO (continuación)

5.3.3. Análisis Físico-Químico.....	34
5.3.4. Evaluación de Inhibición Micelar de Colesterol <i>In vitro</i>	34
5.3.5. Estimación de Vida Útil de la Leche Fermentada.....	36
5.4. Análisis Estadístico.....	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
6.1. Análisis Sensoriales.....	38
6.1.1. Entrenamiento del Panel Sensorial.....	38
6.1.2. Evaluación Sensorial de Textura.....	39
6.1.3. Evaluación Sensorial de Dulzor.....	42
6.1.4. Evaluación Sensorial de Sabor.....	43
6.1.5. Evaluación Sensorial de Percepción General.....	44
6.2. Vida Útil.....	46
6.2.1. Análisis Microbiológico.....	46
6.2.2. Análisis Físico-Químico.....	48
6.2.3. Evaluación de Inhibición Micelar de Colesterol <i>In vitro</i>	51
6.2.4. Estimación de Vida Útil.....	53
7. CONCLUSIONES.....	61
8. RECOMENDACIONES.....	62
9. REFERENCIAS.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1	Proceso de desarrollo de alimentos funcionales.....23
2	Escalas de intensidad y DFC utilizadas en el entrenamiento del panel sensorial.....30
3	DFC de las leches formuladas con inulina y goma guar.....40
4	DFC de las 4 leches restantes formuladas con inulina y goma guar.....41
5	Nivel de agrado de las leches fermentadas formuladas con 0, 0.5 y 1% de estevia.....42
6	Nivel de agrado de las leches fermentadas formuladas con 0, 0.5 y 1% de saborizante de fresa.....44
7	Percepción general de las leches fermentadas formuladas según el cuadro 8.....46
8	Valores de pH a través de las 6 semanas de almacenamiento en las leches fermentadas formuladas, almacenadas a 20, 30 y 40 °C.....50
9	Sinéresis a través de las 6 semanas de almacenamiento en las leches fermentadas formuladas, almacenadas a 20, 30 y 40 °C.....51
10	Porcentaje de inhibición de micelas de colesterol en las leches fermentadas durante el estudio de vida útil.52
11	Calidad sensorial de las leches fermentadas almacenadas a 20 °C durante 40 días.....53
12	Calidad sensorial de las leches fermentadas almacenadas a 30 °C durante 40 días.....54
13	Calidad sensorial de las leches fermentadas almacenadas a 40 °C durante 40 días.....54
14	LN de calidad sensorial en función del tiempo de almacenamiento a 20 °C por 40 días.....56
15	LN de calidad sensorial en función del tiempo de almacenamiento a 30 °C por 40 días.....56
16	LN de calidad sensorial en función del tiempo de almacenamiento a 40 °C por 40 días.....57
17	LN de k en función de las temperaturas de almacenamiento.....58
18	LN de la vida útil en función de la temperatura de almacenamiento.....59

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Estudios previos de leches fermentadas por <i>L. lactis</i> NRRL B-50572.....	21
2 Niveles de cada ingrediente utilizados para evaluaciones sensoriales	29
3 Formulaciones evaluadas para fijar niveles de agentes texturizantes	31
4 Escala hedónica de 7 puntos utilizada para pruebas de dulzor y sabor.....	32
5 Formato utilizado para evaluar atributos y percepción general de las leches fermentadas.....	32
6 Escala de Karlsruhe utilizada para la evaluación de calidad sensorial de las leches fermentadas a diferentes temperaturas de almacenamiento.....	37
7 Valores obtenidos en las diferentes pruebas y sesiones de entrenamiento del panel sensorial.....	39
8 Formulaciones evaluadas bajo el atributo de percepción general.....	45
9 Crecimiento de hongos y levaduras y coliformes totales y fecales en las leches fermentadas formuladas almacenadas a 20, 30 y 40 °C.....	47
10 Conteo de BAL en la leche fermentada formulada almacenada a 20, 30 y 40 °C....	48
11 Composición de la leche fermentada con <i>L. lactis</i> NRRL B-50572, antes y después del estudio de vida útil acelerada.....	48
12 Constantes de velocidad de reacción de deterioro (k) para la calidad sensorial en cada una de las temperaturas de almacenamiento.....	57
13 Valores estimados de vida útil para las leches fermentadas formuladas, almacenadas a diferentes temperaturas.....	59

RESUMEN

Estudios previos han demostrado que una leche fermentada por *Lactococcus lactis* NRRL B-50572 puede tener efectos hipocolesterolémicos *in vitro* e *in vivo*. Estos efectos se han atribuido a la presencia de péptidos derivados de la fermentación, los cuales podrían ejercer esta actividad mediante distintos mecanismos. Además, se han realizado evaluaciones sensoriales de esta bebida; sin embargo, los resultados poco favorables exigen un nuevo enfoque para el diseño de un prototipo aceptable. El desarrollo de un producto con la capacidad de reducir los niveles de colesterol, además de contar con un buen perfil sensorial y una vida útil larga es de gran importancia debido a la alta prevalencia de hipercolesterolemia a nivel mundial. Es por esto, que el objetivo del presente estudio fue perfilar tecnológicamente una bebida láctea fermentada con potencial hipocolesterolémico y determinar su vida útil. Para cumplir con el objetivo, se fermentó leche descremada UHT con la cepa *L. lactis* NRRL B-50572 por 48 h, a la cual se le agregaron inulina, goma guar, estevia y saborizante de fresa en diferentes proporciones. La mejor formulación fue seleccionada basado en resultados de evaluaciones sensoriales con un panel entrenado. Posteriormente, la fórmula elegida (1.0% inulina, 0.1% goma guar, 0.5% estevia y 0.5% saborizante de fresa) se sometió a un estudio de vida útil acelerada, en donde se evaluaron parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y sensoriales de las bebidas almacenadas a 10, 20 y 30 °C durante 12 semanas. No se encontró la presencia de microorganismos en ninguna de las muestras durante el periodo de almacenamiento. De manera congruente, tampoco hubo cambios ($p > 0.05$) en los valores de pH. Los datos obtenidos de las evaluaciones sensoriales fueron utilizados para estimar, mediante el modelo matemático de Arrhenius, la vida útil (165 días) de la leche fermentada almacenada a 4 °C. Obteniendo así un prototipo de leche fermentada hipocolesterolémica con buena calidad sensorial y larga vida útil.

Palabras clave: Hipocolesterolémico, vida útil, evaluación sensorial, *Lactococcus lactis* NRRL B-50572, leche fermentada

ABSTRACT

Previous studies demonstrate that milk fermented by *Lactococcus lactis* NRRL B-50572 can have hypocholesterolemic effects in vitro and in vivo. These effects have been attributed to the presence of peptides derived from this fermentation process and they can exert this effect through many mechanisms. Additionally, sensory evaluations have been performed on this beverage, however, the results have not been favorable. The development of a product with the capacity to reduce cholesterol levels, and also have a good sensory profile and a long shelf-life is highly important due to the high percentage of the population who suffer from hypercholesterolemia. Thus, the objective of this study was to technologically develop a fermented milk beverage with hypocholesterolemic potential and determine its shelf-life. To achieve this, fat-free UHT milk was fermented by *L. lactis* NRRL B-50572 for 48 h, and inulin, guar gum, stevia, and strawberry flavor were added in specific proportions. Then, the best formula (1.0% inulin, 0.1% guar gum, 0.5% stevia, and 0.5% strawberry flavor) was selected via various sensory evaluations with a trained panel. This beverage was then studied in an accelerated shelf-life study where microbiological, physicochemical, and sensory parameters were evaluated in fermented milks stored at 10, 20, and 30 °C during 12 weeks. During this study, there was no presence of microorganisms at any condition of the storage at 10, 20, and 30 °C, nor any changes ($p > 0.05$) in pH in any of the fermented milks during the 12 weeks of storage. The values obtained from the sensory evaluations were used to estimate the shelf-life of the product using Arrhenius's mathematical model. The calculations resulted in an estimated shelf-life of 165 days stored at 4 °C for the fermented milk and the previously mentioned formula. The work done on this fermented milk, allowed for the development of a prototype for a beverage with hypocholesterolemic capacity, a good sensory profile and a long shelf-life.

Key words: Hypocholesterolemic, shelf-life, sensory evaluation, *Lactococcus lactis* NRRL B-50572, fermented milk

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte a nivel mundial (Roth *et al.*, 2020), causando la muerte de alrededor de 17.9 millones de personas anualmente (Timmis *et al.*, 2022). El colesterol elevado, específicamente las lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés), es un factor importante que aumenta el riesgo del desarrollo de las ECV (Timmis *et al.*, 2022). A pesar del uso masivo de estatinas y otros tratamientos farmacológicos para combatir los niveles elevados de colesterol, el problema de la hipercolesterolemia y las ECV persiste (Watts *et al.*, 2020). Aparte del tratamiento farmacológico, comúnmente se les recomienda a los pacientes realizar cambios de estilo de vida como eliminar el consumo de tabaco y alcohol, aumentar la actividad física y reducir el consumo de colesterol en la dieta (Carson *et al.*, 2020). En años recientes, ha surgido una tendencia hacia el consumo de alimentos funcionales que podrían coadyuvar a combatir problemas como la hipercolesterolemia y las ECV (Granato *et al.*, 2020).

Los alimentos funcionales cada día toman mayor relevancia, tanto en el área de investigación y medicina como en la industria de alimentos. En el caso de esta última, el mercado de estos alimentos funcionales, alcanzó los 304.5 mil millones de dólares en 2020, con un crecimiento anual promedio de 8.5% (Granato *et al.*, 2020). Dentro de la gama de productos funcionales, los productos lácteos (p. ej., yogurt y leches fermentadas), son de los más consumidos a nivel mundial (Birch y Bonwick, 2019). Este grupo de alimentos se ha caracterizado, desde hace tiempo por ser uno de los más completos debido a su composición de proteínas, lípidos y carbohidratos (Górska-Warsewicz *et al.*, 2019). Los productos lácteos funcionales se caracterizan por contener una gran diversidad de compuestos que han demostrado efectos potenciales en la salud. Estos compuestos pueden obtenerse por acción de enzimas proteolíticas, glucolíticas y lipolíticas durante la fermentación ácido láctica, digestión gastrointestinal y procesos tecnológicos en el posterior procesamiento del alimento (Kaur *et al.*, 2022; Minj y Anand, 2020; Rendón-Rosales *et al.*, 2019). El desarrollo de un alimento funcional es un proceso de múltiples pasos y en el que se involucran diversos factores (Granato *et al.*, 2020; Ospina, 2019). Uno de los puntos importantes a considerar es la aceptabilidad del producto final, por parte de los consumidores o población objetivo a la que el producto va dirigido (Ospina, 2019). En este punto, la tecnología de alimentos juega un papel importante para el diseño adecuado del producto, sin comprometer sus propiedades benéficas

(Carneiro *et al.*, 2021). En este sentido, para mantener la estabilidad del alimento se recurre, en algunas ocasiones, al uso de aditivos, los cuales ayudan a mejorar las características organolépticas y aumentar su aceptabilidad (Ospina, 2019). Sin embargo, la incorporación de ingredientes como gomas, edulcorantes y saborizantes pueden alterar la funcionalidad de los péptidos, ya que pueden prevenir su degradación enzimática y aumentar su estabilidad o pueden inhibir o reducir su absorción (Sun *et al.*, 2020). Con base en lo anterior, es importante considerar estas interacciones cuando se desarrolla un alimento funcional.

En este sentido, algunos estudios publicados han demostrado la potencial bioactividad de leches fermentadas con cepas específicas de *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) (Loaiza, 2013; Ospina, 2019; Rendón-Rosales *et al.*, 2023). El consumo de estos lácteos fermentados ha demostrado coadyuvar a disminuir el colesterol y la presión arterial; sin embargo, el perfilamiento tecnológico de estos productos es limitado (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2013; Rendón-Rosales *et al.*, 2023). Adicionalmente, hay estudios que han demostrado la multitud de funcionalidades de las leches fermentadas, pero al realizar un análisis sensorial, se obtuvieron resultados de baja aceptación (Jia *et al.*, 2022; Yirmibeşoğlu y Öztürk, 2020). En contraste, hay estudios en los que se han logrado obtener alta aceptación sensorial de sus productos lácteos fermentados, debido a que agregan aditivos como sacarosa, sorbato de potasio y aroma a fruta cítrica, entre otros (de Souza *et al.*, 2013; Lievore *et al.*, 2015; Rocha *et al.*, 2014). Esto demuestra que añadir aditivos puede aumentar la aceptación del producto, por lo que podría considerarse su posible incorporación en el diseño de nuevos alimentos fermentados funcionales.

Durante el desarrollo de estos alimentos, es importante monitorear la potencial actividad biológica, ya que el hecho que se mantenga es el objetivo principal de su diseño. En el caso de las leches fermentadas es importante considerar las posibles interacciones entre los péptidos bioactivos y los ingredientes añadidos (Sun y Udenigwe, 2020). Estudios previos han declarado que los péptidos responsables de la actividad hipocolesterolémica de la leche fermentada por *L. lactis* NRRL B-50572 podrían interactuar mediante interacciones hidrofóbicas con ácidos biliares, formando complejos insolubles (Rendón-Rosales *et al.*, 2019). Esto causa una disminución en la absorción del colesterol consumido. Diferentes ingredientes como los carbohidratos, podrían interactuar mediante interacciones hidrofóbicas con estos péptidos y potencialmente tener un efecto sobre la actividad hipocolesterolémica de la leche fermentada (Schaller-Povolny & Smith, 2002; Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2012; Gupta & Variyar, 2018). En este sentido, el propósito de este

trabajo es evaluar los retos de la formulación de una leche fermentada y los posibles efectos que puede tener la incorporación de algunos ingredientes sobre la potencial actividad biológica de la bebida.

2. ANTECEDENTES

2.1. Retos que Presenta la Formulación de una Leche Fermentada

El principal objetivo en la elaboración de alimentos ha sido cumplir con los requisitos nutricionales básicos del cuerpo, y a esto se suma las características sensoriales para lograr diversificar los productos que ofrece la industria hacia diferentes sectores de la población (Baker *et al.*, 2022). Sin embargo, la creciente demanda en la búsqueda de alimentos coadyuvantes en la salud ha llevado a la industria alimentaria a crear nuevos alimentos funcionales, lo que implica un reto para la tecnología de alimentos (Granato *et al.*, 2020). Si bien, el perfil sensorial no es lo primero que se evalúa al diseñar alimentos funcionales, sí es un factor clave para que aquel alimento que presente propiedades benéficas, pueda ser aceptado por la población en general o el público al que va dirigido. Por ejemplo, Carneiro *et al.*, (2021) explicaron que el perfilamiento sensorial de un alimento funcional es de igual importancia que su bioactividad. En este sentido, el uso de la fermentación ácido láctica para el desarrollo de productos lácteos, genera compuestos volátiles y amino ácidos libres, los cuales podrían favorecer la aceptabilidad de productos lácteos (Zhang *et al.*, 2020). Los compuestos generados son responsables de las características de olor, sabor, textura y apariencia de la leche fermentada (Beltrán-Barrientos *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020). Cada uno de estos parámetros presenta un reto que se debe considerar durante la formulación de la leche fermentada funcional.

2.1.1. Retos de Olor

A pesar de que la aceptación sensorial de los alimentos depende de varios parámetros, el olor mantiene gran importancia en la evaluación sensorial de leches fermentadas (Beltrán-Barrientos *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020). La fermentación ácido láctica de la leche, utilizando bacterias ácido lácticas (BAL) específicas con capacidad proteolítica, glucolítica y lipolítica, ayuda a que se

degraden los compuestos de la leche y se generen compuestos volátiles responsables del sabor y aroma (Beltrán-Barrientos *et al.*, 2019; Ranadheera *et al.*, 2019). Las proteínas, por ejemplo, pueden ser hidrolizadas para generar aminoácidos, los cuales son precursores importantes de ácidos carboxílicos, aldehídos, cetonas, alcoholes y ésteres, que juegan un papel importante en la generación de aroma y sabor de un alimento (Wu *et al.*, 2023). Además, se generan otros compuestos volátiles específicos (Zhang *et al.*, 2020) que deben ser caracterizados para tomarlos en cuenta durante la formulación de un producto.

En los productos lácteos fermentados se pueden detectar una gran diversidad de volátiles que son responsables de olores deseados y no deseados. Dependiendo del tipo de BAL que se use en la fermentación y, de su nicho de aislamiento, se pueden obtener notas aromáticas distintas debido a las enzimas y mecanismos por los cuales la bacteria genera los compuestos volátiles (Kleerebezem *et al.*, 2020). Por ejemplo, en leches fermentadas con *L. lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572, aisladas de quesos artesanales mexicanos, se registró una mayor intensidad para los descriptores de olor a queso y fermentado en comparación con una leche no fermentada (Beltrán-Barrientos *et al.*, 2019). También, en leches fermentadas con diferentes cepas de *Streptococcus thermophilus* se registraron aromas como a: leche, queso, cremoso y fermentado (Liu *et al.*, 2022). Cada cepa de BAL produce una combinación distinta de compuestos volátiles que pueden ser percibidos como aceptables o no aceptables (Yirmibeşoğlu y Öztürk, 2020).

2.1.2. Retos de Sabor

Los consumidores le dan alta importancia a las propiedades de sabor y aroma al elegir un producto alimentario (Birch y Bonwick, 2019; Topolska *et al.*, 2021). Igual que con el olor, las reacciones catabólicas de la fermentación ácido láctica generan compuestos volátiles y no volátiles que le dan el sabor característico a la leche fermentada (Ranadheera *et al.*, 2019). La acidez de los productos lácteos fermentados, que proviene mayormente del ácido láctico generado, es de los aspectos más importantes que se evalúan para determinar su calidad (Dan *et al.*, 2019). No obstante, debido a su baja estabilidad, los compuestos responsables del sabor pueden verse alterados según el tratamiento que se le aplique (Abesinghe *et al.*, 2019). Además, los procesos térmicos aplicados para detener

la fermentación, procesos de homogeneización y las temperaturas de almacenamiento, pueden tener un efecto directo en el sabor percibido por el consumidor (Coolbear *et al.*, 2022). Por ende, es esencial tomar en cuenta no solo los sabores que se buscan obtener mediante la formulación, sino también, cómo los procesos que se le aplican al producto durante su elaboración pueden alterarlos.

Entre los compuestos que están presentes en mayor concentración y diversidad en los productos lácteos fermentados, son los péptidos, los cuales son responsables de brindar sabor en estos productos. Estos péptidos, pueden ser los responsables del sabor agrio, umami o hasta dulce que son los mismos que pueden tener una actividad biológica (Li *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2019). Sin embargo, los péptidos no son los únicos compuestos que pueden proveer sabor en un alimento.

Aparte de los péptidos presentes tras la fermentación, existen otros componentes como ácidos carboxílicos, aldehídos, cetonas, alcoholes y ésteres que confieren sabor al producto (Dan *et al.*, 2019; Ranadheera *et al.*, 2019). El tipo y cantidad de compuestos que se generan durante la fermentación varía dependiendo de la cepa que se use para fermentar (Dan *et al.*, 2019) y esta variabilidad es lo que determina el sabor percibido y su intensidad. Los ácidos que se generan durante la fermentación tienen un rango de sabores amplios. Por ejemplo, el ácido acético tiene un sabor a vinagre, mientras que el ácido caproico tiene un sabor a rancio (Ranadheera *et al.*, 2019). Los compuestos obtenidos durante la fermentación de estos productos lácteos tienen combinaciones de sabores infinitas que deben ser identificadas en cada uno de los productos para poder encontrar la fórmula óptima para su aceptación por los consumidores.

2.1.3. Retos de Textura

La textura es un parámetro de interés para los consumidores de productos lácteos fermentados. Es una propiedad que puede variar considerando el tiempo de fermentación. Las proteínas y péptidos de la leche juegan un papel importante para brindar textura a la leche fermentada y cualquier alteración a estas moléculas puede causar cambios importantes (Szajnar *et al.*, 2020). En un estudio, por ejemplo, la fermentación de leche de cabra por más de 18 horas causó una precipitación de las

proteínas y disminuyó drásticamente la viscosidad de la bebida, lo que causa que la leche no se pueda homogeneizar (Jia *et al.*, 2022). Además, como producto de la fermentación, las BAL generan exopolisacáridos, los cuales han demostrado tener un efecto directo sobre la textura de productos lácteos fermentados (Jurášková *et al.*, 2022). Estos tienen una alta capacidad de absorción de agua y son considerados espesantes naturales. También, el procesamiento de la leche después de su fermentación, como es el tratamiento térmico, puede afectar la textura del producto fermentado. El tratamiento térmico que se aplica en la leche puede afectar directamente las interacciones entre moléculas del alimento y puede alterar la firmeza, consistencia y viscosidad (Hovjecki *et al.*, 2020). La metodología utilizada para la elaboración de la leche fermentada es parte de la base del perfil de textura del producto. Las características de textura de cada alimento lácteo fermentado pueden variar según la cepa bacteriana del cultivo añadido y la fuente de la leche utilizada (Farag *et al.*, 2022).

Aparte del procesamiento del producto, los ingredientes utilizados en su formulación también podrían afectar la textura. La adición de frutas a las leches fermentadas influye en la textura y sensación debido al contenido de azúcar y pectina (Farag *et al.*, 2022). Por otro lado, la adición de vitamina C puede afectar la firmeza, adhesividad y elasticidad según la fuente de la cual se obtiene (Znamirowska *et al.*, 2021). Uno de los retos que se pueden presentar al incorporar ciertos ingredientes, es que pueden tener una consistencia distinta, la textura se vuelve granulosa y genera una sensación arenosa en la boca (Farag *et al.*, 2022). A su vez, puede haber ingredientes que mejoran otras características sensoriales del alimento, sin afectar la textura del mismo (Papaioannou *et al.*, 2022). Todos estos parámetros deben ser considerados y abordados durante el desarrollo de un alimento funcional, como una leche fermentada, ya que pueden causar una disminución en la aceptabilidad del mismo.

2.1.4. Retos de Vida Útil

La vida útil de un producto se define como el tiempo de almacenamiento en el que el alimento mantiene sus características sanitarias, sensoriales y nutricionales (Giménez *et al.*, 2012). En el punto de envasado, el producto está en la versión óptima para su consumo; sin embargo, con el

paso del tiempo, el alimento puede ir cambiando sus propiedades, dependiendo del tipo de alimento y procesamiento que se ha realizado. Yang *et al.* (2023), reportaron que, en leches fermentadas con diferentes cepas de BAL, el pH disminuyó entre los días 1 y 28 de almacenamiento en refrigeración, así como la textura también se vio afectada. Además, las condiciones de almacenamiento a temperaturas entre 10 y 30 °C, puede causar una sinéresis en la leche fermentada; pero, niveles elevados de ácidos orgánicos, coadyuvan a reducir la actividad microbiana durante el tiempo de almacenamiento (Ospina, 2019). Es por ello que, como parte de las estrategias en la elaboración de alimentos, es importante considerar las condiciones de almacenamiento y procesamiento del producto, ya que esto podría tener un gran efecto en las propiedades organolépticas del alimento. La aplicación de tratamientos térmicos puede ser una estrategia para lograr un mayor tiempo de vida útil de un producto lácteo (Ospina, 2019; Yang *et al.*, 2023). El manejo del producto en condiciones asépticas y el uso de la pasteurización puede alargar la vida útil de las leches (Bezie, 2019). No obstante, Coolbear *et al.* (2022) describieron cómo estos tipos de tratamientos térmicos pueden oscurecer la leche y caramelizar los azúcares mediante reacciones de Maillard, lo cual cambia por completo sus propiedades organolépticas. La idea durante la formulación y el procesamiento del alimento, es encontrar el equilibrio entre las características sensoriales deseables y una vida útil alargada.

2.2. Cambios en las Propiedades Funcionales de un Alimento Fermentado Durante su Procesamiento

La capacidad que tiene un compuesto bioactivo de actuar en el organismo está relacionada con su bioaccesibilidad y capacidad de resistir las condiciones del tracto gastrointestinal (Rivero-Pino, 2023). Sin embargo, existen varios factores que pueden afectar la biodisponibilidad y bioaccesibilidad del compuesto de interés, entre ellos: la susceptibilidad a hidrólisis de proteínas y péptidos, la presencia de mucina en los órganos de absorción y su interacción con la matriz alimenticia (Udenigwe *et al.*, 2021). Adicional a estos factores, la incorporación de ingredientes al alimento aumenta las posibles interacciones entre los componentes bioactivos y la matriz alimentaria. Estas interacciones entre los aditivos y los compuestos bioactivos podrían alterar la

biodisponibilidad y, por ende, el potencial benéfico que conlleva el alimento (Sun *et al.*, 2020). Es por ello que es importante considerar las interacciones que podrían ocurrir durante la formulación de un alimento y cómo estas podrían alterar la funcionalidad del alimento al ser consumido.

Algunos estudios publicados sobre el tema, explican que los péptidos y moléculas presentes en el alimento fermentado pueden interactuar con los aditivos que se incorporan y, por tanto, pueden alterar la bioactividad, principalmente de péptidos (Udenigwe *et al.*, 2021). Los péptidos y grupos amino libres derivados de las proteínas de la leche pueden reaccionar con carbohidratos y formar complejos péptido-carbohidrato que aportan propiedades sensoriales deseables, pero modifican sus propiedades nutricionales y funcionales (Sun y Udenigwe, 2020). Además, el calor aplicado durante el procesamiento del producto lácteo puede generar aroma y sabor característico de la reacción de Maillard y, aparte, podría aumentar o disminuir las propiedades funcionales dependiendo de las características de los complejos proteína-carbohidrato que se formen (Sun y Udenigwe, 2020; Xiong *et al.*, 2020). Los nuevos complejos pueden ofrecer diferentes propiedades bioactivas, ya que después de su consumo se pueden generar nuevos péptidos con características distintas (Sun *et al.*, 2020). Por lo anterior, se deben considerar los efectos de los aditivos que se agregan durante la formulación y su naturaleza para poder entender las interacciones que ocurren con los péptidos bioactivos y las propiedades de los productos de esta reacción.

2.3. Productos Lácteos Fermentados como Coadyuvantes en la Salud Cardiovascular:

¿Qué Falta?

Existen diferentes publicaciones que describen las propiedades funcionales que presentan los productos lácteos, especialmente los fermentados. En el Cuadro 1 se puede observar múltiples estudios publicados entre el 2013 y el 2023 han reportado los efectos hipocolesterolémicos de leches fermentadas con cepas específicas de *L. lactis* (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2013; Rendón-Rosales *et al.*, 2019; Rendón-Rosales *et al.*, 2023). Rodríguez-Figueroa *et al.* (2013), reportaron una disminución del colesterol LDL hasta un 61% al administrar leche fermentada con *L. lactis* NRRL B-50572 en un modelo murino. En otro estudio *in vitro*, la administración de la fracción peptídica derivada de la misma leche inhibió la formación de micelas de colesterol hasta en un

55.43% (Rendón-Rosales *et al.*, 2019). Por otro lado, otro estudio *in vivo* publicado en el 2023 reportó una disminución del 20% del colesterol LDL en ratas con hiperlipidemia inducida, que consumieron la misma leche fermentada con *L. lactis* (Rendón-Rosales *et al.*, 2023). En estos estudios no se reportó las características tecnológicas de la leche fermentada; entre ellos, si la leche fermentada fue estable en condiciones de almacenamiento y la aceptabilidad sensorial del producto. Por otro lado, se han publicado estudios que han realizado evaluaciones sensoriales de leches fermentadas con cepas específicas de *L. lactis* (Loaiza, 2013; Ospina, 2019). Loaiza (2013) elaboró una leche fermentada formulada con estevia, carragenina y puré de fresa. Al realizar evaluaciones sensoriales de textura y sabor, obtuvo valores de 2 y 2.5, respectivamente, en una escala hedónica de 5 puntos. Esto indica la necesidad de cambiar la fórmula para lograr obtener una mayor aceptabilidad. Por otro lado, en otra leche fermentada formulada con inulina, goma guar, estevia y saborizante de mango, reportaron puntuaciones de 5.5 en una escala hedónica de 7 puntos (Ospina, 2019). Esta formulación demostró tener una mayor aceptabilidad por parte del panel sensorial, lo cual presenta una buena base para el perfilamiento tecnológico de una leche fermentada con *L. lactis* NRL B-50572.

Cuadro 1. Estudios previos de leches fermentadas con *L. lactis* NRRL B-50572. LDL: lipoproteína de baja densidad; ECA: Enzima convertidora de angiotensina

Resultado	Tipo de estudio	Referencia
61% ↓ en colesterol LDL	<i>in vivo</i>	Rodríguez-Figueroa <i>et al.</i> , 2013
Inhibición de ECA mayor a 80%	<i>in vitro</i>	Loaiza, 2013
55.43% inhibición de micelas de colesterol	<i>in vitro</i>	Rendón-Rosales <i>et al.</i> , 2019
Inhibición de ECA alrededor de 70%	<i>in vitro</i>	Ospina, 2019
20% ↓ en colesterol LDL	<i>in vivo</i>	Rendón-Rosales <i>et al.</i> , 2023

Aparte de añadirle ingredientes a la leche fermentada para mejorar sus características organolépticas y obtener una mayor aceptación por parte del consumidor, también es importante considerar cómo estos aditivos pueden alterar el efecto de los compuestos bioactivos. Las interacciones descritas anteriormente pueden causar variaciones en la bioactividad de los péptidos derivados de la fermentación de la leche. En caso de disminuir las bioactividades, la elaboración del producto con aditivos estaría eliminando el valor agregado por la fermentación por BAL. Si las interacciones aumentan la bioactividad de los péptidos, sería necesario analizar cómo optimizar la

fórmula para desarrollar un producto con el mayor nivel de bioactividad posible. Es imposible saber qué efecto puede tener la formulación de un producto sobre su bioactividad si no se miden en conjunto. Por ende, surge la siguiente pregunta de investigación: ¿Cómo se ve afectado el potencial hipocolesterolémico de una leche fermentada por *L. lactis* NRRL B-50572 durante su perfilamiento tecnológico y vida útil?

2.4. Perfilamiento Tecnológico de una Bebida Láctea Fermentada con Efecto Hipocolesterolémico

Se ha demostrado que la leche tiene gran versatilidad para ser base de productos alimenticios fermentados con propiedades funcionales. Las propiedades cardioprotectoras de las leches fermentadas con cepas específicas de *L. lactis* se han estudiado *in vitro* (Rendón-Rosales *et al.*, 2019), *in vivo* (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2013) y en estudios clínicos (Beltrán-Barrientos *et al.*, 2018). Sin embargo, no se ha reportado el efecto que podría tener la incorporación de aditivos sobre la bioactividad cardioprotectora de una bebida láctea. La leche fermentada con *L. lactis* NRRL B-50572 ha demostrado propiedades hipocolesterolémicas en estudios *in vivo* (Rendón-Rosales *et al.*, 2023). En otro estudio, usando leches fermentadas con *L. lactis* NRRL B-50571 o NRRL B-50572, se encontró un efecto antihipertensivo en un modelo murino (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2013). En ambos estudios no se documenta, el perfil tecnológico del producto ni su grado de aceptabilidad entre los consumidores.

Beltrán-Barrientos *et al.* (2018) publicaron los resultados de un estudio clínico donde se evaluó la capacidad antihipertensiva e hipocolesterolémica de una leche fermentada con *L. lactis* NRRL B-50571. En este caso, se prepararon dos bebidas: una a base de leche descremada fermentada con la cepa mencionada y otra a base de leche descremada acidificada con ácido láctico, ambas adicionadas con puré de fruta (6% p/p) y estevia (0.5% p/p). El estudio confirmó el efecto cardioprotector de esta leche; sin embargo, no se evaluó la aceptabilidad sensorial ni los posibles cambios en la bioactividad de la leche elaborada en comparación con un control. Este estudio puede considerarse un primer paso en el proceso para desarrollar un alimento lácteo funcional apto para el mercado.

Estudios previos ya han pasado por las primeras etapas de desarrollo, pruebas de eficacia y evidencias de una leche hipocolesterolémica fermentada por *L. lactis* NRRL B-50572 (Rendón-Rosales *et al.*, 2019; Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2013, Rendón-Rosales *et al.*, 2023). En la Figura 1, se observa que el siguiente paso consiste en un ensayo clínico. Sin embargo, someter un alimento con baja aceptabilidad a un estudio clínico podría resultar en que los pacientes no se adhieran al tratamiento. Entonces, este estudio se enfoca en formular una leche fermentada hipocolesterolémica con la incorporación de aditivos que aumenten su aceptabilidad sensorial. Para lograr esto, es necesario realizar evaluaciones sensoriales del producto y ajustar la fórmula según los resultados de dichas evaluaciones. De este modo, se puede obtener una formulación deseada con la mejor aceptación sensorial y la mayor bioactividad posible.

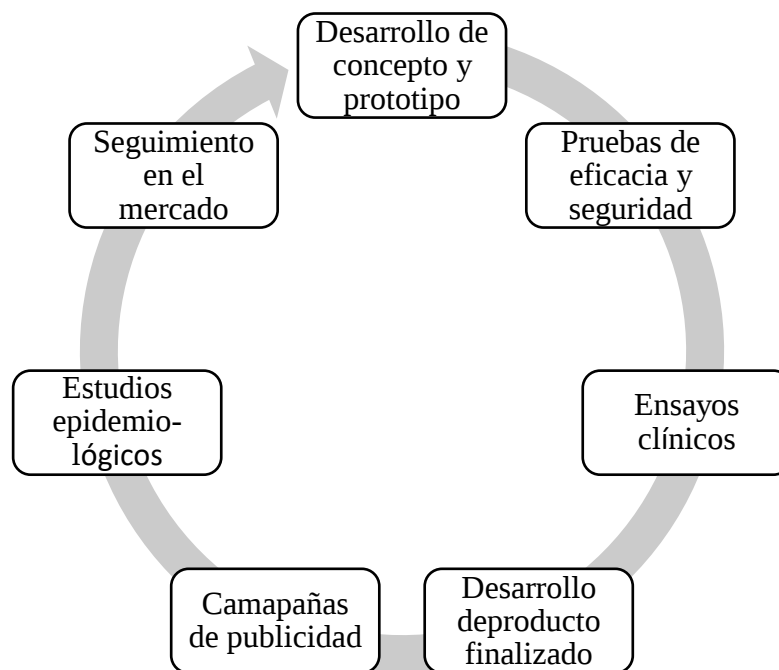


Figura 1. Proceso de desarrollo de alimentos funcionales (modificado de Otunola y Martirosyan, 2021)

En el mercado, los preparados de fruta son comúnmente utilizados para saborizar los productos lácteos fermentados (Farag *et al.*, 2022). Estos preparados son una mezcla de ingredientes que, además de aportar sabor a la bebida, también pueden aportar color, textura y en algunos casos inhibir el crecimiento de microorganismos (Kamber y Harmankaya, 2019). Los componentes que

aportan la mayor cantidad de sabor al producto son purés de fruta como fresa, piña, mango, durazno y plátano. Sin embargo, es importante considerar que, dependiendo de la fruta y su contenido de ácidos, pectina y azúcares, la acidez y viscosidad del producto podría variar (Kamber y Harmankaya, 2019). Para complementar los sabores a fruta añadidos, comúnmente se añaden azúcares o edulcorantes sintéticos. Estos ingredientes se pueden utilizar para la elaboración del producto, pero siempre se debe considerar sus efectos sobre la matriz alimenticia y la bioactividad del alimento.

Durante la elaboración de una leche fermentada, también se utilizan agentes gelificantes que aportan textura al alimento (Papaioannou *et al.*, 2022). Fibras como la inulina se incorporan comúnmente para aumentar viscosidad en productos bajos en grasas, ya que esta ayuda a simular la consistencia de un producto con grasa (Farag *et al.*, 2022). Esto es importante en la elaboración de una bebida láctea fermentada con potencial hipocolesterolémico, ya que se parte de una leche descremada para disminuir la cantidad de lípidos presentes en el producto final (Rendón-Rosales *et al.*, 2019). En este caso, la falta de lípidos podría disminuir la viscosidad de la leche fermentada y afectar su palatabilidad, por lo que la incorporación de inulina puede mejorar el perfil reológico, fisicoquímico y sensorial del producto (Farag *et al.*, 2022). Los hidrocoloides como algunas gomas o almidones modificados, también pueden incorporarse en las bebidas para aportar espesor sin que se generen grumos en el alimento final (Nikitina *et al.*, 2019). La selección correcta de los ingredientes espesantes es importante, ya que algunas dependen de reacciones específicas para aportar la textura, mientras que otros podrían crear texturas desagradables para el consumidor (Farag *et al.*, 2022).

El color y el crecimiento de microorganismos son factores importantes que también se pueden controlar con el uso de aditivos. Es común que los fabricantes de estos productos le agreguen colores que concuerden con la fruta que se escogió para saborizar. Colorantes naturales como el extracto de achiote y el carmín son utilizados para aportar colores naranja y rojo, respectivamente (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2021). El crecimiento de microorganismos se puede controlar con la adición de conservadores como sorbato de potasio, nisina y natamicina. Estos componentes se le agregan a los alimentos con el propósito de prevenir el crecimiento de hongos en el producto (Şanlı *et al.*, 2022). Sin embargo, el tratamiento térmico aplicado para frenar la fermentación ayuda en gran medida a disminuir la carga microbiana de la bebida y previene el crecimiento de microorganismos patógenos. La elaboración de una leche fermentada hipocolesterolémica es un

proceso multifacético o multifactorial que requiere la consideración de varios parámetros para lograr un producto sensorialmente aceptable y, a su vez, benéfico para la salud.

3. HIPÓTESIS

El perfilamiento tecnológico no afectará el potencial hipocolesterolémico de una leche fermentada por *Lactococcus lactis* NRRL B-50572 durante su vida útil.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el potencial hipocolesterolémico de una bebida láctea fermentada por *L. lactis* NRRL B-50572 durante su perfilamiento tecnológico y su vida útil.

4.2. Objetivos Específicos

1. Formular las leches fermentadas por *L. lactis* NRRL B-50572, aplicando análisis sensorial.
2. Evaluar el potencial hipocolesterolémico *in vitro* de las leches formuladas en su vida útil.
3. Evaluar la vida útil de las leches fermentadas formuladas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Elaboración de las Leches Fermentadas

5.1.1. Cultivo Láctico Iniciador y Fermentación de la Leche

La reactivación de la cepa de estudio, *L. lactis* NRRL B-50572, la cual pertenece a la colección de cepas del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos de CIAD, se realizó siguiendo la metodología publicada por Rendón-Rosales *et al.* (2019) con algunas modificaciones. A partir de un cultivo láctico en glicerol (15% v/v), se tomó 30 µl se para inocular en caldo M17 (DIFCO, EE.UU.) estéril enriquecido con 5% lactosa (10% p/v) (DIFCO, EE.UU.) y se incubó por 18 h a 30 °C. Se repitió el mismo proceso 2 veces más, pero con tiempos de incubación de 8 h y luego 7 h. Una vez obtenido el cultivo celular, este se utilizó para inocular al 3% (v/v) en leche descremada pasteurizada a temperatura ultra alta (UHT, por sus siglas en inglés) de una marca comercial (ALPURA, México) colocada en tubos estériles y se incubó por 12 h a 30 °C para generar el cultivo iniciador. Finalmente, para elaborar la leche fermentada, el cultivo iniciador fue inoculado (3% v/v; 1×10^8 UFC/mL) en leche pasteurizada UHT y se incubó a 30 °C durante 48 h.

5.1.2. Formulación de la Leche Fermentada

Las leches fermentadas adicionadas con los diferentes ingredientes a evaluar, se elaboraron considerando los diferentes niveles de cada ingrediente presentados en el Cuadro 2. Al finalizar la fermentación de 48 h, los ingredientes: inulina de agave (NBF, San Antonio, TX), goma guar (Hindustan gum & chemicals, Haryana, India), estevia (Svetia®) y saborizante de fresa (FRULED, México), se pesaron según la formulación correspondiente basados en estudios previos que

aumentaron la aceptabilidad sensorial de una leche fermentada con cepas de *L. lactis* (Ospina, 2019). Estos ingredientes se añadieron a una porción de la muestra y se homogenizó utilizando una licuadora de inmersión por 30 s a 3,500 rpm hasta lograr que se disolviera (Hamilton Beach Brands, EE.UU.). Luego, esta porción de la muestra se mezcló con el resto con un espumador (Zulay Kitchen, EE.UU.) a bajas revoluciones para garantizar la homogeneidad y se calentó a baño maría, agitando periódicamente, hasta llegar a los 70 °C por 1 min y se envasó en caliente en frascos pyrex (Pyrex, EE.UU.). La muestra se colocó en hielo para realizar un choque térmico hasta llegar a los 4 °C y se almacenaron en refrigeración hasta su análisis.

Cuadro 2. Niveles de los ingredientes utilizados para la formulación de leche fermentada.

Inulina de agave (% p/v)	Goma guar (% p/v)	Estevia (% p/v)	Saborizante de fresa (% p/v)
2.0	0.5	1.0	1.0
1.0	0.1	0.5	0.5
	0.0	0.0	0

5.2. Análisis Sensorial

5.2.1. Selección y Entrenamiento del Panel Sensorial

Se contó con 10 panelistas expertos en evaluación sensorial de alimentos lácteos que forman parte del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del CIAD. Los panelistas formaron parte de 3 sesiones de entrenamiento en modalidad grupo focal. A los panelistas se les presentó una muestra referencia de yogurt natural comercial (Danone, México) y se les pidió que, bajo consenso, eligieran un descriptor que mejor definiera la textura de esa referencia. Luego, los panelistas probaron 3 referencias con niveles alto, medio y bajo de intensidad de ese descriptor, cremosidad, en una escala de 15 puntos. La referencia con nivel 0 de cremosidad era leche descremada, el nivel medio (7.5) era una combinación de leche descremada y yogurt natural 50% (p/p) y el nivel 15 de cremosidad era yogurt natural. Se les pidió a los panelistas que probaran las

3 referencias y se familiarizaran con la escala de 0 a 15, presentada en la Figura 2A. Luego, se le presentaron diferentes muestras problema estándar con niveles conocidos de intensidad de cremosidad dentro de la escala y los panelistas otorgaron un puntaje de intensidad de cremosidad para cada muestra. Se repitieron las sesiones de entrenamiento hasta que no hubiera diferencias estadísticas entre los panelistas (Meilgaard *et al.*, 1999).

Posteriormente, se aplicó una prueba de diferencia de una referencia (DFC, por sus siglas en inglés) (Meilgaard *et al.*, 1999). En una escala de 0 a 9, presentada en la Figura 2B, los panelistas tenían que cuantificar la magnitud de la diferencia entre una muestra problema y la referencia. El valor de 0 representa que no hay diferencias entre las muestras problema y la referencia, mientras que, el valor de 9 representa extrema diferencia entre la muestra problema y la referencia. Nuevamente, se realizaron diferentes sesiones hasta que no existiera diferencias estadísticas entre los panelistas para poder considerar al panel como entrenado. Las muestras problema fueron diseñadas mezclando proporciones conocidas de leche descremada y yogurt natural.

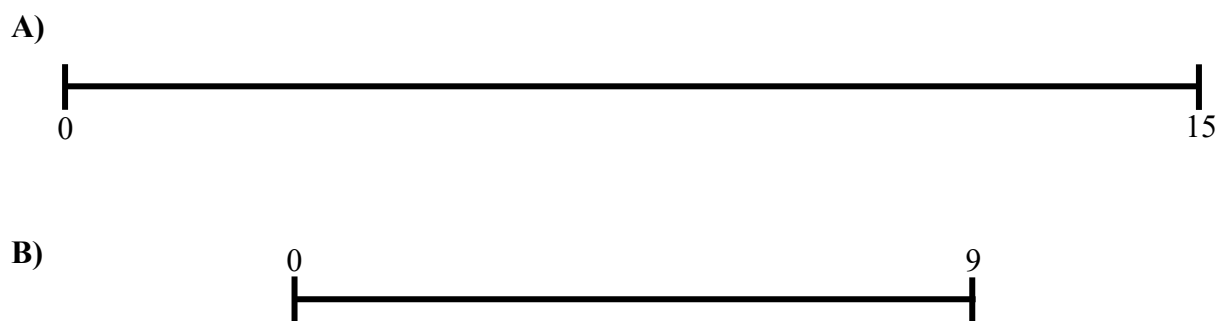


Figura 2. A) Escala de intensidad (0 a 15) utilizada en las pruebas de cremosidad **B)** Escala de DFC (0 a 9) utilizada para evaluar las diferencias entre las muestras problema y la muestra referencia durante el entrenamiento del panel sensorial.

5.2.2. Evaluación Sensorial de Textura

Para fijar los niveles de inulina y goma guar en la formulación, se realizaron evaluaciones sensoriales de textura. Se prepararon 6 formulaciones (Cuadro 3) combinando 2 niveles de inulina y 3 niveles de goma guar. Las 6 formulaciones fueron evaluadas usando la prueba DFC,

comparándolas con una referencia comercial consistiendo en una mezcla conocida de yogurt natural y leche descremada. Los panelistas entrenados evaluaron que tanto se parecía la muestra problema a la referencia presentada. Así se obtuvo la formulación que más se parecía a una referencia comercial y, por ende, más aceptable por los consumidores.

Cuadro 3. Formulaciones evaluadas para fijar niveles de agentes texturizantes.

Formulación	Inulina de agave (% p/v)	Goma guar (% p/v)
F1	2.0	0.5
F2	2.0	0.1
F3	2.0	0.0
F4	1.0	0.5
F5	1.0	0.1
F6	1.0	0.0

5.2.3. Evaluaciones Sensoriales de Dulzor y Sabor

En el proceso de selección de ingredientes, se realizaron evaluaciones sensoriales de dulzor y sabor. Durante esta etapa se probaron 3 niveles de estevia (Svetia®) y 3 niveles de saborizante de fresa incorporados a leche fermentada por *L. lactis* NNRL B-50572. Se seleccionó el saborizante de fresa debido a su popularidad en el mercado de las bebidas lácteas fermentadas. Los ingredientes fueron evaluados por separado, es decir, se evaluó el dulzor primero y luego se evaluó el sabor. Se les pidió a los panelistas evaluar las 3 muestras de leche adicionadas con estevia a 3 niveles y colocar una puntuación en una escala hedónica de 7 puntos presentada en el Cuadro 4. Se les solicitó que evaluaran únicamente el nivel de dulzor del producto. Una vez establecido el dulzor, se prepararon 3 muestras con los niveles de saborizante a evaluar y se les pidió que evaluaran únicamente el sabor, ya que la textura y el dulzor eran igual en las 3 muestras.

Cuadro 4. Escala hedónica de 7 puntos utilizada para pruebas de dulzor y sabor.

	Nivel de Agrado	Código		
		X	Y	Z
1	Me disgusta extremadamente			
2	Me disgusta moderadamente			
3	Me disgusta ligeramente			
4	Ni me gusta ni me disgusta			
5	Me gusta ligeramente			
6	Me gusta moderadamente			
7	Me gusta extremadamente			

5.2.4. Evaluación Sensorial de Percepción General

Para evaluar el nivel de aceptabilidad de las leches fermentadas formuladas, se realizó una evaluación sensorial de percepción general. Esta prueba consistió en el uso de la misma escala de 7 puntos utilizada en etapas anteriores para evaluar los diferentes atributos de las leches fermentadas formuladas. La escala, presentada en el Cuadro 5, se utilizó para evaluar los atributos aroma, sabor, textura y percepción general de la bebida. A los panelistas se les presentaron 2 muestras de leche fermentada formulada con el mismo nivel de goma guar, estevia y saborizante de fresa, pero con dos niveles de inulina. Se les pidió a los panelistas evaluar todos los atributos según su nivel de agrado.

Cuadro 5. Formato utilizado para evaluar atributos y percepción general de las leches fermentadas

	Nivel de Agrado	Atributo			
		Aroma	Sabor	Textura	Percepción General
1	Me disgusta extremadamente				
2	Me disgusta moderadamente				
3	Me gusta ligeramente				
4	Ni me gusta ni me disgusta				
5	Me gusta ligeramente				
6	Me gusta moderadamente				
7	Me gusta extremadamente				

5.3. Evaluación de Vida Útil

5.3.1. Producción y Formulación de Leche Fermentada

Se llenó un tanque multipropósitos Kettle P50F/100F (Janschitz GmbH, Austria) con 50 litros de leche descremada UHT y se inoculó con el cultivo iniciador (3% v/v) de *L. lactis* NRRL B-50572 y se incubó dentro del mismo equipo a 30 °C por 48 h. Justo antes de frenar la fermentación, se pesaron los ingredientes de la formulación resultado de la evaluación sensorial: 1.0% (p/v) inulina, 0.1% (p/v) goma guar, 0.5% (p/v) estevia y 0.5% (p/v) saborizante de fresa. Estos ingredientes se agregaron al pasteurizador lentamente mientras se agitaba la mezcla con un equipo de rotación de alto torque VSR Hammer Drill de 16 mm 5/8 pulg. (Ryobi, China). Luego de homogenizar completamente, se dejó que la muestra alcanzara los 70 °C por 1 minuto y se envasó la bebida en caliente en envases de polietileno de alta densidad (Vills, México). Los envases estaban previamente tratados térmicamente en agua hirviendo por 1 min. Cada envase llevaba aproximadamente 200 mL y se sometió a choque térmico en baño de hielo hasta alcanzar los 4 °C. Por último, 4 lotes de 75 frascos se almacenaron a diferentes temperaturas (4, 20, 30 y 40 °C) para el estudio de vida útil acelerada. Se empleó un estudio de vida útil acelerada ya que estudios previos han demostrado que leches fermentadas por cepas de *L. lactis* con un tratamiento térmico después de la fermentación, resulta en una vida útil de 7.4 meses a 4 °C (Ospina, 2019). Durante el estudio se realizó evaluaciones microbiológicas, sensoriales y fisicoquímicas cada tercer día de almacenamiento al igual que evaluaciones de actividad hipocolesterolémica al inicio y final del estudio.

5.3.2. Análisis Microbiológico

Se realizaron evaluaciones de hongos y levaduras, así como de coliformes totales y fecales, al principio y final del estudio de vida útil para las muestras almacenadas a cada temperatura según

la norma mexicana (NOM-243-SSA1-2010). Las BAL fueron evaluadas cada tercer día, para ello, se tomó muestra aleatoriamente de cada temperatura de almacenamiento. Para determinar hongos y levaduras, se utilizaron placas de agar papa dextrosa (PDA, DIFCO, EE.UU.) preparadas con ácido tartárico al 10% (15 mL de ácido/1000 mL de medio). Se inocularon con la muestra y se incubaron a 25 °C por 5 días. Asimismo, se tomaron placas de agar MRS para el conteo de BAL, inoculando las placas con la muestra e incubándolas a 37 °C por 48 h. Por último, los coliformes totales fueron evaluados utilizando caldo lauril triptosa (DIFCO, EE.UU.). Brevemente, se inocularon tubos de caldo lauril triptosa con campanas Durham para medir la producción de gases, incubándolas a 37 °C por 48 h. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

5.3.3. Análisis Fisicoquímico

Durante el estudio de vida útil, se monitoreó el pH y la sinéresis con el propósito de monitorear posibles cambios en la calidad que causaran un fin en la vida útil del producto. Para la medición de pH se utilizó el potenciómetro HI 2211 pH/ORP Meter (Hanna Instruments, EE.UU.). Para determinar el grado de sinéresis, se tomó cada muestra y utilizando una pipeta Pasteur, se tomó el suero y se pesó para cuantificar la relación entre el suero y el volumen total de la bebida, expresado en mL de suero/100 mL de muestra (Ospina, 2019). Por último, se evaluó la composición química (proteína, grasa, cenizas, humedad y carbohidratos) de las leches fermentadas formuladas y no formuladas según los métodos estándar de la AOAC (2000). Se utilizó el método de micro-Kjeldahl para la determinación de proteína, Babcock para la medición de grasa butírica, sólidos totales y cenizas se midieron por calentamiento de la muestra en estufa y mufla, respectivamente y, por último, carbohidratos por diferencia.

5.3.4. Evaluación de Inhibición Micelar de Colesterol *In Vitro*

Se empleó un modelo de micelas artificiales para medir la actividad hipocolesterolémica de la

bebida *in vitro* al principio y al final del estudio, de acuerdo con el método publicado por Kirana et al., (2008) con modificaciones menores. Para ello, lípidos con concentraciones finales de 0.5 mmol/L de colesterol (Sigma-Aldrich); 2.4 mmol/L de fosfatidilcolina (Avanti Polar lipids) y 1 mmol/L de ácido linoleico (Sigma-Aldrich) se disolvieron primeramente en una mezcla cloroformo: metanol (2:1) y la mezcla lipídica se secó bajo una corriente de nitrógeno. La mezcla seca resultante se resuspendió en buffer de fosfato de sodio (15 mmol/L, pH 7.4) con 132 mmol/L de NaCl y 6.6 mmol/L de taurocolato de sodio (Sigma-Aldrich) y se mezclaron usando un homogeneizador mecánico (Pro Scientific) durante 2 minutos. Posteriormente, para formar las micelas, la mezcla se sonicó durante 20 minutos (VWR, Aquasonic 50D) a 60 Hz. La solución micelar resultante se incubó durante 24 h a 37 °C. Después de este tiempo, la solución micelar (900 µL) se mezcló con cada una de las fracciones de leche fermentada < 3 kDa (100 µL), buffer (100 µL) como testigo negativo, o colestiramina (25 mg) como testigo positivo. Después, la solución micelar con cada uno de los tratamientos se sonicó nuevamente durante 2 minutos a 60 Hz y la mezcla se incubó durante 2 h a 37 °C. Después de la incubación, la solución se centrifugó a 8000 x g durante 30 minutos. Se recuperó el sobrenadante (400 µL) y se filtró usando una unidad de filtración de 0.22 µm, el colesterol en el sobrenadante filtrado se determinó usando el kit de ensayo de colesterol Amplex Red (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un fluorómetro Qubit 4 (Invitrogen, Carlsbad, CA). El porcentaje de inhibición de la solubilidad micelar del colesterol se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición micelar de colesterol (\%)} = \left(\frac{C_0 - C_m}{C_0} \right) \times 100$$

Donde,

C_0 : Representa la concentración de colesterol en las micelas sin tratamiento (testigo negativo) y C_m representa la concentración de colesterol en las micelas con los diferentes tratamientos.

5.3.5. Estimación de Vida Útil de la Leche Fermentada

Para cuantificar la vida útil de la leche fermentada, se realizó un estudio de vida útil acelerada por 74 días con muestreos cada tercer día de almacenamiento. Durante este tiempo, se almacenaron muestras de leche fermentada formulada en condiciones de abuso de temperaturas (20, 30 y 40 °C) para acelerar el deterioro de las mismas y así poder estimar su vida útil. Se evaluaron los parámetros microbiológicos, fisicoquímicos, funcionales y sensoriales de las muestras en diferentes tiempos de almacenamiento. Durante el estudio, se evaluaron las muestras almacenadas a 20, 30 y 40 °C una vez por semana según el parámetro de calidad sensorial. Se les instruyó que se enfocaran específicamente en aroma y sabor, ya que estos parámetros son los principales al determinar la aceptabilidad de un alimento (Ibarra *et al.*, 2012). Para esto, se les presentó a los panelistas las 3 muestras problema junto a una referencia considerada como de calidad excelente en la escala presentada. Para ello, se utilizaron muestras del lote almacenado a 4 °C. Se empleó nuevamente una prueba de DFC modificada, donde se utilizó la escala de 9 puntos de Karlsruhe (Cuadro 6). Se les solicitó a los panelistas comparar las muestras problema con la referencia, la cual se encuentra en el nivel de calidad sensorial de 9 – excelente (Wittig de Penna, 2002; Quezada-Catalán, 2011; Ibarra *et al.*, 2012). Luego de probar cada muestra y compararlas con la referencia, se les instruyó que colocaran una X en la escala según el término que mejor representara su juicio. Las evaluaciones sensoriales de calidad se llevaron a cabo hasta que al menos una muestra llegara a un puntaje de 5.5 o menor, lo cual representa el puntaje mínimo de aceptabilidad comercial (Wittig de Penna, 2001; Ibarra *et al.*, 2012). Antes de cada evaluación, las muestras eran retiradas de sus respectivas temperaturas de almacenamiento y colocadas en refrigeración (4 °C) por 24 h para homogenizar la temperatura para su evaluación y se servían a 6 ± 2 °C. Luego, se utilizó el modelo matemático de Arrhenius donde se calculó la constante de reacción (k_0) en las temperaturas de almacenamiento definidas (Brilliantina *et al.*, 2022). Posteriormente, se calculó la constante de reacción del deterioro (k) en la temperatura deseada de almacenamiento y su respectiva E_a . Asimismo, se estimó la vida útil de la leche utilizando el atributo crítico (calidad sensorial) a diferentes temperaturas de almacenamiento.

Cuadro 6. Escala de Karlsruhe utilizada para la evaluación de calidad sensorial de las leches fermentadas durante el almacenamiento.

	Calidad Sensorial	Código			
		Referencia	A	B	C
9	Excelente	X			
8	Muy buena				
7	Buena				
6	Satisfactoria				
5	Regular				
4	Suficiente				
3	Defectuosa				
2	Mala				
1	Muy mala				

5.4. Análisis Estadístico

Se empleó un diseño completamente al azar y los resultados se analizaron usando un análisis de varianza de una vía a un 95% de confianza. Al encontrarse diferencias significativas ($p < 0.05$), se realizó una comparación de medias utilizando el método de comparación múltiple de Fisher. Los datos obtenidos se analizaron con el paquete estadístico NCSS 2023 (NCSS Statistical Software, EE.UU.) y Minitab 22 (Minitab, EE.UU.).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis Sensorial

6.1.1. Entrenamiento del Panel Sensorial

Durante las sesiones de grupo focal de los entrenamientos, los panelistas probaron diferentes muestras referencia para decidir, por consenso, un descriptor de textura que mejor las describiera. Entre los panelistas, seleccionaron el descriptor: cremosidad. Entonces, estas 3 referencias se ubicaban en una escala de 15 puntos de intensidad del mismo descriptor. Como se mencionó previamente, la leche descremada se situó en el valor de 0, la mezcla 50% yogurt y 50% leche descremada en el 7.5 y el yogurt natural en el valor de 15, en una escala de intensidad de cremosidad. Con base a estas referencias, los panelistas realizaron ejercicios consistentes en ubicar dentro de la escala, diversas muestras problema a niveles de cremosidad conocidos formuladas a partir de combinaciones de leche descremada y yogurt comerciales. Estos ejercicios se llevaron a cabo con el objetivo de adiestrar al panel, estandarizar los juicios particulares, evaluar la capacidad de diferenciar muestras distintas y dar valores precisos.

En la primera sesión, los panelistas colocaron las muestras en la escala de intensidad de cremosidad con alta variabilidad. Se observaron diferencias entre panelistas ($p < 0.05$) y los valores se alejaron de lo esperado para esas muestras. En la segunda sesión, las diferencias entre los panelistas persistieron ($p < 0.05$). En la última sesión de grupo focal, los panelistas probaron muestras con un valor esperado de 10.5 en una escala de 15 puntos. En esta sesión los panelistas se acercaron al valor real y, además, eliminaron las diferencias estadísticas entre ellos ($p > 0.05$). En este punto, el panel ya estaba entrenado para encontrar estas pequeñas diferencias entre muestras problema.

Cuadro 7. A) Valores de intensidad de cremosidad por cada panelista en cada sesión de evaluación durante el entrenamiento **B)** Valores de prueba DFC realizada en el último día de entrenamiento. Los valores del cuadro son presentados como media $\pm$ DE (n=2). Diferentes literales representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Las comparaciones de media se realizaron entre panelistas para cada día de evaluación.

Panelista	Intensidad de Cremosidad			Panelista	DFC
	Sesión 1	Sesión 2	Sesión 3		
A	0.40 $\pm$ 0.20 ^d	9.50 $\pm$ 0.40 ^c	10.00 $\pm$ 1.00 ^a	A	7.9 $\pm$ 0.3 ^a
B	6.35 $\pm$ 1.05 ^{ab}	12.20 $\pm$ 0.80 ^{ab}	11.50 $\pm$ 0.50 ^a	B	8.7 $\pm$ 0.1 ^a
C	2.75 $\pm$ 1.65 ^{bcd}	10.60 $\pm$ 1.05 ^{abc}	11.00 $\pm$ 1.50 ^a	C	8.0 $\pm$ 0.4 ^a
D	3.50 $\pm$ 3.50 ^{bcd}	11.00 $\pm$ 0.60 ^{abc}	9.75 $\pm$ 0.25 ^a	D	9.0 $\pm$ 0.0 ^a
E	6.95 $\pm$ 0.55 ^{ab}	10.85 $\pm$ 0.45 ^{abc}	10.00 $\pm$ 1.00 ^a	E	9.0 $\pm$ 0.0 ^a
F	4.70 $\pm$ 0.90 ^{abcd}	10.35 $\pm$ 0.75 ^{bc}	11.50 $\pm$ 1.50 ^a	F	9.0 $\pm$ 0.0 ^a
G	1.05 $\pm$ 0.45 ^{cd}	12.20 $\pm$ 0.90 ^{ab}	11.75 $\pm$ 0.75 ^a	G	7.3 $\pm$ 1.7 ^a
H	6.30 $\pm$ 0.90 ^{ab}	10.60 $\pm$ 0.60 ^{abc}	10.00 $\pm$ 1.00 ^a	H	9.0 $\pm$ 0.0 ^a
I	5.20 $\pm$ 2.60 ^{abc}	12.85 $\pm$ 0.75 ^a	11.00 $\pm$ 1.00 ^a	I	8.3 $\pm$ 0.3 ^a
J	4.15 $\pm$ 0.65 ^{abcd}	11.00 $\pm$ 0.60 ^{abc}	12.00 $\pm$ 0.50 ^a	J	8.2 $\pm$ 0.5 ^a
K	8.20 $\pm$ 0.40 ^a	9.85 $\pm$ 0.65 ^c	10.15 $\pm$ 1.15 ^a	K	8.6 $\pm$ 0.8 ^a
L	2.90 $\pm$ 0.40 ^{abcd}	11.15 $\pm$ 1.15 ^{abc}	10.50 $\pm$ 1.00 ^a	L	8.5 $\pm$ 0.3 ^a

A)

B)

Posteriormente, se les presentó a los panelistas una nueva prueba para evaluar las muestras problema. La prueba de DFC es una en la que los panelistas se les presentó una referencia y se les pidió cuantificar la diferencia entre la muestra problema y la referencia. En este caso, tras su entrenamiento en grupo focal, los panelistas evaluaron diferentes muestras usando esta nueva prueba y una nueva escala de 0 a 9, en cabinas de evaluación sensorial de manera individual. Nuevamente, los panelistas demostraron que el entrenamiento había funcionado, logrando obtener resultados sin diferencias estadísticas ($p > 0.05$) (Cuadro 7B).

6.1.2. Evaluación Sensorial de Textura

Posterior al entrenamiento del panel sensorial, se procedió a realizar las evaluaciones sensoriales de textura. Los ingredientes incorporados a la leche fermentada para aumentar o mejorar el perfil de textura fueron inulina de agave y goma guar. En este sentido, se probaron 6 combinaciones

diferentes de inulina y goma guar para encontrar la mejor formulación. Esto se hizo mediante una prueba sensorial DFC para comparar las diferentes formulaciones con una referencia comercial. En la figura 3 se observa que las formulaciones F3 y F6 obtuvieron un mayor valor de diferencia que las 4 formulaciones restantes a comparación de la referencia comercial ($p < 0.05$). Particularmente, las formulaciones F3 y F6 no contenían goma guar. Este polisacárido es responsable del aumento en viscosidad y con un bajo porcentaje presente en la formulación, se genera una gran diferencia en textura (Mudgil *et al.*, 2014). A los panelistas se les pidió evaluar la textura enfocándose en la cremosidad de la bebida. Es importante destacar que la viscosidad y la cremosidad de la bebida van de la mano, ya que la cremosidad es por definición, la característica de ser viscoso como la crema. Entonces, la ausencia de goma guar disminuye la viscosidad de la leche fermentada y, por ende, disminuye la cremosidad, lo cual hace que la diferencia entre las bebidas sin goma guar sea mayor respecto a la muestra referencia.

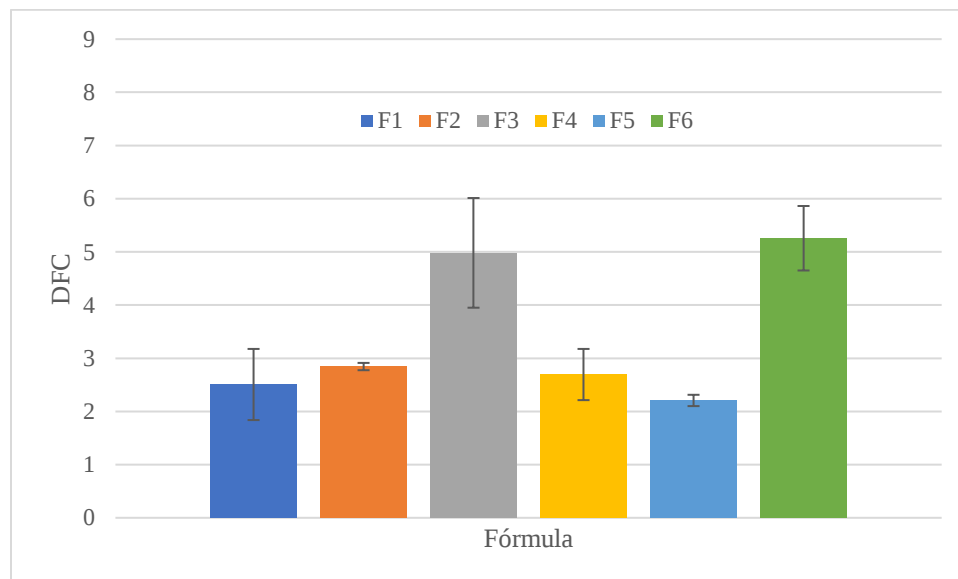


Figura 3. DFC en cremosidad de las leches formuladas con inulina y goma guar. Los valores de la gráfica son presentados como media $\pm$ desviación estándar ($n = 2$). Diferentes literales representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Las cuatro formulaciones restantes fueron llevadas a otra evaluación sensorial de textura con una prueba de DFC. En este caso, se observó que las formulaciones F1 y F4 obtuvieron un valor de diferencia mayor a las dos formulaciones restantes ($p < 0.05$) (ver Figura 4). Estas formulaciones

contenían el mayor nivel de goma guar (0.5%) y, por consecuencia, tenían una cremosidad muy elevada y distinta a la referencia comercial. En estudios anteriores, se ha demostrado que una concentración de goma guar por encima de 0.5% puede alterar el comportamiento del producto, provocando que este cambie de ser un fluido newtoniano a uno no newtoniano, debido a la alta capacidad de absorción de agua y gelificante que tiene esta goma (Mudgil *et al.*, 2014). Esto significa que dependiendo de la concentración de goma guar, el producto podría tener diferentes viscosidades dependiendo de la cantidad de fuerza aplicada sobre el mismo. Además, una alta concentración de goma guar puede causar cambios sensoriales, generando sensación en boca resbaladiza y babosa.

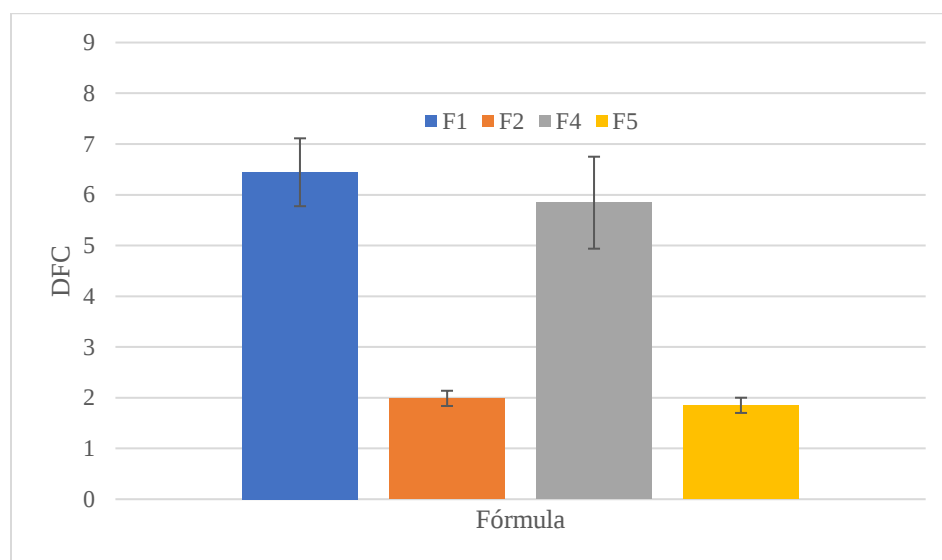


Figura 4. DFC en cremosidad de las formulaciones F1, F2, F4 y F5. Los valores de la gráfica son presentados como media $\pm$ desviación estándar ($n = 2$). Diferentes literales representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Por el lado de la inulina no parece haber cambios perceptibles sensorialmente dentro de los valores estudiados ($p > 0.05$). Sin embargo, la presencia de la inulina es esencial para el aspecto sensorial y funcional de la leche fermentada. En estudios anteriores, la inulina de agave ha demostrado tener un potencial efecto hipocolesterolémico *in vivo* mediante la fermentación de la misma por el microbiota intestinal (Yang *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2023). Además, la inulina por muchos años ha sido el sustituto de la grasa en productos lácteos descremados, ya que ayuda a mejorar la sensación en boca al consumirlos (Schaller-Povolny y Smith, 2002; Zhao *et al.*, 2023).

6.1.3. Evaluación Sensorial de Dulzor

Después de fijar los valores de ingredientes texturizantes y disminuir la cantidad de formulaciones a evaluar, se procedió a analizar el ingrediente endulzante, estevia. En esta etapa de las evaluaciones sensoriales, se realizaron pruebas con el panel entrenado para evaluar los diferentes niveles de dulzor utilizando una escala hedónica estructurada de 7 puntos. A los panelistas se les presentaron tres leches fermentadas, cada una con un nivel distinto de estevia: 0.0, 0.5 y 1.0%. Los resultados se presentan en la figura 5. La leche fermentada con el nivel más alto de estevia (1.0%) fue la que menor aceptabilidad obtuvo, con un valor de 3.61 en la escala de 7 puntos, lo cual la ubica en la parte de disgusto. Por otro lado, la leche fermentada sin estevia obtuvo un valor promedio de 4.5, manteniéndose justo por encima del punto medio de la escala. Sin embargo, la leche que mayor aceptabilidad tuvo ($p < 0.05$), fue aquella adicionada con 0.5% de estevia. Esta leche fermentada obtuvo un valor 5.6, ubicándola en la parte alta de la escala en el área de gusto moderado.

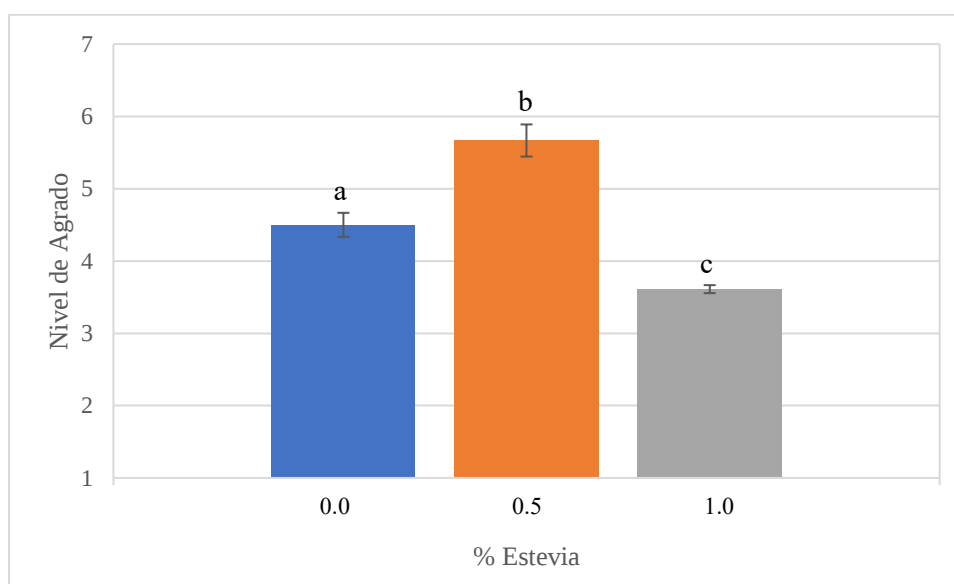


Figura 5. Nivel de agrado de las leches fermentadas formuladas con 0, 0.5 y 1% de estevia. Valores son presentados como media $\pm$ desviación estándar ($n = 2$). Diferentes literales representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

La leche fermentada con *L. lactis* NRRL B-50572 puede generar algunos sabores característicos de queso y no propiamente de leche fermentada o yogurt, lo cual podría contrarrestarse con la

adición de ingredientes para saborizar. Los sabores no característicos a leche fermentada podrían estar asociados a la fuente de aislamiento de la cepa, el queso. En estudios anteriores, se ha demostrado un aumento en la aceptabilidad de una leche fermentada con esta cepa al agregar 0.09% de estevia en conjunto con un puré de fruta (Loaiza, 2013). Sin embargo, otros estudios sugieren para productos lácteos endulzados con edulcorantes como la estevia, es recomendable utilizarlos a una concentración media, ya que de esta manera se evita la generación de resabios amargos y no afecta las propiedades físico-químicas de la bebida (Schiatti-Sisó, *et al.*, 2023). Además, otros estudios han reportado que una sustitución del 50% de azúcar con estevia genera menos resabio y mantiene el mismo nivel de aceptabilidad general de yogures (Narayana *et al.*, 2022). En resumen, los resultados indican que el uso de estevia en la formulación de una leche fermentada por *L. lactis* NRRL B-50572 es necesario para obtener una buena aceptabilidad sensorial, siendo 0.5% la concentración ideal entre las evaluadas en este estudio.

6.1.4. Evaluación Sensorial de Sabor

La incorporación del saborizante llevó el mismo proceso. Se realizaron evaluaciones sensoriales de sabor en donde se utilizó una escala hedónica estructurada con el panel entrenado para encontrar la mejor concentración de saborizante de fresa. Los resultados se presentan en la figura 6. En este punto, las leches fermentadas contenían el nivel de dulzor previamente determinado (0.5% p/v). Se evaluaron los tres niveles de saborizante de fresa y se observó que el nivel más alto de saborizante obtuvo la aceptación más baja debido a un resabio fuerte que generaba esta muestra ($p < 0.05$). Según Tribby y Teter (2023), esto se puede deber a la calidad del ingrediente o si el ingrediente es de origen natural o artificial. El uso de ciertos ingredientes en concentraciones elevadas puede generar texturas inesperadas o sabores y resabios no deseados (Tribby y Teter, 2023). Por otro lado, la aceptabilidad mejoró con 0.5% (p/v) de saborizante de fresa; sin embargo, no se presentaron diferencias con la formulación que no contenía saborizante ($p > 0.05$). Esto es interesante, ya que el panel determinó que en una presentación natural sin saborizante puede ser comercialmente aceptable. Anteriormente, los estudios que analizaron una leche fermentada con *L. lactis* NRRL B-50572 no evaluaron la diferencia en aceptabilidad entre una bebida con saborizante y otra sin

saborizante. Nuestros análisis lograron ver que esta leche fermentada, al agregar un edulcorante, podría ser consumida con o sin un saborizante. Se decide continuar con la formulación con un nivel medio de saborizante para poder evaluar como la presencia de este ingrediente podría tener un efecto sobre la potencial capacidad hipocolesterolémica de la leche fermentada con *L. lactis* NRRL B-50572.

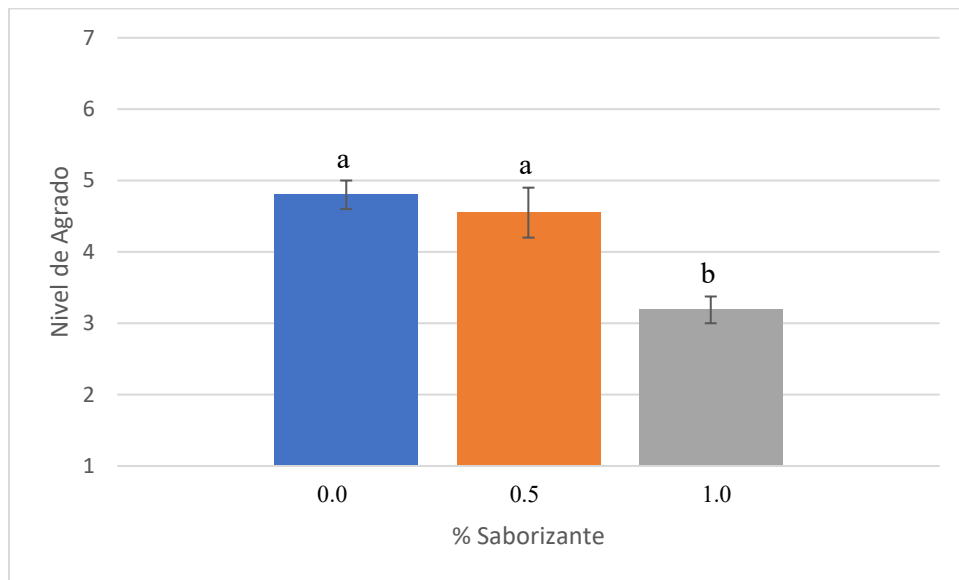


Figura 6. Nivel de agrado de las leches fermentadas formuladas con 0, 0.5 y 1% de saborizante de fresa. Valores son presentados como media $\pm$ desviación estándar ($n = 2$). Diferentes literales representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

6.1.5. Evaluación Sensorial de Percepción General

Al finalizar la serie de evaluaciones sensoriales en las que se probaron diferentes niveles de los cuatro ingredientes considerados en la formulación, se realizó una evaluación final de percepción general de las dos formulaciones preferidas para definir la mejor. Las formulaciones que se evaluaron contenían los niveles de cada ingrediente presentados en el Cuadro 8. Las formulaciones evaluadas en este paso eran iguales excepto en su nivel de inulina.

Cuadro 8. Formulaciones evaluadas bajo el atributo de percepción general

Fórmula	Inulina (%)	Goma guar (%)	Estevia (%)	Sabor (%)
F1	2.0	0.1	0.5	0.5
F2	1.0	0.1	0.5	0.5

En la figura 7 se puede observar que, sobre la escala de 7 puntos, la F2 obtuvo un valor de aceptabilidad de 5.63 ± 0.03 (me gusta ligeramente a me gusta moderadamente), con un 84% de los panelistas otorgando un valor positivo. Esto coincide con lo reportado anteriormente por Ospina (2019), quien concluyó que un producto se considera tener buena aceptabilidad si un 70% de los panelistas le otorgan un valor positivo (≥ 4) en una escala hedónica de 7 puntos. Cabe destacar que la fórmula F1 también obtuvo un resultado positivo de percepción general, con el 78% de los panelistas otorgándole un valor positivo. Sin embargo, mediante esta evaluación encontramos que la fórmula F2 fue la que mejor percepción general obtuvo ($p < 0.05$). Esto se puede deber a que la presencia de ciertos hidrocoloides como la inulina, aumenta la firmeza y viscosidad de la bebida, llevándola a un punto de viscosidad más alta de lo deseado para una leche fermentada bebible (Zhao *et al.*, 2023). Además, se ha reportado anteriormente que el uso de inulina en las formulaciones de productos lácteos, puede intensificar el dulzor o el sabor del mismo (Shoaib *et al.*, 2016). Por esto, un nivel más alto de inulina terminó siendo menos deseado en la formulación de esta bebida láctea fermentada.

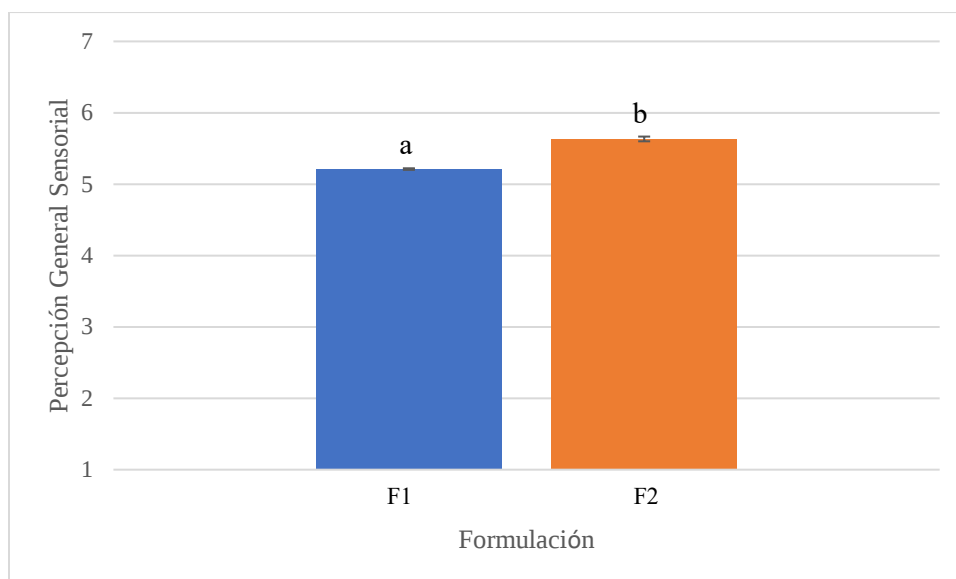


Figura 7. Percepción general sensorial de las leches fermentadas formuladas según el cuadro 8. Valores son presentados como media $\pm$ desviación estándar ($n = 2$). Diferentes literales representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

6.2. Vida Útil

6.2.1. Análisis Microbiológico

Los resultados de los análisis microbiológicos de las leches fermentadas durante su almacenamiento a 20, 30 y 40 °C, se presentan en los Cuadros 9 y 10. No se encontró crecimiento de ninguno de los microorganismos evaluados en las leches fermentadas tras el primer día de almacenamiento. En el día 40 se realizaron nuevamente las evaluaciones de hongos y levaduras y de coliformes totales y fecales. En ninguna de las evaluaciones hubo crecimiento de microorganismos. Esto puede deberse a que el pH de las bebidas se mantuvo por debajo del rango de pH donde ciertos coliformes pueden sobrevivir (Razmi *et al.*, 2023). A través de la fermentación ácido láctica de la leche, existe esta generación de ácidos carboxílicos, principalmente el ácido láctico y, por ende, disminución de pH que inhibe el crecimiento de bacterias patógenas (Alva-Araujo *et al.*, 2021). Además, en estudios anteriores, han demostrado que los ácidos orgánicos como el láctico pueden ejercer un efecto antimicrobiano en ciertas cepas de bacterias (Adeniyi *et*

al., 2015). Estos cambios de pH, combinado con un tratamiento térmico después de la fermentación, disminuye significativamente la posibilidad de crecimiento microbiano.

Cuadro 9. Crecimiento de hongos y levaduras y coliformes totales y fecales en las leches fermentadas incubadas a 20, 30 y 40 °C. ND: No detectado.

Día	20 °C	30 °C	40 °C
1	ND	ND	ND
40	ND	ND	ND
59	ND	ND	
74	ND		

Por otro lado, los ingredientes utilizados en la formulación de la bebida estudiada, también pueden ejercer un efecto antimicrobiano. Específicamente, la estevia ha demostrado tener efecto antimicrobiano con cepas patógenas en concentraciones tan bajas como 5 mg/mL (Myint *et al.*, 2023). La goma guar también podría estar inhibiendo el crecimiento microbiano, ya que su función es aumentar la viscosidad de la bebida mediante la absorción de agua, logrando así disminuir el agua disponible para el crecimiento microbiano (Pemble *et al.*, 2018).

Durante el estudio, al evaluar el crecimiento microbiano en medio MRS, en la búsqueda de BAL, no se observó crecimiento a través del tiempo en ninguna de las tres temperaturas de almacenamiento. Esto se puede deber al uso de leche descremada UHT, la cual contiene una carga microbiana casi nula a comparación de una leche bronca o pasteurizada (Setyawardani *et al.*, 2024). Además, el tratamiento térmico aplicado luego de la fermentación, inactiva las BAL inoculadas en la leche. Estos procesos térmicos ayudan a disminuir significativamente la probabilidad de crecimiento microbiano en la leche fermentada. En el Cuadro 10 se presentan los resultados del conteo microbiano en agar MRS a 37 °C.

Cuadro 10. Conteo microbiano en MRS en la leche fermentada formulada almacenada a 20, 30 y 40 °C. ND: No detectado.

Semana	20 °C	30 °C	40 °C
1	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND
6	ND	ND	
7	ND	ND	
8	ND	ND	
9	ND		
10	ND		
11	ND		
12	ND		

6.2.2. Análisis Fisicoquímico

La composición de las leches fermentadas fue analizada al principio y al final del estudio para identificar los posibles cambios que podrían ocurrir por los excesos de temperatura de incubación. Los valores de proteína, grasa, cenizas, humedad y carbohidratos están presentados en el cuadro 11.

Cuadro 11. Composición de la leche fermentada con *L. lactis* NRRL B-50572 antes y después del estudio de vida útil acelerada. LFSF: leche fermentada sin formulación, LFF: leche fermentada formulada. Los valores del cuadro son presentados como media $\pm$ desviación estándar (n = 2). Diferentes literales representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Muestra	% Proteína	% Grasa	% Cenizas	% Humedad	% Carbohidratos
LFSF	2.80 $\pm$ 0.02 a	0.30 $\pm$ 0.00 a	0.57 $\pm$ 0.03 b	90.53 $\pm$ 0.11 a	5.80 $\pm$ 0.10 d
LFF día 1	2.79 $\pm$ 0.10 a	0.30 $\pm$ 0.00 a	0.66 $\pm$ 0.00 a	88.09 $\pm$ 0.04 bc	8.17 $\pm$ 0.14 c
LFF día 40 - 40 °C	2.51 $\pm$ 0.10 b	0.30 $\pm$ 0.00 a	0.59 $\pm$ 0.02 b	87.94 $\pm$ 0.08 c	8.66 $\pm$ 0.01 b
LFF día 59 - 30 °C	1.91 $\pm$ 0.03 c	0.30 $\pm$ 0.00 a	0.60 $\pm$ 0.01 ab	87.89 $\pm$ 0.06 c	9.30 $\pm$ 0.01 a
LFF día 74 - 20 °C	2.58 $\pm$ 0.04 ab	0.30 $\pm$ 0.00 a	0.62 $\pm$ 0.00 ab	88.31 $\pm$ 0.05 b	8.19 $\pm$ 0.09 c

Los valores presentados en la tabla coinciden con los antes publicados para leches fermentadas con *L. lactis* NRRL B-50572 (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2013). En este caso, se encontraron

diferencias en porcentaje de proteína entre la leche fermentada sin formulación y las leches formuladas almacenadas a las 40 y 30 °C al día 40 y 59 de almacenamiento, respectivamente ($p < 0.05$). Esta diferencia se puede deber al tiempo y temperaturas de almacenamiento lo cual podrían degradar las proteínas. Lo anterior también se vio en estudios previos, los cuales demuestran una disminución en porcentaje de proteína a través del tiempo en muestras de yogurt expuestas a altas temperaturas (Rashid *et al.*, 2019). Por otro lado, el contenido de grasa de las leches fermentadas también coincide con lo publicado anteriormente. La leche descremada, por definición, debe contener menos del 0.5% de grasa butírica, según la normativa mexicana (NOM-155-SCFI-2012). De igual manera, no se encontraron diferencias entre las muestras ($p > 0.05$) debido a que ninguno de los ingredientes añadidos contiene grasa butírica. Los niveles bajos de grasa son ideales para el producto en desarrollo, ya que la meta es que ejerza un efecto hipocolesterolémico en el consumidor.

En cuanto al contenido de humedad en las leches fermentadas, si se encontraron diferencias. Se encontró que la leche fermentada sin ingredientes añadidos es la que contiene mayor nivel de humedad ($p < 0.05$). Esto se debe, simplemente, al contenido de sólidos que se agregaron a las leches formuladas. En la leche fermentada sin ingredientes, el contenido de humedad es del 90.53%, mientras que las leches fermentadas formuladas contienen alrededor de 88% de humedad. La sumatoria de los sólidos agregados es alrededor de 2.1%, lo cual concuerda con las diferencias en sólidos totales y humedad de las leches fermentadas formuladas en comparación con la leche fermentada por sí sola. Además, los valores determinados en estas evaluaciones también coinciden con lo publicado anteriormente por Ospina (2019). En esa leche fermentada con *L. lactis* NRRL B-50571, el contenido de humedad fue del 81.18%, en comparación del 88% de las leches formuladas en este estudio. Sin embargo, la diferencia se debe a que la formulación de ese estudio contenía el saborizante a un 10%, en vez del 0.5%, utilizado en el presente estudio (Ospina, 2019). No se encontraron diferencias entre el día 1 y las muestras almacenadas a 20, 30 y 40 °C, ya que las temperaturas de almacenamiento no fueron suficientemente altas para cambiar la cantidad de humedad del producto.

En el caso del porcentaje de carbohidratos presentes en la bebida, se vio que la leche fermentada sin formulación tiene un menor contenido ($p < 0.05$) de carbohidratos que las leches fermentadas formuladas. Esta diferencia es una consecuencia de los ingredientes utilizados en la formulación (Mudgil *et al.*, 2014; Shoaib *et al.*, 2016). Los ingredientes utilizados en las formulaciones

aumentan el porcentaje de carbohidratos en las bebidas en comparación con la leche fermentada sin ingredientes. Además, hay diferencias ($p < 0.05$) entre las muestras del día 1 y las muestras del día 40 y 59 almacenadas a 40 y 30 °C, respectivamente. Las diferencias en carbohidratos podrían deberse a la formación de complejos proteína-carbohidrato. Este tipo de complejos se puede formar en yogures con la adición suficiente de carbohidratos, ya que estos aumentan los puentes de hidrógeno y enlaces disulfuro (Li *et al.*, 2024). De la misma manera, los valores de ceniza se pueden haber elevado ($p < 0.05$) debido a esta exposición a temperatura alta por tiempo prolongado (59 días).

En la Figura 8 se presenta los valores de pH durante las 12 semanas del estudio. El día 1 se registró un pH de 4.14 para las 3 muestras. Durante la totalidad del estudio, los valores máximo y mínimo fueron 4.25 y 4.08, respectivamente. Los valores de pH coinciden con lo publicado anteriormente por Loaiza (2013) y Ospina (2019), quienes reportaron valores entre 4.1 y 4.3. Estos valores también coinciden con lo definido en la normativa mexicana para leches fermentadas (NOM-243-SSA1-2010), la cual indica que la leche fermentada debe tener un pH no mayor a 4.5. El crecimiento microbiano es un factor importante que puede influir el pH de la muestra durante el almacenamiento a diferentes temperaturas. Sin embargo, en las leches fermentadas de este estudio, no hubo ningún crecimiento y, por tanto, no se observó un cambio en pH.

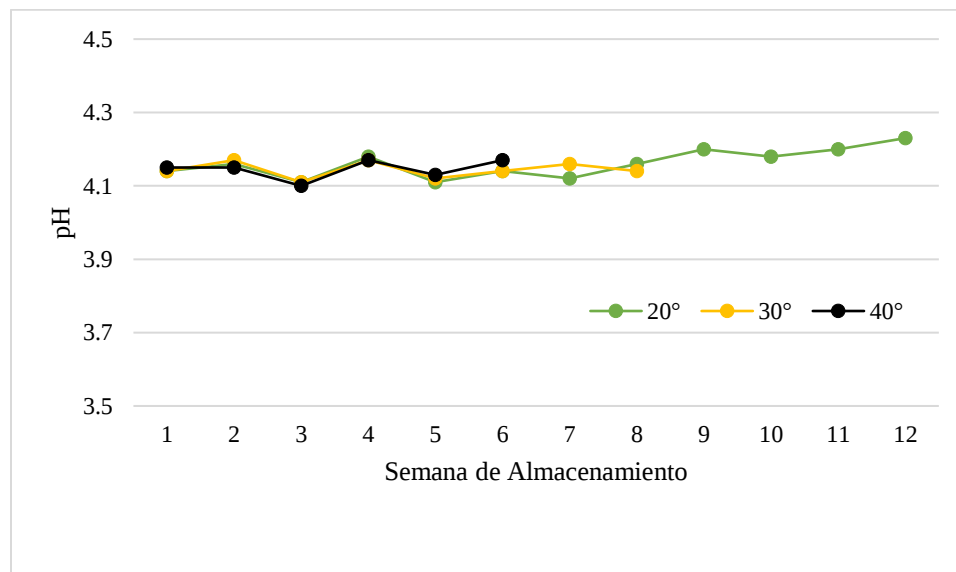


Figura 8. Valores de pH a través de las 12 semanas de almacenamiento en las leches fermentadas formuladas, almacenadas a 20, 30 y 40 °C.

Durante el tiempo de almacenamiento, hay un proceso conocido como sinéresis. Este proceso consiste en la separación espontánea del suero de leche en la red de caseína presente en la leche fermentada (Arab *et al.*, 2023). Los procesos que podrían afectar la sinéresis de la bebida incluyen los tratamientos térmicos excesivos y una baja cantidad de sólidos en la muestra (Loaiza, 2013). Esto se podría combatir aumentando la concentración de los ingredientes añadidos. Estudios previos han demostrado que aumentar la concentración de sólidos utilizando específicamente polvos de proteína láctea podría disminuir la sinéresis hasta un 14% (Arab *et al.*, 2023). Algo notable es como la temperatura es un factor importante en la separación del suero de leche. En la figura 9 se puede observar como a mayor temperatura, mayor separación de suero, lo cual coincide con lo publicado en estudios previos en leche fermentada con cepas de *L. lactis* (Loaiza, 2013; Ospina, 2019).

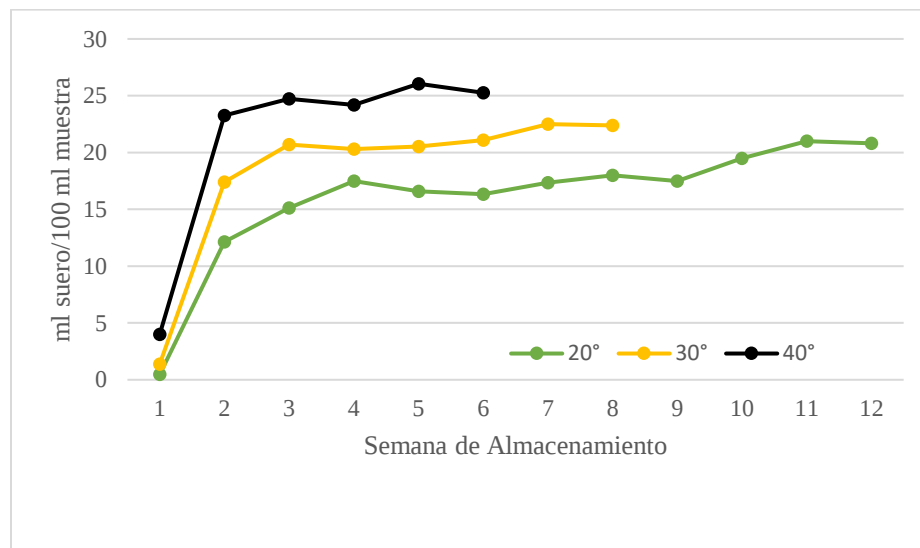


Figura 9. Sinéresis en las leches fermentadas formuladas, almacenadas a 20, 30 y 40 °C. Los valores son expresados en mL de suero en cada 100 mL de muestra.

6.2.3. Análisis de Actividad Hipocolesterolémica *In Vitro*

La actividad hipocolesterolémica fue evaluada al principio y al final del estudio, así como en una leche fermentada sin ingredientes añadidos. La Figura 10 ilustra los resultados del % de inhibición

de micelas de colesterol *in vitro*. El testigo positivo es un medicamento farmacológico (colestiramina), el cual reduce el colesterol sanguíneo y normalmente resulta en una inhibición micelar de colesterol del 70% aproximadamente. No se observaron diferencias entre la leche fermentada formulada al día uno y la leche fermentada sin formulación ($p > 0.05$), lo cual demuestra que la presencia de los ingredientes no altera la capacidad de inhibir la formación de micelas de colesterol en la leche fermentada por *L. lactis* NRRL B-50572. Tampoco se vieron diferencias ($p > 0.05$) entre la actividad hipocolesterolémica en la leche fermentada formulada al día uno y las leches fermentadas formuladas almacenadas a 20 y 30 °C, por 74 y 59 días respectivamente. Esto demuestra que los péptidos encargados de ejercer la actividad hipocolesterolémica en esta leche fermentada, son estables en almacenamiento a 20 y 30 °C. En la leche fermentada formulada almacenada por 40 días a 40 °C si se observó una disminución en la actividad hipocolesterolémica ($p < 0.05$). Este cambio se puede deber a la exposición prolongada de la bebida a una temperatura elevada, lo cual podría afectar el contenido de proteína y péptidos en la muestra (Rashid *et al.*, 2019). En grandes rasgos, la actividad hipocolesterolémica se mantiene en la leche fermentada al ser almacenada a 20 y 30 °C durante su evaluación de vida útil acelerada mientras que, al estar en 40 °C, se observa esta disminución al final del estudio.

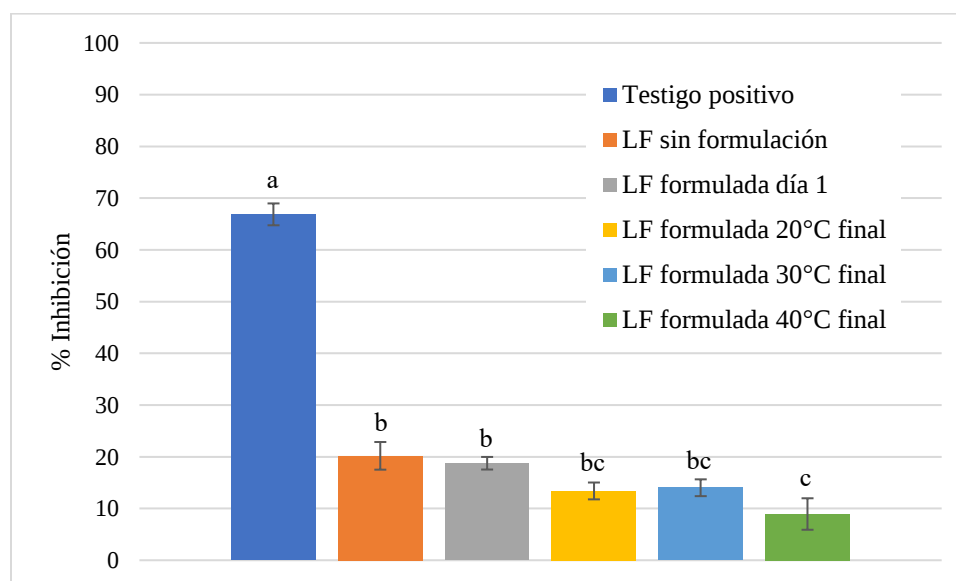


Figura 10. Porcentaje de inhibición de micelas de colesterol en las leches fermentadas durante el estudio de vida útil. Los datos son presentados como media $\pm$ desviación estándar. Diferentes literales representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$). LF: leche fermentada

6.2.4. Estimación de Vida Útil

La calidad sensorial de la bebida fue monitoreada durante el tiempo de almacenamiento para las bebidas almacenadas a 20, 30 y 40 °C. Estudios previos han demostrado que el factor crítico para la estimación de la vida de útil de leches fermentadas con cepas de *L. lactis* es la calidad sensorial (Loaiza, 2013; Ospina, 2019). Aunque es importante evaluar los parámetros físicoquímicos y microbiológicos para asegurar que cumplan con la normativa mexicana, se ha demostrado que la calidad sensorial es lo primero que sale de los rangos aceptables en los estudios de vida útil en este tipo de productos. Las leches se evaluaron en comparación a una muestra fresca de leche fermentada formulada para comparar su calidad sensorial y así determinar su pérdida de calidad a través del tiempo. Las figuras 11, 12 y 13 presentan los datos de calidad sensorial de las bebidas a cada temperatura durante las 12 semanas de almacenamiento.

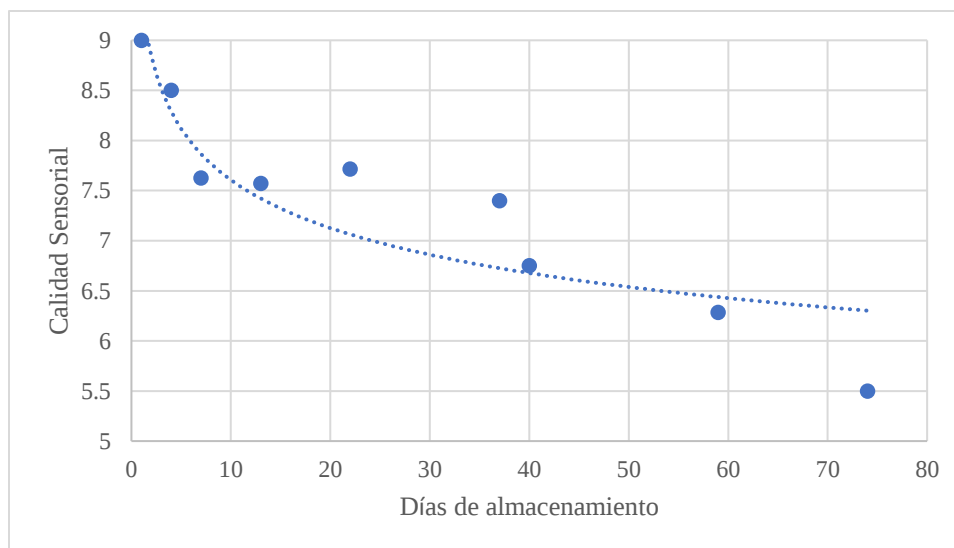


Figura 11. Calidad sensorial de las leches fermentadas almacenadas a 20 °C durante 74 días. Los datos son la media de valores de un panel entrenado.

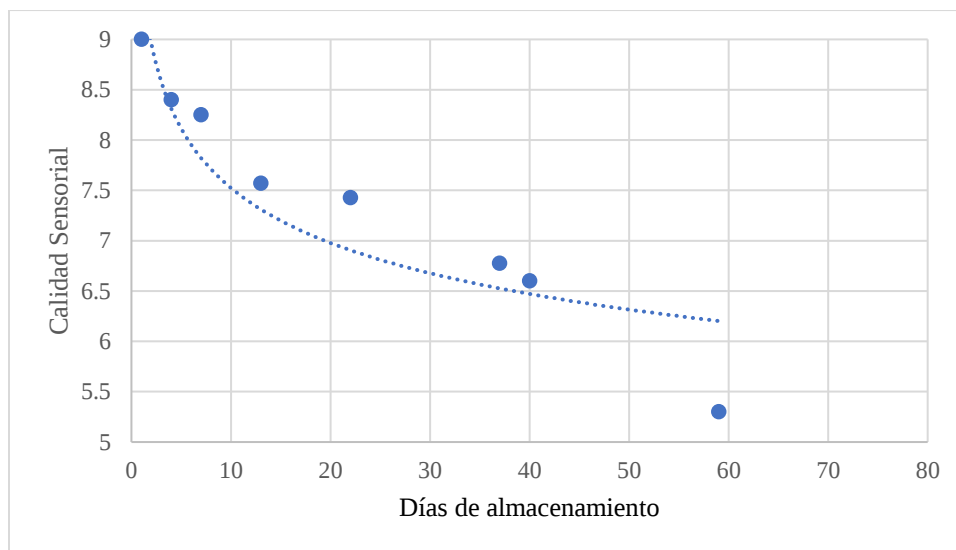


Figura 12. Calidad sensorial de las leches fermentadas almacenadas a 30 °C durante 59 días. Los datos son la media de valores de un panel entrenado.

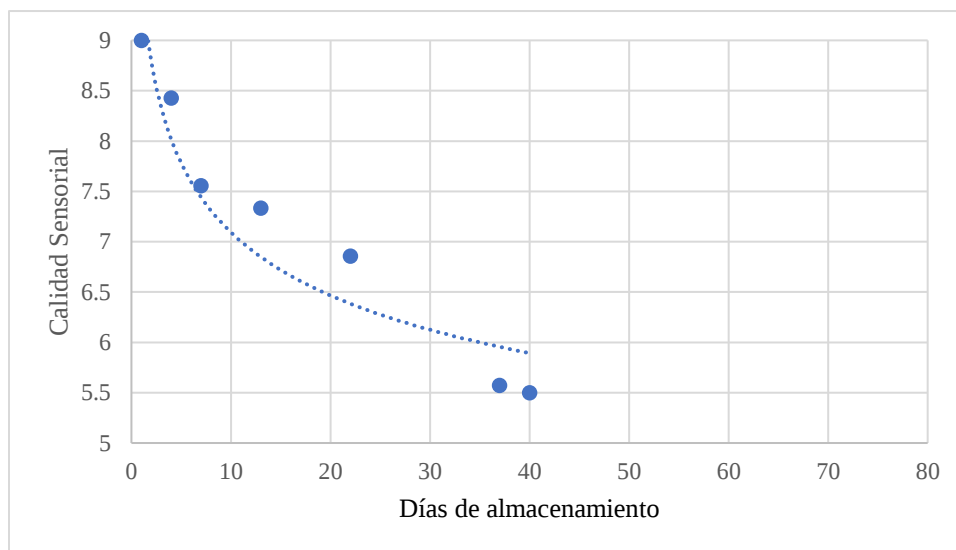


Figura 13. Calidad sensorial de las leches fermentadas almacenadas a 40 °C durante 40 días. Los datos son la media de valores de un panel entrenado.

Las bebidas comenzaron con un valor de calidad de 9, el cual representa una calidad excelente. En cada evaluación, el panelista comparaba la muestra problema con la referencia, la cual se mantenía en la calidad sensorial excelente con valor de 9. Las muestras almacenadas en 20 °C mantuvieron una calidad sensorial buena a muy buena (≥ 7) hasta el día 40 de almacenamiento. Lo anterior concuerda con estudios previos que reportan que una leche fermentada formulada con ingredientes

similares y almacenada a 20 °C, mantuvo una calidad sensorial buena a muy buena (≥ 7) por más de 30 días (Ospina, 2019). De igual manera, la leche almacenada a esta temperatura al día 59, aún mantuvo una calidad sensorial satisfactoria, con un valor promedio de calidad sensorial de 5.5 al final de los 74 días.

Las leches formuladas y almacenadas a 30 °C tuvieron un deterioro similar a las leches almacenadas a 20 °C. Sin embargo, estas habían tenido un deterioro del 24.7% al día 37 de almacenamiento. A esta temperatura, los resultados difieren de los reportados anteriormente por Ospina (2019), quien reportó deterioro que las bebidas almacenadas a 30 °C alcanzaron un valor de 5.43, lo cual se encuentra por debajo del límite comercial de aceptabilidad tolerable. El almacenamiento de las bebidas a temperaturas elevadas causa la volatilización de compuestos, lo cual disminuye la intensidad de aromas y sabores. En este caso, el deterioro sensorial de las bebidas se puede deber a esta exposición a altas temperaturas y consecuentemente la volatilización de componentes que aportan sabor y aroma al producto. El deterioro final de las bebidas almacenadas a esta temperatura fue de 41.1% al día 59 de almacenamiento.

Por otro lado, las bebidas almacenadas a 40 °C tuvieron un deterioro más rápido. Estas obtuvieron valores de calidad sensorial tolerable (< 7) al día 22 de evaluación, representando un deterioro del 26.8%. Sin embargo, esto demuestra una mejora en la estabilidad de la bebida en comparación con lo reportado por Loaiza (2013), quien reportó deterioros de hasta 50% al día 25 de almacenamiento a 4 °C. Esta resistencia al cambio por parte de las bebidas evaluadas en este estudio, a pesar de los excesos de temperatura, demuestran una mejora en la formulación y procesos de fermentación y envasado. Como se mencionó anteriormente, esto también se puede deber al uso de leche descremada UHT en comparación de otros estudios que han utilizado leche descremada en polvo reconstituida (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2013, Loaiza, 2013; Ospina, 2019).

Los cálculos de vida útil se llevaron a cabo mediante una reacción de primer orden, lo cual significa que el deterioro de las bebidas es variable a través del tiempo. En las Figuras 14, 15 y 16 se visualiza el logaritmo natural de la pérdida de calidad en almacenamiento a 20, 30 y 40 °C. De estas figuras, se pueden tomar los valores de la constante de la velocidad de reacción de deterioro (k), para cada temperatura de almacenamiento. Estos valores son presentados en el cuadro 12.

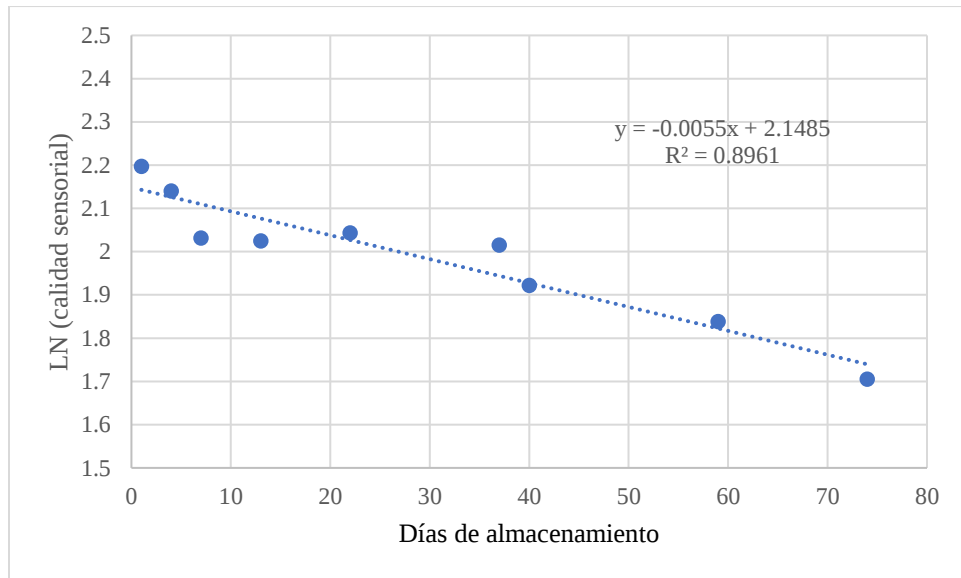


Figura 14. LN de calidad sensorial en función del tiempo de almacenamiento a 20 °C por 74 días.

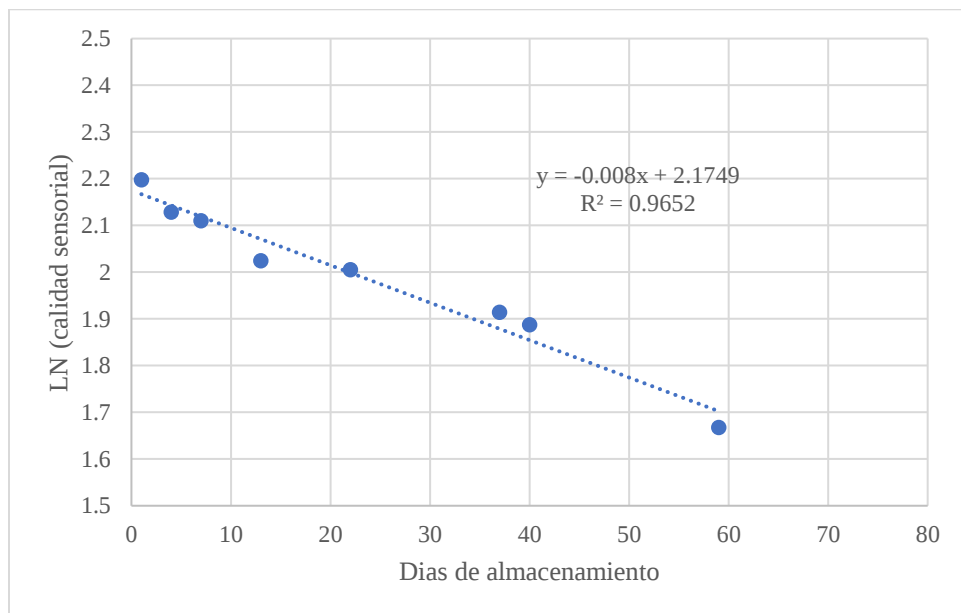


Figura 15. LN de calidad sensorial en función del tiempo de almacenamiento a 30 °C por 59 días.

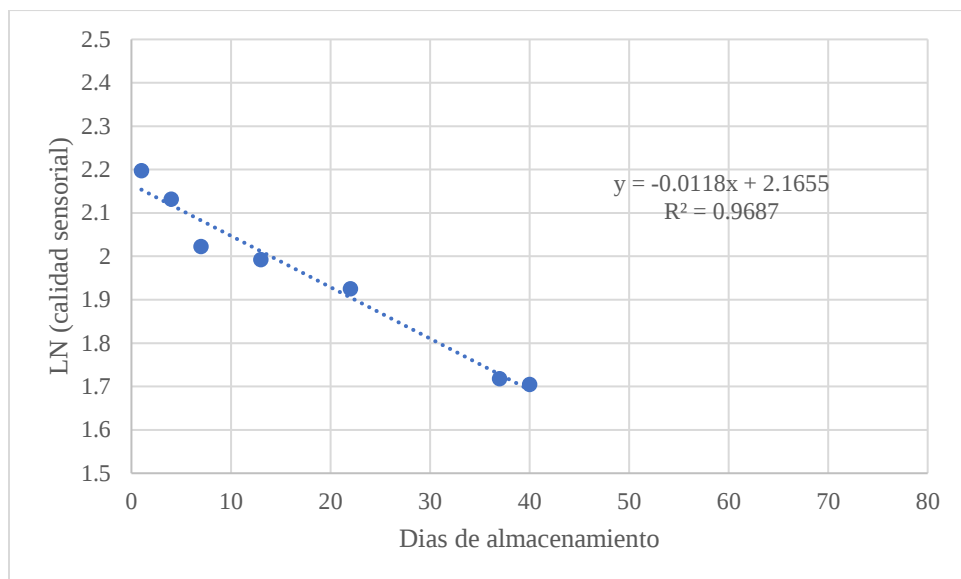


Figura 16. LN de calidad sensorial en función del tiempo de almacenamiento a 40 °C por 40 días.

Cuadro 12. Constantes de velocidad de reacción de deterioro (k) para la calidad sensorial en cada una de las temperaturas de almacenamiento.

Almacenamiento °C	Constante de velocidad de reacción (k)
20	0.0055
30	0.0080
40	0.0118

Luego, se obtuvieron los valores de logaritmo natural de la constante de velocidad de reacción y se graficaron en la figura 17 en función de las temperaturas de almacenamiento en Kelvin.

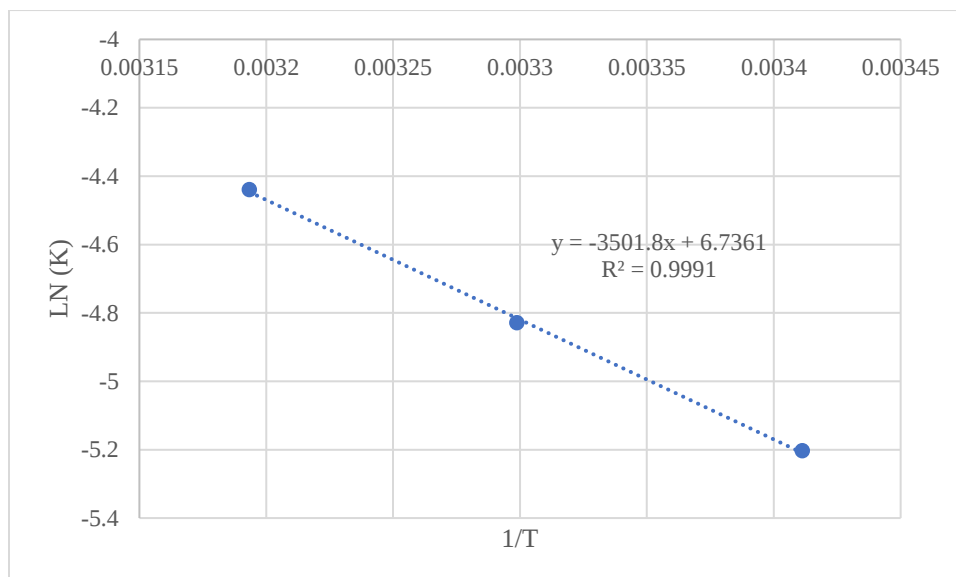


Figura 17. LN de k en función de las temperaturas de almacenamiento.

Al usar la ecuación de Arrhenius y tomar el logaritmo natural de ambos lados, queda una ecuación lineal ($y = mx + b$). Al graficar los valores de esta ecuación, se puede calcular la energía de activación y la frecuencia de la reacción.

$$\ln(k) = \ln(A) + \left(\frac{-E_a}{RT}\right)$$

Donde:

k = constante de velocidad de reacción de deterioro

A = frecuencia de reacción

E_a = energía de activación

R = constante de gases ideales

T = temperatura en Kelvin

Primero, se calculó la energía de activación utilizando la gráfica, ya que la pendiente de la figura 16 es equivalente a $-E_a/R$. El valor obtenido de la E_a fue de 29,115.7 kJ/mol, la cual se utilizó para

el cálculo de k posteriormente. Luego, se calculó la frecuencia de reacción utilizando el intercepto de la figura 16, el cual equivale al logaritmo natural de la frecuencia. Utilizando estos valores, se calculó nuevamente los valores de k para así poder estimar los valores de vida útil para cada temperatura de almacenamiento.

Utilizando los valores de k calculados para cada temperatura y el valor crítico de calidad sensorial (5.5) como límite. Se calculó el logaritmo natural de la vida útil para las tres temperaturas de almacenamiento del estudio. Se utilizó la ecuación de la figura 18 para así calcular la vida útil de la leche fermentada almacenada a diferentes temperaturas. Los valores estimados de vida útil se presentan en el cuadro 13.

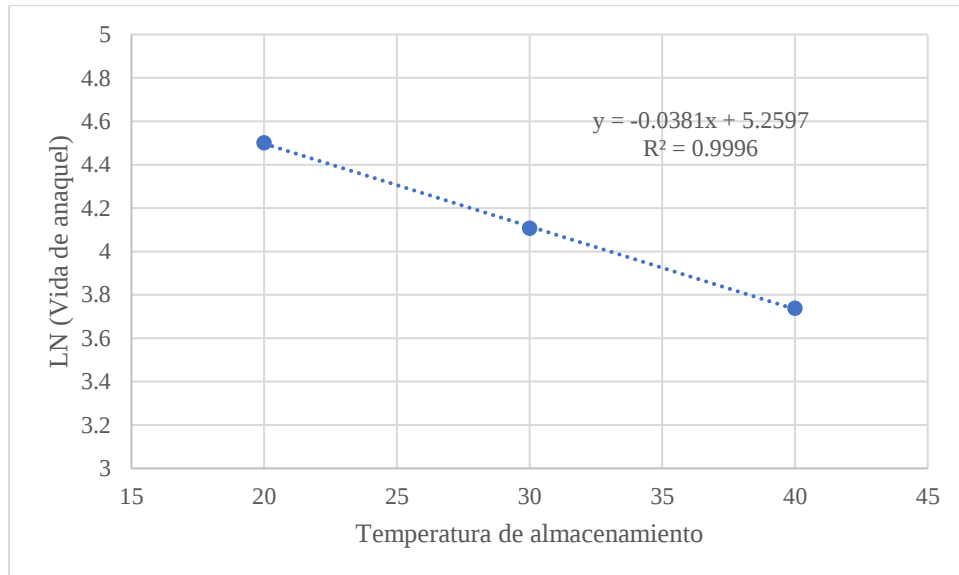


Figura 18. LN de la vida útil en función de la temperatura de almacenamiento.

Cuadro 13. Valores estimados de vida útil para las leches fermentadas formuladas, almacenadas a diferentes temperaturas.

Almacenamiento (°C)	Vida útil (días)
4	165
10	131
20	90
30	61

Los resultados de esta estimación difieren con lo publicado anteriormente para una leche fermentada por cepas de *L. lactis* formulada con ingredientes similares (Ospina, 2019). En ese estudio, una leche fermentada y adicionada con inulina, goma guar, estevia y un saborizante de mango, obtuvo una vida útil estimada de 165 días almacenada a 4 °C. Por otro lado, los valores estimados en este estudio para 10, 20 y 30 °C fueron 131, 90 y 61 días, respectivamente. Para corroborar las estimaciones de vida útil, se decidió estimar la vida útil de la bebida almacenada a 40 °C, lo cual resultó en una vida útil de 42 días, un resultado similar a lo obtenido experimentalmente en este estudio, 40 días a 40 °C. Además, al corroborar la vida útil de la bebida almacenada a 30 °C, se obtuvo un valor de 61 días, lo cual se acerca mucho al valor obtenido en el experimento de 59 días. Esta similitud en estimaciones de vida útil se puede deber a la similitud de las formulaciones utilizadas en cada estudio (Ospina, 2019). La presencia de la goma guar e inulina, ayudaron a alargar la vida útil, aumentando la estabilidad del producto mediante absorción de agua, lo cual además mejoró su calidad sensorial.

7. CONCLUSIONES

Mediante el presente estudio, se concluyó que la adición de los ingredientes utilizados, no afectó la capacidad hipocolesterolémica de la leche fermentada con *L. lactis* NRRL B-50572. El prototipo evaluado en el presente estudio presentó buena calidad sensorial y demostró tener una larga vida útil, lo cual aumenta su versatilidad para coadyuvar en este padecimiento, particularmente en áreas de escasos recursos donde no se cuente con almacenamiento en refrigeración. Esto se logró a través de buenas prácticas de manufactura desde el momento de la fermentación de la leche a nivel planta piloto, hasta en la posterior formulación, tratamiento térmico y envasado del producto.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda para estudios posteriores, evaluar esta leche fermentada formulada en un estudio murino para determinar si la capacidad hipocolesterolémica se mantiene al considerar los factores de un organismo en comparación a una metodología *in vitro*.

9. REFERENCIAS

- Abesinghe, A. M. N. L., Islam, N., Vidanarachchi, J. K., Prakash, S., Silva, K. F. S. T. y Karim, M. A. (2019). Effects of ultrasound on the fermentation profile of fermented milk products incorporated with lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 90, 1-14.
- Adeniyi, B. A., Adetoye, A., & Ayeni, F. A. (2015). Antibacterial activities of lactic acid bacteria isolated from cow faeces against potential enteric pathogens. *African Health Sciences*, 15(3), 888-895.
- Alva Araujo, J. P., Cano Arcos, G. A., Juscamaita Morales, J. G., & Quipuzco Ushñahua, L. (2021). Reduction of pH by homolactic fermentation as indicator of fecal coliform inactivation in wastewater. *Ecología aplicada*, 20(1), 93-100.
- AOAC (2000) Official method of Analysis. (17th edn), Washington DC: Association of Officiating Analytical Chemists.
- Arab, M., Yousefi, M., Khanniri, E., Azari, M., Ghasemzadeh-Mohammadi, V., & Mollakhalili-Meybodi, N. (2023). A comprehensive review on yogurt syneresis: Effect of processing conditions and added additives. *Journal of Food Science and Technology*, 60(6), 1656-1665.
- Baker, M. T., Lu, P., Parrella, J. A. y Leggette, H. R. (2022). Consumer Acceptance toward Functional Foods: A Scoping Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(3), 1217.
- Beltrán-Barrientos, L. M., Garcia, H. S., Reyes-Díaz, R., Estrada-Montoya, M. C., Torres-Llanez, M. J., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F. y Vallejo-Cordoba, B. (2019). Cooperation between *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 and NRRL B-50572 for Aroma Formation in Fermented Milk. *Foods*, 8(12), 645.
- Beltrán-Barrientos, L. M., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, A., Torres-Inguanzo, E. H., Astiazarán-García, H., Esparza-Romero, J. y Vallejo-Cordoba, B. (2018). Randomized double-blind controlled clinical trial of the blood pressure-lowering effect of fermented milk with *Lactococcus lactis*: A pilot study. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 2819-2825.
- Bezie, A. (2019). The effect of different heat treatment on the nutritional value of milk and milk products and shelf-life of milk products. A review. *Journal of Dairy & Veterinary Sciences*, 11(5), 555822.
- Birch, C. S. y Bonwick, G. A. (2019). Ensuring the future of functional foods. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(5), 1467-1485.
- Brilliantina, A., Wardani, D. K., Fadhila, P. T., Hariono, B., & Wijaya, R. (2022). Accelerated shelf life test method with arrhenius approach for shelf life estimation of tongkol 'euthynnus affinis' balado in cans. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 980, No. 1, p. 012038).
- Carneiro, R. C. V., Yin, Y., Duncan, S. E. y O'Keefe, S. F. (2021). Edamame Flavor Characteristics Driving Consumer Acceptability in the United States: A Review. *ACS Food Science & Technology*, 1(10), 1748-1756.

- Carson, J. A. S., Lichtenstein, A. H., Anderson, C. A., Appel, L. J., Kris-Etherton, P. M., Meyer, K. A., ... & Van Horn, L. (2020). Dietary cholesterol and cardiovascular risk: a science advisory from the American Heart Association. *Circulation*, *141*(3), e39-e53.
- Coolbear, T., Janin, N., Traill, R. y Shingleton, R. (2022). Heat-induced changes in the sensory properties of milk. *International Dairy Journal*, *126*, 105199.
- Čurlej, J., Zajác, P., Čapla, J., Golian, J., Benešová, L., Partika, A., ... & Jakabová, S. (2022). The effect of heat treatment on cow's milk protein profiles. *Foods*, *11*(7), 1023.
- Dan, T., Ren, W., Liu, Y., Tian, J., Chen, H., Li, T. y Liu, W. (2019). Volatile Flavor Compounds Profile and Fermentation Characteristics of Milk Fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2183.
- de Souza, A. H. P., Costa, G. A. N., da Silva Miglioranza, L. H., Furlaneto-Maia, L. y Oliveira, A. F. (2013). Microbiological, physical, chemical and sensory characteristics of milk fermented with *Lactobacillus plantarum*. *Acta Scientiarum. Health Sciences*, *35*(1), 125-131.
- Farag, M. A., Saleh, H. A., El Ahmady, S. y Elmassry, M. M. (2022). Dissecting Yogurt: the Impact of Milk Types, Probiotics, and Selected Additives on Yogurt Quality. *Food Reviews International*, *38*(sup1), 634-650.
- Giménez, A., Ares, F., & Ares, G. (2012). Sensory shelf-life estimation: A review of current methodological approaches. *Food research international*, *49*(1), 311-325.
- Górska-Warsewicz, H., Rejman, K., Laskowski, W. y Czacotko, M. (2019). Milk and Dairy Products and Their Nutritional Contribution to the Average Polish Diet. *Nutrients*, *11*(8), 1771.
- Granato, D., Barba, F. J., Bursać Kovačević, D., Lorenzo, J. M., Cruz, A. G. y Putnik, P. (2020). Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annual Review of Food Science and Technology*, *11*(1), 93-118.
- Hovjecki, M., Miloradovic, Z., Rac, V., Pudja, P. y Miocinovic, J. (2020). Influence of heat treatment of goat milk on casein micelle size, rheological and textural properties of acid gels and set type yoghurts. *Journal of Texture Studies*, *51*(4), 680-687.
- Ibarra, A., Acha, R., Calleja, M. T., Chiralt-Boix, A., & Wittig, E. (2012). Optimization and shelf life of a low-lactose yogurt with *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *Journal of Dairy Science*, *95*(7), 3536-3548.
- Jurášková, D., Ribeiro, S. C., & Silva, C. C. (2022). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from biosynthesis to health-promoting properties. *Foods*, *11*(2), 156.
- Jia, W., Du, A., Fan, Z. y Shi, L. (2022). Novel insight into the transformation of peptides and potential benefits in brown fermented goat milk by mesoporous magnetic dispersive solid phase extraction-based peptidomics. *Food Chemistry*, *389*, 133110.
- Kamber, U. y Harmankaya, S. (2019). The effect of fruits to the characteristics of fruit yogurt. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, *56*(2), 495-502.
- Kaur, H., Kaur, G. y Ali, S. A. (2022). Dairy-Based Probiotic-Fermented Functional Foods: An Update on Their Health-Promoting Properties. *Fermentation*, *8*(9), 425.
- Kleerebezem, M., Bachmann, H., van Pelt-KleinJan, E., Douwenga, S., Smid, E. J., Teusink, B. y

- van Mastrigt, O. (2020). Lifestyle, metabolism and environmental adaptation in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(6), 804-820.
- Li, D., Peng, J., Kwok, L.-y., Zhang, W. y Sun, T. (2022). Metabolomic analysis of *Streptococcus thermophilus* S10-fermented milk. *LWT - Food Science and Technology*, 161, 113368.
- Li, J., Zhou, T., Yang, Z., Cen, Q., Zhang, R., Hui, F., ... & Zeng, X. (2024). Physicochemical, structural and metabolic products of yogurt as affected by *Coriolus versicolor* fermented sweet potato pulp water. *Food Chemistry: X*, 101582.
- Lievore, P., Simões, D. R. S., Silva, K. M., Drunkler, N. L., Barana, A. C., Nogueira, A. y Demiate, I. M. (2015). Chemical characterisation and application of acid whey in fermented milk. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 2083-2092.
- Liu, A., Zhang, H., Liu, T., Gong, P., Wang, Y., Wang, H., Tian, X., Liu, Q., Cui, Q., Xie, X., Zhang, L. y Yi, H. (2022). Aroma classification and flavor characterization of *Streptococcus thermophilus* fermented milk by HS-GC-IMS and HS-SPME-GC-TOF/MS. *Food Bioscience*, 49, 101832.
- Loaiza-Anaya, S.G. (2013). Perfilamiento Tecnológico de Leches Fermentadas Antihipertensivas (Maestria en Ciencias), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. , Hermosillo, Sonora.
- Luzardo-Ocampo, I., Ramírez-Jiménez, A. K., Yañez, J., Mojica, L. y Luna-Vital, D. A. (2021). Technological Applications of Natural Colorants in Food Systems: A Review. *Foods*, 10(3), 634.
- Meilgaard, M. C., Carr, B. T., & Civille, G. V. (1999). *Sensory Evaluation Techniques*. CRC press.
- Minj, S. y Anand, S. (2020). Whey Proteins and Its Derivatives: Bioactivity, Functionality, and Current Applications. *Dairy*, 1(3), 233-258.
- Mudgil, D., Barak, S., & Khatkar, B. S. (2014). Guar gum: processing, properties and food applications—a review. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 409-418.
- Myint, K. Z., Zhou, Z., Shi, Q., Chen, J., Dong, X., & Xia, Y. (2023). Stevia Polyphenols, Their Antimicrobial and Anti-Inflammatory Properties, and Inhibitory Effect on Digestive Enzymes. *Molecules*, 28(22), 7572.
- Narayana, N. K., Govinda, G., Kumari, A. V., & Palliyaguru, O. G. (2022). Effect of sugar replacement with stevia on quality of vanilla flavoured cow milk set yoghurt. *Food Research*, 6(5), 174-182.
- Nikitina, E., Riyanto, R. A., Vafina, A., Yurtaeva, T., Tsyganov, M. y Ezhkova, G. (2019). Effect of fermented modified potato starches to low-fat yogurt. *Journal of Food and Nutrition Research*, 7(7), 549-553.
- NOM-155-SCFI-2012, Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
- NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Ospina Romero, M. A., (2019). *Caracterizacion y Evaluacion de la Bioactividad de Leche Fermentada Antihipertensiva Durante su Vida Util.* (Maestria en Ciencias), Centro de

Investigacion en Alimentacion y Desarrollo, A.C. , Hermosillo, Sonora.

- Otunola, G. A., & Martirosyan, D. (2021). Choosing suitable food vehicles for functional food products. *Functional Foods in Health and Disease*, 11(2), 44-55.
- Papaioannou, G. M., Kosma, I. S., Dimitreli, G., Badeka, A. V. y Kontominas, M. G. (2022). Effect of starter culture, probiotics, and flavor additives on physico-chemical, rheological, and sensory properties of cow and goat dessert yogurts. *European Food Research and Technology*, 248(4), 1191-1202.
- Pemble, J., & Chabrelie, A. (2018). Understanding the Impact of Fluid Viscosity on the Growth and Conjugation of Antimicrobial Resistant Donors and Recipients Pairs. *Journal of Health Disparities Research and Practice*, 12(4), 37.
- Quezada Catalán, N. (2011). Clasificación de la calidad sensorial de pan tipo hallulla mediante visión computacional. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Baines, S. K., Balthazar, C. F., Cruz, A. G., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., Pimentel, T. C., Wittwer, A. E., Naumovski, N., Graça, J. S., Sant'Ana, A. S., Ajlouni, S. y Vasiljevic, T. (2019). Probiotics in Goat Milk Products: Delivery Capacity and Ability to Improve Sensory Attributes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(4), 867-882.
- Rashid, A. A., Huma, N., Saeed, S., Shahzad, K., Ahmad, I., Ahmad, I., & Imran, M. (2019). Characterization and development of yoghurt from concentrated whey. *Int. J. Food Eng*, 3, 1-7.
- Razmi, N., Lazouskaya, M., Pajcin, I., Petrovic, B., Grahovac, J., Simic, M., ... & Stojanovic, G. M. (2023). Monitoring the effect of pH on the growth of pathogenic bacteria using electrical impedance spectroscopy. *Results in Engineering*, 20, 101425.
- Rendón-Rosales, M. Á., Torres-Llanez, M. J., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, A., Mazorra-Manzano, M. A. y Vallejo-Cordoba, B. (2019). In Vitro Antithrombotic and Hypcholesterolemic Activities of Milk Fermented with Specific Strains of *Lactococcus lactis*. *Nutrients*, 11(9), 2150.
- Rendón-Rosales, M. A., Mazorra-Manzano, M. A., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2023). Hypcholesterolemic Effect of Milks Fermented with Specific Strains of *Lactococcus lactis* in Hypercholesterolemic Sprague–Dawley Rats. *ACS Food Science & Technology*, 3(9), 1440-1448.
- Rivero-Pino, F. (2023). Bioactive food-derived peptides for functional nutrition: Effect of fortification, processing and storage on peptide stability and bioactivity within food matrices. *Food Chemistry*, 406, 135046.
- Rocha, D. M. U. P., Martins, J. d. F. L., Santos, T. S. S. y Moreira, A. V. B. (2014). Labneh with probiotic properties produced from kefir: development and sensory evaluation. *Food Science and Technology*, 34, 694-700.
- Rodríguez-Figueroa, J., González-Córdova, A., Astiazaran-García, H., Hernández-Mendoza, A. y Vallejo-Cordoba, B. (2013). Antihypertensive and hypolipidemic effect of milk fermented by specific *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4094-4099.
- Roth, G. A., Mensah, G. A., Johnson, C. O., Addolorato, G., Ammirati, E., Baddour, L. M., ... &

- GBD-NHLBI-JACC Global Burden of Cardiovascular Diseases Writing Group. (2020). Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD 2019 study. *Journal of the American college of cardiology*, 76(25), 2982-3021.
- Şanlı, S., Kılıçarslan, S. y Şanlı, N. (2022). Evaluation of natamycin in commercial dairy products by a green capillary zone electrophoresis method and confirmation with a Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Food Bioscience*, 50, 102114.
- Schaller-Povolny, L. A., & Smith, D. E. (2002). Interaction of milk proteins with inulin. *Milchwissenschaft*, 57(9-10), 494-496.
- Schiatti-Sisó, I. P., Quintana, S. E., & García-Zapateiro, L. A. (2023). Stevia (*Stevia rebaudiana*) as a common sugar substitute and its application in food matrices: an updated review. *Journal of Food Science and Technology*, 60(5), 1483-1492.
- Setyawardani, T., Sumarmono, J., Rahardjo, A. H. D., Arkan, N. D., & Fadhlurrohman, I. (2024). Quality of yogurt produced from various types of milk as raw materials. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 1292, No. 1, p. 012020).
- Shoaib, M., Shehzad, A., Omar, M., Rakha, A., Raza, H., Sharif, H. R., ... & Niazi, S. (2016). Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydrate polymers*, 147, 444-454.
- Sun, X., Acquah, C., Aluko, R. E. y Udenigwe, C. C. (2020). Considering food matrix and gastrointestinal effects in enhancing bioactive peptide absorption and bioavailability. *Journal of Functional Foods*, 64, 103680.
- Sun, X. y Udenigwe, C. C. (2020). Chemistry and Biofunctional Significance of Bioactive Peptide Interactions with Food and Gut Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(46), 12972-12977.
- Szajnar, K., Znamirska, A. y Kuźniar, P. (2020). Sensory and textural properties of fermented milk with viability of *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* Bb-12 and increased calcium concentration. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 582-598.
- Tribby, D., & Teter, V. (2023). Yogurt. In *The sensory evaluation of dairy products* (pp. 199-234). Cham: Springer International Publishing.
- Timmis, A., Vardas, P., Townsend, N., Torbica, A., Katus, H., De Smedt, D., ... & Achenbach, S. (2022). European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021. *European heart journal*, 43(8), 716-799.
- Topolska, K., Florkiewicz, A. y Filipiak-Florkiewicz, A. (2021). Functional Food—Consumer Motivations and Expectations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(10), 5327.
- Udenigwe, C. C., Abioye, R. O., Okagu, I. U. y Obeme-Nmom, J. I. (2021). Bioaccessibility of bioactive peptides: recent advances and perspectives. *Current Opinion in Food Science*, 39, 182-189.
- Wang, Y., Zheng, Y., Liu, Y., Shan, G., Zhang, B., Cai, Q., ... & Qu, Y. (2023). The lipid-lowering effects of fenugreek gum, hawthorn pectin, and burdock inulin. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1149094.

- Watts, G. F., Catapano, A. L., Masana, L., Zambon, A., Pirillo, A., & Tokgözoğlu, L. (2020). Hypercholesterolemia and cardiovascular disease: focus on high cardiovascular risk patients. *Atherosclerosis Supplements*, 42, e30-e34.
- Wittig de Penna, E., Serrano, L., Bunger, A., Soto, D., López, L., Hernández, N., & Ruales, J. (2002). Optimización de una formulación de espaguetis enriquecidos con fibra dietética y micronutrientes para el adulto mayor. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 52(1), 91-100.
- Wu, T., Guo, S., Liu, K., Yang, Y., Wang, J. y Zhang, H. (2023). Comparison of volatile metabolic profiles in fermented milk of *Streptococcus thermophilus* during the postripening period at different incubation temperatures. *Journal of Dairy Science*, 106(4), 2303-2313.
- Xiong, G. Y., Chen, X., Zhang, X. X., Miao, Y., Zou, Y., Wang, D. Y. y Xu, W. M. (2020). Process optimization and the relationship between the reaction degree and the antioxidant activity of Maillard reaction products of chicken liver protein hydrolysates. *Poultry Science*, 99(7), 3733-3741.
- Yang, J., Zhang, S., Henning, S. M., Lee, R., Hsu, M., Grojean, E., ... & Li, Z. (2018). Cholesterol-lowering effects of dietary pomegranate extract and inulin in mice fed an obesogenic diet. *The Journal of nutritional biochemistry*, 52, 62-69.
- Yang, Y., Zhang, R., Zhang, F., Wang, B. y Liu, Y. (2023). Storage stability of texture, organoleptic, and biological properties of goat milk yogurt fermented with probiotic bacteria. *Frontiers in Nutrition*, 9.
- Yirmibeşoğlu, S. S. S. Y Öztürk, B. E. T. (2020). Comparing microbiological profiles, bioactivities, and physicochemical and sensory properties of donkey milk kefir and cow milk kefir. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 44(4), 774-781.
- Zambrano-Cervantes, M., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, A., Beltrán-Barrientos, L. M., Rendón-Rosales, M. Á., Manzanarez-Quin, C. G., ... & Vallejo-Cordoba, B. (2023). Fermented milks with specific *Lactobacillus* spp. with potential cardioprotective effects. *Journal of Food Science and Technology*, 60(6), 1749-1760.
- Zhang, L., Mi, S., Liu, R., Sang, Y. y Wang, X. (2020). Evaluation of Volatile Compounds in Milks Fermented Using Traditional Starter Cultures and Probiotics Based on Odor Activity Value and Chemometric Techniques. *Molecules*, 25(5), 1129.
- Zhao, Y., Khalesi, H., He, J., & Fang, Y. (2023). Application of different hydrocolloids as fat replacer in low-fat dairy products: Ice cream, yogurt and cheese. *Food Hydrocolloids*, 138, 108493.
- Zhou, T., Huo, R., Kwok, L.-Y., Li, C., Ma, Y., Mi, Z. y Chen, Y. (2019). Effects of applying *Lactobacillus helveticus* H9 as adjunct starter culture in yogurt fermentation and storage. *Journal of Dairy Science*, 102(1), 223-235.
- Znamirowska, A., Szajnar, K. y Pawlos, M. (2021). Effect of Vitamin C Source on Its Stability during Storage and the Properties of Milk Fermented by *Lactobacillus rhamnosus*. *Molecules*, 26(20), 6187.