



LECHES FERMENTADAS
TERAPÉUTICAS: CONTRIBUCIÓN A SU
COMPOSICIÓN NUTRICIONAL

UVa

AUTOR/A: MARINA – JUNCAL GUTIÉRREZ ÁLVAREZ

TUTOR/A: DRA. IRMA CARO CANALES

RESUMEN

Los productos lácteos fermentados se obtienen a través de la fermentación de la leche por la adición de bacterias ácido lácticas, responsables de las transformaciones metabólicas de los carbohidratos, las proteínas y los lípidos presentes en la leche. En el presente trabajo se ha estudiado la composición nutricional de cuatro leches fermentadas comerciales: Actimel[®], Densia Forte[®], Danacol[®] y Kaiku Benecol[®]. Cenizas, materia grasa, proteínas y minerales; Ca, P y Mg, acidez total, contenido en ácidos láctico y acético y pH fueron determinados. A sí mismo, se estudió la cantidad de microorganismos viables, a través de recuento en placa en Agar Man Rogosa Sharpe (MRSa) y recuento directo por citometría de flujo (CMF). El contenido de materia grasa de las leches fermentadas analizadas osciló entre <0,1 y 4,35% (p/v). Valor que resultó ser superior para Danacol[®] y Kaiku Benecol[®] respecto al resto de las leches fermentadas. El contenido de calcio, con un valor promedio de $171 \pm 9,10$ mg/100g; fue similar entre tres de las leches estudiadas pero superior para Densia Forte[®], cuyo contenido alcanzó hasta 400mg/100 g. El valor promedio del fósforo fue de $57,62 \pm 1,87$ mg/100g. Los resultados obtenidos para el recuento de microorganismos viables parecen ser más precisos por el método Citometría de flujo que el método tradicional de recuento en placa. El estudio de estas leches fermentadas comerciales nos permite conocer diferentes parámetros de su composición nutricional más allá de lo indicado en el etiquetado nutricional. Ésto permite ayudar al consumidor a eliminar falsas expectativas de estos productos.

PALABRAS CLAVE: Leches fermentadas comerciales, composición nutricional, recuento de microorganismos viables y Citometría de flujo.

ABSTRACT

Fermented milk products are obtained from the fermentation of milk by the addition of lactic acid bacteria, responsible for the metabolic transformations of carbohydrates, proteins and lipids present in milk. This work has studied the nutritional composition of four commercial fermented milks: Actimel[®], Densia Forte[®], Danacol[®] y Kaiku Benecol[®]. Ash, fat, protein and minerals; Ca, P and Mg, total acidity, lactic and acetic acids contents and pH values were determined. We also studied the amount of viable microorganisms using count in Agar Man Rogosa Sharpe (MRS) plates and direct flow cytometry (CMF). Lipid content in fermented milks ranged from < 0.1 to 4.35% (w/v). Values resulted to be higher for Danacol[®] and Kaiku Benecol[®] than for the rest of the fermented milks. Calcium content, with an average of 171 ± 9.10 mg/100g, was similar between three of studied milks but higher for Densia Forte[®], which reached up to 400 mg/100 g. The average value of phosphorus was 57.62 ± 1.87 mg/100g. The results achieved for the count of viable microorganisms seemed to be more accurate using CMF than traditional plate count method. The study of these commercial fermented milks allowed us to know different parameters of their nutritional composition beyond those indicated in the nutrition labelling. These could help the consumer to eliminate false expectations of these products.

KEY WORDS: Commercial fermented milks, nutritional composition, count of viable microorganisms and Flow cytometry.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS	1
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	2
1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN.....	4
1.1. La leche y su papel en la nutrición.....	4
1.2. Fermentación de la leche.....	5
1.3. Principales diferencias entre el yogurt y el resto de leches fermentadas.....	8
1.4. Propiedades probióticas y terapéuticas de los microorganismos estárter en la fabricación de leches fermentadas.....	8
1.5. Importancia y modulación a través de la dieta de la microbiota intestinal.....	10
1.6. El consumo poblacional actual y evolución de las leches fermentadas en España.....	11
1.7. Citometría de flujo para detectar bacterias en alimentos.....	13
1.8. Justificación del trabajo.....	15
2. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS.....	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
3.1. Muestras.....	16
3.2. Parámetros físico – químicos.....	16
3.2.2. Composición nutricional de las leches fermentadas	16
3.3. Parámetros microbiológicos.....	22
3.3.1. Recuento de microorganismos.....	22
3.3.2. Análisis estadístico.....	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
5. CONCLUSIONES.....	33
6. BIBLIOGRAFÍA.....	34

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1. Clasificación de las Bacterias ácido lácticas según su fermentación.

Tabla 2. Efectos beneficiosos sobre la salud en humanos demostrados mediante ensayos clínicos.

Tabla 3. Composición nutricional de leches fermentadas (g/100g*). Datos experimentales.

Tabla 4. Composición nutricional de leches fermentadas (g/100g*). Datos obtenidos a partir de la etiqueta.

Tabla 5. Niveles de P, Ca y Mg en leches fermentadas.

Tabla 6. Valores de pH, acidez total (g de ácido láctico/100 g) y niveles de ácido láctico y acético en leches fermentadas (g de ácido /100 g).

Tabla 7. Contenido de distintas fracciones nitrogenadas (g de nitrógeno /100g).

Tabla 8. Recuento de microorganismos mediante citometría de flujo (AFU/100g) y recuento en placa (Log ufc/100g).

Figuras

Figura 1. Diagrama de flujo de elaboración de leches fermentadas.

Figura 2. Funciones beneficiosas de la flora intestinal representada por los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Figura 3. Consumo nacional de leches fermentadas en intervalo anual de 2013/2016 (volumen consumido en miles de kg).

Figura 4. Accesibilidad para el consumo nacional de leches fermentadas en intervalo anual de 2013/2016 (precio medio en €).

Figura 5. Ilustración de dos de los sistemas principales que constituyen un citómetro de flujo; Sistema de fluidos y sistema óptico.

Figura 6. Ejemplo de CMF (*Lactobacillus casei paracasei*) en gráfica de puntos con fluorescencia verde (FL1) vs. Fluorescencia roja (FL3).

Figura 7. **(A)** Curva de calibración del ácido láctico con valores ajustados mediante regresión lineal e interpolando el valor del área obtenida para el ácido láctico. **(B)**

Curva de calibración del ácido acético con valores ajustados mediante regresión lineal e interpolando el valor del área obtenida para el ácido acético.

Figura 8. Curva patrón para la determinación de nitrógeno aminoacídico.

Figura 9. Ejemplo de Perfil de ácidos orgánicos presentes en la leche 3. Concentración *versus* tiempo de retención.

Figura 10. Ejemplo de Perfil de ácidos orgánicos presentes en la Leche 2. Concentración *versus* tiempo de retención.

Figura 11. Grafica de puntos con fluorescencia verde (SYTO 9[®]) vs. Fluorescencia roja (IP) del experimento llevado a cabo por CMF para la Leche 1.

Figura 12. Grafica de puntos con fluorescencia verde (SYTO 9[®]) vs. Fluorescencia roja (IP) del experimento llevado a cabo por CMF para la Leche 2.

Figura 13. Grafica de puntos con fluorescencia verde (SYTO 9[®]) vs. Fluorescencia roja (IP) del experimento llevado a cabo por CMF para la Leche 3.

Figura 14. Grafica de puntos con fluorescencia verde (SYTO 9[®]) vs. Fluorescencia roja (IP) del experimento llevado a cabo por CMF para la Leche 4.

1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN.

1.1. *La leche y su papel en la nutrición.*

La leche es el fluido biológico que secretan las hembras de los mamíferos y cuyo papel es aportar los nutrientes requeridos por el recién nacido de la especie correspondiente ⁽¹⁾, ya que durante los primeros meses de vida, es la única fuente de nutrientes.

Más allá de la lactación, el hombre utiliza para alimentarse un sustituto de la leche materna, la leche de vaca. Los beneficios de la leche de vaca no se limitan únicamente a la extraordinaria relación entre el contenido en nutrientes y el aporte energético, sino que se extienden más allá y constituyen un factor de prevención en determinadas patologías asociadas como pueden ser la hipertensión arterial, la enfermedad cardiovascular o la patología ósea ⁽²⁾. Por todo ello, afirmamos que es un alimento clave, aconsejando que forme parte de la dieta en todas las etapas de la vida.

La importancia de éste alimento en la nutrición del ser humano es particularmente reconocida. En primer lugar destacamos el aporte proteico, siendo la caseína su principal proteína. La función biológica de la caseína es la de transportar el calcio y fósforo en forma de micelas, que reciben el nombre de fosfopéptidos de caseína-. Estos son complejos solubles y fácilmente absorbibles para llevar a cabo una digestión eficaz ^(1 - 4). Respecto al aporte de calcio, la leche y derivados, en los países occidentales, puede llegar a aportar entre el 60 y el 75% del total requerido para el funcionamiento adecuado del organismo ⁽⁵⁾. Así mismo, la lactosa siendo la protagonista de los hidratos de carbono de la leche, es determinante para la síntesis de cerebrósidos y de glicoproteínas; además de favorecer la absorción de calcio mediante difusión pasiva por un aumento de la permeabilidad intestinal ⁽¹⁾. Entre los compuestos lipídicos destacamos que los ácidos grasos saturados constituyen más de la mitad de la composición total de ácidos grasos de la leche, lo cual podría entenderse como un factor negativo asociado a la grasa láctea. Sin embargo, según diversos estudios el *ácido butírico* (4:0) desempeña un posible papel en la prevención del cáncer y es reconocido como modulador de la función génica. En cuanto al *ácido láurico* (12:0) se ve resaltada su posible función antiviral y antibacteriana, de hecho afirman que *Helicobacter pylori* podría ser destruida a consecuencia de éste ácido ⁽⁴⁾.

Además de lo dicho, a causa del auge en la (bio)tecnología de los alimentos con base científica, se ha visualizado un gran potencial de optimización de la funcionalidad fisiológica de la leche en el ser humano a través de los procesos (bio)tecnológicos, promoviendo cambios de algunos componentes del producto natural

y desarrollo de microorganismos con propiedades funcionales, que la pueden transformar en un producto alimenticio aún más saludable ⁽³⁾, favoreciendo así la salud de quien la consume. Entre éstos cambios destacan las ventajas de la fermentación de la leche, en la preparación de algunos lácteos frente a la absorción de lactosa y de otros nutrientes, mejorando la inmunidad y disminuyendo ciertas enfermedades infecciosas. ⁽³⁾

1.2. Fermentación de la leche.

Posiblemente, las leches fermentadas sean más antiguas en la historia de los productos lácteos que los quesos. Sin embargo, su relevancia siempre fue mínima debido a su menor disponibilidad con respecto al queso: su vida útil es más reducida y, de hecho, ha sido necesaria la expansión del frío industrial y doméstico para extender su uso a grandes sectores de la población ⁽⁸⁾.

La leche fermentada es un producto lácteo obtenido por medio de la fermentación de los carbohidratos de la leche por la adición de bacterias que son responsables no solo de la formación de ácido láctico, con la consecuente reducción del pH, con o sin coagulación (precipitación isoelectrica) ⁽¹²⁾, sino también de cambios en las proteínas (proteólisis) y los lípidos (lipólisis), que conducen al desarrollo de su sabor y textura característicos ⁽¹⁾. Los microorganismos que se utilizan con más frecuencia en la fermentación, que actualmente se añaden en los procesos de fabricación como cultivos iniciadores o *starters*, pertenecen al grupo conocido genéricamente como bacterias ácido lácticas (BAL) ⁽⁷⁾.

Existe un gran número de leches fermentadas en las distintas regiones del mundo, siendo probablemente el yogur el más conocido. Las bacterias usadas en el yogur son *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. En general, el principal género de cultivos iniciadores utilizado en la fermentación de las leches fermentadas es *Lactobacillus*. Otro tipo de bacterias muy utilizadas actualmente en la elaboración de las leches fermentadas son las del género *Bifidobacterium* que pertenece al *phylum* de las Actinobacteria ⁽⁶⁾. Son diversas las funciones saludables que se le atribuyen a este último tipo de microorganismos, entre las que cabe destacar, el establecimiento de una microbiota saludable en los infantes, la reducción del colesterol, prevención de diarreas y prevención del cáncer, entre otras, que permite clasificarlo dentro de los microorganismos probióticos⁽⁶⁾. Otros géneros de BAL de origen intestinal también probióticos pueden ser usados en la elaboración de leches fermentadas entre los que destacan ciertas cepas de los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Propionibactireum*.

El proceso de elaboración de las leches fermentadas se puede observar en la Figura 1.

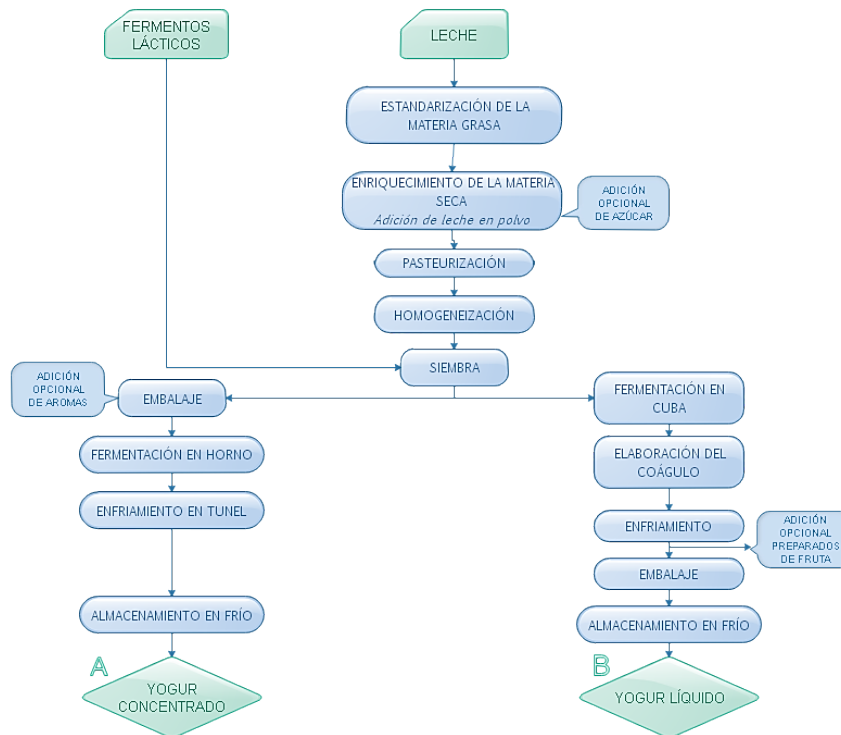


Figura 1. Diagrama de flujo de elaboración de leches fermentadas. Adaptado de *Bourlioux et al.*, (21)

Brevemente podríamos dividir el proceso de las leches fermentadas en 4 etapas:

- Estandarización de la leche (que consiste en ajustar la cantidad de materia grasa, la cantidad de sólidos totales, especialmente las proteínas), pasteurización y enfriamiento.
- Preparación y adición de los cultivos lácticos o *starters*.
- Adición de colorantes y aromas alimentarios.
- Mezclado y fermentación a 40 – 42°C durante 4 o 5 horas

Los principales cambios derivados de la fermentación láctica son los siguientes:

I. ACIDIFICACIÓN DE LA LECHE

Debido a la acción de las enzimas producidas por las BAL tiene lugar la producción de ácido láctico a partir de la lactosa. Dicho proceso, además de la formación del ácido, favorece la producción de una serie de compuestos que contribuyen al aroma y el sabor de las leches fermentadas, especialmente cuando la fermentación

es heterofermentativa. En la Tabla 1 se recogen los grupos de fermentación de las BAL teniendo en cuenta su patrón de fermentación de carbohidratos.

CLASIFICACIÓN DE BAL SEGÚN SU PATRÓN DE FERMENTACIÓN	
HOMOFERMENTATIVOS	Producen ácido láctico como producto principal de la fermentación de la glucosa, utilizando la vía de glucolisis Embden Meyerhoff Parnas ⁽⁹⁾ , siendo el género <i>Lactococcus</i> y <i>Lactobacillus</i> (homofermentativos) los más representativos de este grupo.
HETEROFERMENTATIVOS	Producen aproximadamente 50% de ácido láctico; por cada mol de glucosa y otras sustancias en cantidades más elevadas como CO ₂ , el ácido acético, etanol, CO ₂ , diacetilo y acetona ⁽¹⁰⁾ , siendo el género <i>Leuconostoc</i> el más característico de este grupo.

Tabla 1. Clasificación de las Bacterias ácido lácticas según su fermentación. Fuente: Elaboración propia.

II. PROTEÓLISIS

Las proteínas de la leche en general, y en particular la caseína por ser con mucho la más abundante, son hidrolizadas por enzimas procedentes de microorganismos proteolíticos, provocando la ruptura de las mismas originando proteínas más pequeñas y compuestos de bajo peso molecular como polipéptidos, péptidos y aminoácidos. Estos compuestos solubles en agua, junto con productos del metabolismo microbiano, como el diacetilo y el acetaldeído, son los principales responsables del aroma o flavor característico de los productos lácteos fermentados ⁽¹⁰⁾.

III. LIPÓLISIS

Este proceso se caracteriza principalmente por la hidrólisis de la materia grasa de la leche, originada por las lipasas procedentes del crecimiento de las BAL y, en su caso (derivados de leche cruda o escasamente calentada), lipasa endógena.

1.3. Principales diferencias entre el yogurt y el resto de leches fermentadas

Como hemos citado anteriormente, uno de los tipos de leches fermentadas más conocidos es el yogurt, el cual ha recibido un aumento de la popularidad en las últimas décadas ⁽¹⁰⁾ llegando a ser un producto de gran aceptación y disponibilidad (Ver figuras 3 y 4). Su proceso de elaboración permite que el producto final que llega a manos del consumidor contenga BAL vivas en cantidad mínima de 1 por 10⁷ unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro⁽¹²⁾, siendo los género *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*¹ las únicas protagonistas de la flora del yogurt ⁽¹⁰⁾. Para que el *flavor* del yogurt se desarrolle satisfactoriamente, las dos bacterias deben encontrarse en un número aproximadamente igual. Entre ellas se establece un fenómeno de mutua estimulación del crecimiento (simbiosis) ⁽⁷⁾. Además de por su inocuidad, las BAL que forman parte del yogurt se caracterizan por su tolerancia al medio ácido (resisten valores de pH incluso alrededor de 3), su capacidad fermentativa de la lactosa y otros carbohidratos (producción de ácido láctico), su capacidad aromatizante y su efecto bioconservante ⁽¹⁴⁾.

Por definición, un yogurt es una leche fermentada, pero actualmente en el mercado encontramos que una parte de los yogures son yogures pasteurizados. En estos yogures pasteurizados, a consecuencia de la aplicación de un tratamiento térmico posterior a la fermentación, las BAL han perdido su viabilidad ⁽¹²⁾.

Por otro lado, cabe resaltar la presencia en el mercado de leches fermentadas, distintas al yogurt, en las que su flora está constituida por cepas del género *Bifidobacterium spp* o *Lactobacillus casei spp*. Coloquialmente con frecuencia se llaman yogurt, pero verdaderamente este tipo de leches fermentadas no son yogures, ya que éste debe estar siempre fermentado por las BAL citadas anteriormente¹.

Entonces podemos afirmar que, a pesar de que en términos nutricionales las diferencias pueden no ser muchas, ni todas las leches fermentadas son yogures ni todos los yogures son leches fermentadas propiamente dichas, con las bacterias viables (yogures pasteurizados).

1.4. Propiedades probióticas y terapéuticas de los microorganismos estárter en la fabricación de leches fermentadas.

El renovado y progresivo interés sobre las propiedades terapéuticas de las leches fermentadas ha llevado a la incorporación de las bacterias intestinales

Bifidobacterium en los cultivos iniciadores de las mismas como agentes probióticos. Especialmente en Japón y algunos países de Europa Continental, se han desarrollado un gran número de productos lácteos fermentados a los que a causa de las bacterias utilizadas se les atribuyen propiedades beneficiosas para la salud ⁽⁸⁾. Las cepas frecuentemente utilizadas son comensales humanos que han sido manejados históricamente de forma segura en la fermentación de alimentos garantizando así su inocuidad.

Para que estos microorganismos presentes en las leches fermentadas lleven a cabo su papel y por consiguiente se avale su efectividad como producto probiótico en humanos, es preciso que mantengan la viabilidad en valores de $10^6 - 10^7$ /ml o g ^(16,17) además de cumplir los siguientes requisitos:

- a. *Resistencia* a la acidez gástrica y a las sales biliares, ya que son condiciones de estrés que forman parte de una barrera limitante para sobrevivir en este medio.
- b. *Adherencia* al *mucus* y las células epiteliales, por ser consideradas como propiedades que los probióticos deben tener para originar efectos inmunomoduladores y excluir la adhesión de patógenos.
- c. *Capacidad* para disminuir la adhesión de la flora competitiva y actividad antimicrobiana que facilite el desplazamiento de patógenos.
- d. *Habilidad* para hidrolizar las sales biliares.

En contraposición al creciente reclamo comercial por dichas propiedades probióticas, existe un cierto escepticismo sobre este tema, ya que hay evidencias de que en determinadas circunstancias el consumo de leches fermentadas pueden no presentar los efectos beneficiosos aludidos, circunstancias esas en las que intervienen diferentes mecanismos. Por ejemplo se ha observado que los efectos favorables se producen en algunos individuos y no en todo el conjunto poblacional (*Ver tabla 2*). En cualquier caso, llegar a asociar un efecto beneficioso sobre la salud con un tipo de cepa en concreto y proyectar probióticos específicos para grupos delimitados de población, demanda un conocimiento más extenso sobre su mecanismo de acción ⁽¹⁵⁾.

Los beneficios que ofrecen los probióticos, se pueden clasificar en nutricionales o terapéuticos. En la rama de lo nutricional se encuentra su papel para mejorar y/o aumentar la biodisponibilidad de ciertas vitaminas y oligoelementos, mientras que a nivel terapéutico, son adecuados para el tratamiento coadyuvante de patologías como la hipercolesterolemia, desórdenes intestinales e Inmunomodulación, entre otros.

GÉNERO	ESPECIE	CEPA	EFEECTO
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Breve</i>		Reducción de los síntomas de colon irritable
	<i>Longum</i>	BB536	Reducción de los síntomas de colon irritable
	<i>Lactis</i>	Bb12	Tratamiento de la alergia
Reducción de la diarrea por Rotavirus y de la incidencia de la diarrea del viajero			
<i>Lactobacillus</i>	<i>Acidophilus casei</i>	La5	Reducción de la diarrea asociada con antibióticos
		Shirota	Reducción de la diarrea por Rotavirus
			Inmunomodulación
	<i>Johnsonii</i>	La1	Reducción de la colonización por <i>Helicobacter pylori</i>
	<i>Plantarum</i>	299v	Reducción de los síntomas del colon irritable
			Reducción del colesterol LDL
	<i>Reuteri</i>	SD2112	Reducción de la diarrea por Rotavirus
	<i>Rhamnosus</i>	GG	Reducción de la diarrea por Rotavirus
			Inmunomodulación
Reducción de la inflamación por colon irritable			
		Tratamiento y prevención de las alergias	
<i>Salivarius</i>	UCC118	Reducción de los síntomas del colon irritable	

Tabla 2. Posibles efectos beneficiosos sobre salud de ciertos microorganismos utilizados en leches fermentadas demostrados en ensayos clínicos con humanos. Fuente: Adaptado de *Ouwehand et al., (2002)* ⁽¹⁶⁾.

1.5. Importancia y modulación de la microbiota intestinal a través de la dieta

La flora o microbiota que coloniza la mucosa del tracto gastrointestinal se compone de un complejo ecosistema constituido por más de 400 especies de bacterias, las cuales mantienen un equilibrio activo con el organismo huésped.

Puesto que la microbiota intestinal lleva a cabo una fuerte actividad metabólica que le permite establecer una relación de simbiosis con el huésped, la estrategia de introducción de bacterias seleccionadas en los alimentos (leches fermentadas) parece ser idónea tanto para modular la composición de la microbiota como para fortalecer

sus efectos metabólicos beneficiosos ^(18,19). La flora intestinal beneficiosa se encuentra representada principalmente por los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* desde el momento de la lactancia. Las funciones por las cuales cooperan de forma relevante con el estado de salud del huésped se enlistan en la Figura 2.

FUNCIÓN METABÓLICA	•Interviene en la asimilación de nutrientes de la dieta y glicanos endógenos.
FUNCIÓN PROTECTORA	•Contribuye al efecto barrera y al desplazamiento de microorganismos patógenos.
FUNCIÓN TRÓFICA	•Interviene en la inmunomodulación y proliferación celular.

Figura 2. Beneficios atribuidos a la flora intestinal representada por los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Fuente: Elaboración propia

Existen especies, citadas anteriormente (Ver tabla 2), que pueden producir posibles efectos positivos sobre la microbiota intestinal de los seres humanos tras la ingesta de leches fermentadas que las contengan, que demuestran una capacidad de adaptación y supervivencia en dichas leches y por ello éstas suelen ser las de elección para la composición de los mencionados productos. Entre todas ellas cabe destacar *B. lactis* por presentar un mejor potencial tecnológico para su incorporación en los productos lácteos fermentados. Esto es así a consecuencia de la tolerancia que posee al oxígeno y bajos valores de pH en comparación con otras especies de *Bifidobacterium* ⁽²⁰⁾.

1.6. El consumo poblacional actual y evolución de las leches fermentadas en España.

Entre la variedad de alimentos funcionales que existen en el mercado, los derivados lácteos fermentados como el yogur y otras leches fermentadas ocupan un sector mayoritario, además de por ser protagonistas habituales de la dieta, por su excepcional aceptación social basada en su clásica reputación como alimentos saludables y en sus magníficas características sensoriales. Todo ello unido a su riqueza nutricional transforma a estos productos en componentes ideales de una alimentación “aparentemente funcional”. El crecimiento de la popularidad de los productos lácteos fermentados en el mercado ha llevado al Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente a realizar encuestas elaboradas a partir del consumo de yogur y otras leches fermentadas ⁽²³⁾. El consumo nacional de las leches

fermentadas en cuanto a volumen y accesibilidad se ven reflejados en las Figuras 3 y 4.

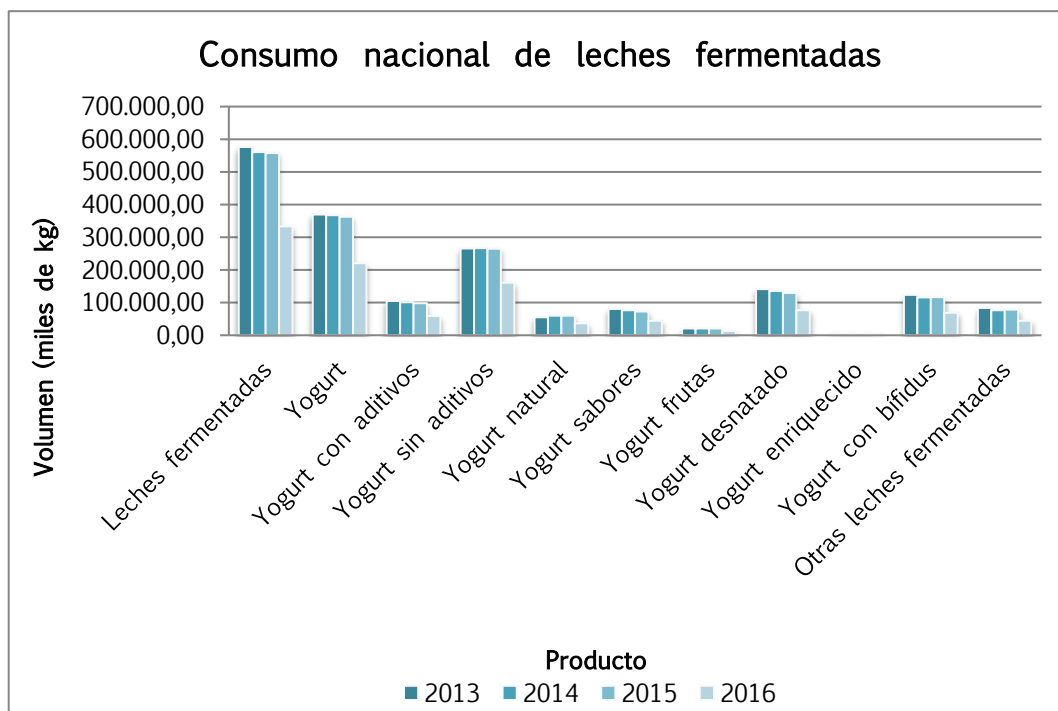


Figura 3. Consumo nacional de leches fermentadas en intervalo anual de 2013/2016 (volumen consumido en miles de kg). Fuente: Elaboración propia

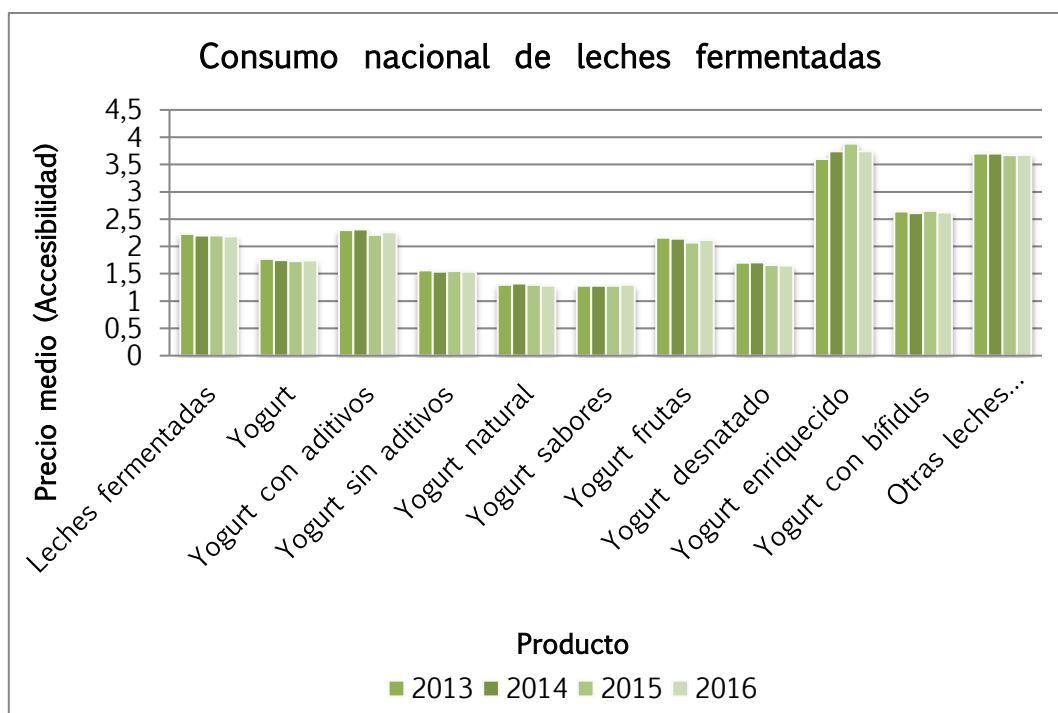


Figura 4. Accesibilidad para el consumo nacional de leches fermentadas en intervalo anual de 2013/2016 (precio medio en €)

1.7. Citometría de flujo para detectar bacterias en alimentos.

Un citómetro de flujo está constituido por tres sistemas principales:

- i. El sistema de fluidos, el cual transporta las células en suspensión al punto de análisis (intersección con el haz de luz).
- ii. El sistema óptico, que comprende una o más fuentes de luz dotadas de lentes de enfoque para iluminar las células, además de un sistema de lentes y filtros ópticos que recogen, separan y seleccionan la luz de longitudes de onda específicas que emerge de las células y la conducen a los foto-detectores.
- iii. El sistema electrónico de procesamiento de señales, que transforma las señales ópticas en pulsos eléctricos proporcionales a la intensidad de estas y, estos a su vez, en datos digitales.

Cuando una célula alcanza el punto de análisis, dispersa luz en todas las direcciones, pero el citómetro solamente registra la luz que se dispersa originando dos ángulos específicos respecto a la fuente de iluminación y emite fluorescencia en diferentes colores (verde, amarillo, rojo...). Estos parámetros son utilizados para obtener información sobre las características morfológicas de las células estudiadas ⁽²⁶⁾ tal y como se explica a continuación:

- a. Luz dispersa en ángulo lateral o *side scatter channel* (SSC): Referido a la luz dispersada con un ángulo de unos 90° , se encuentra relacionada con el tamaño celular.
- b. Luz dispersa en ángulo recto o *forward scatter channel* (FSC): Referido a la luz dispersada con un ángulo de unos $0,5^\circ$, se corresponde con las características morfológicas de la superficie celular así como el material granular del citoplasma ⁽²⁴⁾.

Por tanto, que se detecte una dispersión de luz SSC – FSC y que se emita una fluorescencia se traduce como “un evento”. El número de eventos por microlitros de muestra nos indica el recuento celular y a su vez, la diferenciación de las mismas en dos categorías mediante los parámetros de fluorescencia; unidades de fluorescencia activa y unidades de fluorescencia no – activa ⁽²⁵⁾. En la Figura 5 podemos observar de manera ilustrada el mecanismo de funcionamiento del citómetro de flujo.

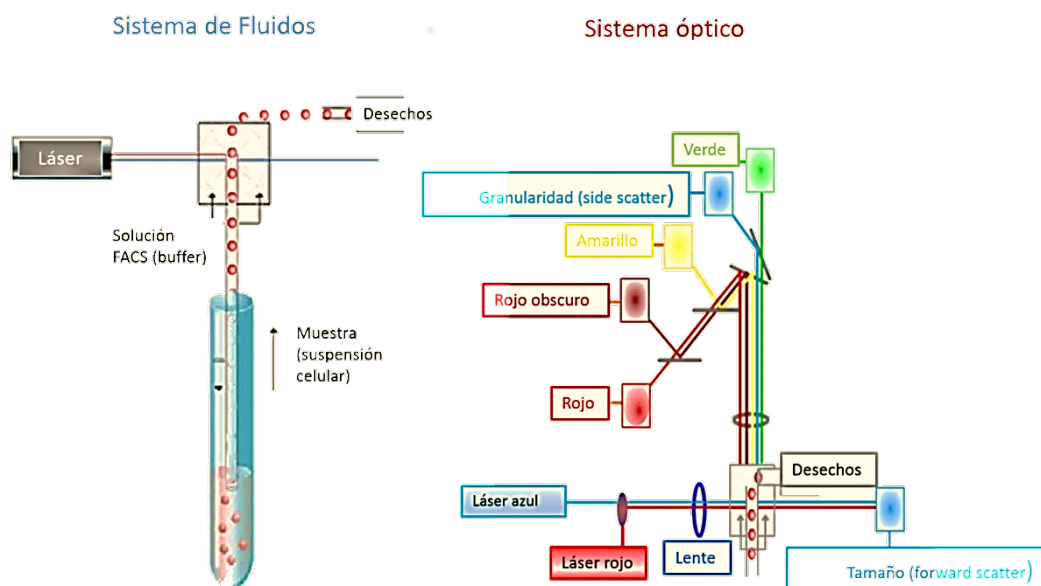


Figura 5. Ilustración de dos de los sistemas principales que constituyen un citómetro de flujo; Sistema de fluidos y sistema óptico. Fuente: Unidad de Citometría de flujo de la RAI (Red de apoyo a la investigación) ⁽³¹⁾.

Existe una gran variedad de colorantes fluorescentes o fluorocromos que, por sus características químicas, permiten evaluar el estado fisiológico de las bacterias más allá de su capacidad para crecer en un medio de cultivo ⁽²⁷⁾. Estos fluorocromos son, entre otros, el SYTO 9[®] y el yoduro de propidio (PI). El PI, debido a su carácter hidrófilico y elevado peso molecular, únicamente entra en las células con membrana porosa y, una vez en su interior, se une a los ácidos nucleicos, provocando la emisión de fluorescencia roja. Las células teñidas con este colorante son consideradas células muertas. Además de las células con la membrana dañada, para detectar las que tienen la membrana intacta, se combina el PI con otro fluorocromo que es el SYTO 9[®]. Su unión con los ácidos nucleicos da lugar a la emisión de fluorescencia verde ⁽²⁸⁾. Cuando el PI se enlaza con el SYTO 9[®], las células con la membrana intacta emiten fluorescencia verde, sin embargo, aquellas que su membrana se encuentra dañada emiten fluorescencia roja, perdiendo así la fluorescencia verde primaria. Este hecho se debe a que el PI tiene una mayor afinidad por los ácidos nucleicos que el SYTO 9[®], desplazándolos de su unión ⁽³⁰⁾.

Tras recoger los valores de los parámetros de fluorescencia y dispersión de luz para cada célula detectada, se analizan dichos datos a través de programas informáticos especializados con el fin de ser representados en gráficas con dos variables. Esto permite combinar los parámetros mencionados anteriormente de forma simultánea para un conjunto de células según sea necesario ⁽²⁴⁾. Para eliminar las

señales de fondo de análisis, el programa informático ofrece la posibilidad de dibujar una o varias regiones alrededor de la población celular objeto de estudio, de tal forma que solo éstas sean consideradas en el cálculo de recuentos, porcentajes o valores promedio de intensidad de fluorescencia ⁽²⁴⁾. La representación gráfica de los datos se ve reflejada en la Figura 6.

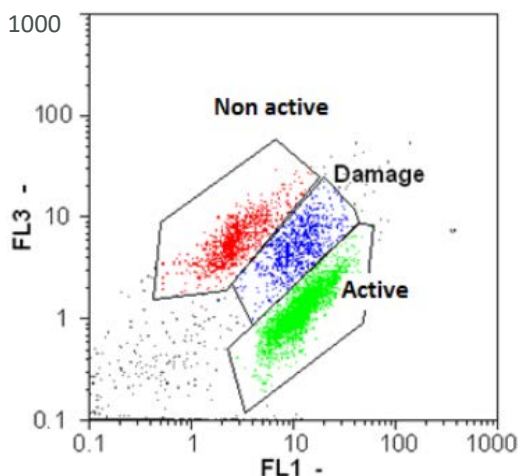


Figura 6. Ejemplo de CMF (*Lactobacillus casei* subp *paracasei*) en gráfica de puntos con fluorescencia verde (FL1) vs. Fluorescencia roja (FL3). Fuente: Protocolo B ISO/TC 34/SC 5 ⁽²⁵⁾.

1.8. Justificación del trabajo.

Actualmente las leches fermentadas tienen una importante presencia en el mercado minorista y son percibidas por los consumidores como alimentos beneficiosos para la salud. Sin embargo, existe un escaso conocimiento sobre su composición nutricional más allá de lo declarado en el etiquetado nutricional. El conocimiento más exhaustivo de la composición de esos productos permitirá valorar mejor su calidad nutricional más allá de sus proclamadas cualidades funcionales, como el efecto probiótico, la reducción del colesterol o prevención de la osteoporosis. Así mismo, el estudio y conocimiento de estos productos pueden aclarar atribuciones nutricionales equivocadas por parte de los consumidores.

Aunque existen diversos estudios que relacionan el consumo de productos lácteos fermentados con efectos beneficiosos frente a diferentes patologías inflamatorias intestinales como diarreas, intolerancia a la lactosa, enfermedades inflamatorias intestinales e incluso un papel protector frente al cáncer, los aspectos nutricionales o de calidad de las leches fermentadas no han sido muy estudiados. En

este sentido el presente trabajo de investigación pretende ampliar el conocimiento de las leches fermentadas, a partir de parámetros físico-químicos y microbiológicos.

2. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

El objetivo principal del trabajo ha sido contribuir a la caracterización físico-química y microbiológica de algunas leches fermentadas del mercado denominadas terapéuticas, más allá de lo declarado en el etiquetado nutricional.

Para circunscribir el objetivo general nos hemos apoyado en los siguientes objetivos específicos:

- a. Ganar conocimiento sobre la contribución nutricional de las leches fermentadas.
- b. Buscar evidencias que justifiquen los posibles efectos beneficiosos de las leches fermentadas en el organismo.
- c. Determinar la cantidad de microorganismos viables presentes en las leches fermentadas estudiadas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Muestras.

Se utilizaron cuatro tipos de leches fermentadas comerciales que fueron seleccionadas por ser productos que contienen microorganismos probióticos frecuentes en los lineales de los supermercados de la zona. Las muestras se obtuvieron de un supermercado de la Comunidad de Castilla y León durante el mes de marzo de 2017. Se compraron varios envases de forma que todos los envases del mismo tipo contenían el mismo número de lote. Seguidamente fueron almacenadas en refrigeración hasta su análisis. Las leches fermentadas analizadas fueron: Actimel[®], Densia Forte[®], Danacol[®] Kaiku-Benecol[®]. A lo largo del siguiente trabajo las leches fermentadas citadas anteriormente serán nombradas como: Leche 1, Leche 2, Leche 3, Leche 4, respectivamente.

3.2. Parámetros físico - químicos.

3.2.1. Composición nutricional de las leches fermentadas.

Determinación de humedad

Para la determinación del extracto seco se empleó una estufa con circulación forzada de aire, cápsulas de aluminio y arena de mar, necesaria para evitar la

formación de una costra superficial que pueda dificultar la evaporación de agua en el alimento (AOAC, 1990). Para realizar las pesadas se utilizó una balanza analítica con precisión de $\pm 0,1$ mg. Las cápsulas se secaron en estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ con 30 g de arena de mar calcinado y una varilla de aluminio durante 2h. Tras este tiempo se enfriaron en un desecador con gel de sílice hasta temperatura ambiente y se realizó la pesada (cápsula, arena y varilla) en balanza analítica. Se colocó en las capsulas con la arena y varilla de aluminio 10 g de muestra y se mezcló la muestra con la arena. Seguidamente las cápsulas fueron introducidas en la estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantuvieron durante 4h. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar las cápsulas en el desecador hasta alcanzar temperatura ambiente. Finalmente se procedió a realizar las pesadas de forma repetida hasta que dos de ellas fueron constantes de forma consecutiva. Finalmente se realizaron los cálculos correspondientes en el programa Excel (*versión 2010*).

$$\text{Humedad} = \frac{(p. \text{ cápsula} + \text{ arena} + \text{ espátula tras 4h}) - (p. \text{ cápsula} + \text{ arena} + \text{ espátula} + \text{ muestra})}{(p. \text{ cápsula} + \text{ arena} + \text{ espátula}) - (p. \text{ cápsula} + \text{ arena} + \text{ espátula} + \text{ muestra})} \cdot (100)$$

Determinación de cenizas

Para llevar a cabo la determinación de la materia inorgánica presente en las muestras se siguió el método de análisis de AOAC (1990) y como se describe brevemente. Se pesaron 5 g de muestra de cada una de la muestra homogeneizada ($\pm 0,1$ mg precisión) en un crisol. Las muestras fueron introducidas a la mufla a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2h, posteriormente se incrementó la temperatura 200°C 1h y finalmente se incrementó la temperatura a $545\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta completar 4h , con el fin de obtener cenizas blancas o grisáceas. Cuando el color de las cenizas fue oscuro se añadió 1 ml de agua milliQ a cada crisol con la muestra correspondiente y fueron sometidas de nuevo a incineración 1,5h a $545\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tras ser enfriadas en un desecador finalmente fueron pesadas (precisión $\pm 0,01$ mg). Finalmente se realizaron los cálculos correspondientes en el programa Excel (*versión 2010*).

$$\text{Cenizas} = \frac{\text{peso crisol cenizas} - \text{peso crisol vacío}}{\text{peso crisol con muestra} - \text{peso crisol vacío}} \cdot (100)$$

Determinación de materia grasa

La materia grasa se determinó con el ácido butirómetro Gerber, siguiendo indicaciones de *Kleyn et al., (2001)* y como se describe brevemente. Con ayuda de un butirómetro se agregaron 10 ml de ácido sulfúrico con una densidad 1,822,

seguidamente se agregaron 11 ml de la leche fermentada a ensayar y por último 1 ml de alcohol isoamílico densidad 0,811 g/ml. Posteriormente los butirómetros fueron agitados y centrifugados en una centrifuga Gerber durante 1200 r.p.m. durante 4 minutos. A continuación los butirómetros fueron puestos en un baño de agua caliente a 65°C durante 10 min. Finalmente, tras 3 – 4 min se realizó la lectura de la graduación ocupada por la grasa.

Determinación de nitrógeno total

La determinación de la proteína bruta se realizó cuantificando el nitrógeno total presente en la muestra mediante el método Kjeldahl según el procedimiento AOAC (1990). La cantidad de nitrógeno obtenido se transformó en contenido proteico haciendo el uso del factor de conversión 6,23. Dicho método consta de dos fases: digestión y destilación. Para la fase de digestión se pesó, por duplicado, 1,00 g de la muestra con una precisión de dos decimales y se añadió a un tubo de digestión Kjeldahl junto con una pastilla de catalizador comercial Kjeldahl S 3,5 (compuesta por 3,5 g de sulfato potásico y 3,5 mg de selenio). Se trasladaron los tubos con las muestras a la campana extractora, donde se añadieron 10 ml de ácido sulfúrico concentrado (98%) y se colocaron en el bloque calefactor del digestor (Digester Tecator; Foss Iberia, Barcelona, España). Los tubos se mantuvieron en el digestor a temperatura de 350 °C durante aproximadamente una hora y media, hasta obtener una solución final prácticamente transparente, indicando que toda la materia orgánica se hubiera digerido y consecuentemente el nitrógeno orgánico total de la muestra se hubiese transformado en sulfato de amonio. Una vez hecho esto se procedió a la destilación de la mezcla digerida. Para ello, se añadió a cada tubo 50 ml de agua destilada. Por otro lado, se añadieron 25 ml de una solución acuosa de ácido bórico al 4% que, además, contenía por cada litro 10 ml de verde bromocresol y 7 ml de rojo de metilo, ambos al 1%, a matraces Erlenmeyer (uno por muestra). Acto seguido, se colocaron y ajustaron tanto el tubo de digestión Kjeldahl, como el matraz Erlenmeyer, en la unidad de destilación Tecator modelo Kjeltec System 1002 (Foss Iberica). Se le añadió al tubo de digestión Kjeldahl una solución alcalina (NaOH al 40%, aproximadamente 50 ml) para neutralizar la muestra y se procedió a la destilación por arrastre de vapor hasta que fueran recogidos en el matraz Erlenmeyer 200 ml de destilado. Finalmente, se realizó la valoración del destilado con una disolución de ácido clorhídrico 0,1 M, solución normalizada, hasta que se produjera un viraje de color de verde-azulado a una tonalidad azul-grisácea, apuntando el volumen gastado

en la valoración (ml). El porcentaje de nitrógeno total de la muestra se obtuvo según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de nitrógeno} = \frac{V \cdot N \cdot 0.14}{P} * 100$$

Siendo:

V = ml de HCl 0,1 M gastados

P = Peso de la muestra

N= normalidad

Nota: El volumen de HCl utilizado para valorar el blanco fue 0 por lo que no se incluye en la fórmula.

Determinación de ácidos orgánicos (ácidos láctico y acético)

El contenido en ácidos orgánicos se determinó de acuerdo al método descrito por *Bruna y col.*, (2003) con ciertas modificaciones. Para la extracción, por duplicado, se pesaron 10 g de muestra con una precisión de $\pm 0,01$ mg, se adicionó 50 ml de ácido sulfúrico (*Sigma*) 4,5 mM y se homogeneizó con un homogeneizador Ultraturax durante 1 min, trasvasándose el homogeneizado a un matraz y dejándolo enfriar en cámara fría a 5 °C. A continuación se obtuvo el filtrado utilizando papel de filtro (*Whatman 54*). Previamente a la inyección en el cromatógrafo, la solución obtenida fue filtrada a través de un filtro de 0,45 μm de diámetro de poro (*Millipore*) y se inyectaron 10 μl para la identificación de ácidos orgánicos, utilizando una fase móvil de ácido sulfúrico 3 mM y con las siguientes condiciones: velocidad de flujo: 0,5 ml/min durante los primeros 30 min, posteriormente, se aumentó el flujo hasta 0,8 ml/min durante 10 min hasta completar los 40 min, seguidamente se redujo el flujo hasta 0,5 ml/min durante los últimos 5 min. La separación de los ácidos orgánicos se llevó a cabo en una columna Aminex catión-exchange HPX-87H (300 x 7.8 mm), a una temperatura de 65 °C durante 45 min. El detector empleado fue un "Diode Array" (Marca: *Waters* modelo 996) a una longitud de onda de 210 nm. Para la identificación de ácidos orgánicos se inyectaron patrones de ácido láctico y ácido acético y se compararon los tiempos de retención obtenidos de los patrones con los tiempos de los picos de las muestras. A su vez se comparó el espectro obtenido para cada pico patrón frente al respectivo espectro del pico problema para confirmar la pureza de los compuestos. Por último, para la cuantificación de los ácidos orgánicos se realizó una

curva de calibración para cada ácido identificado con cantidades crecientes del mismo (Ver figura 7 A y B), ajustando los valores con una regresión lineal, e interpolando el valor del área obtenida para cada ácido identificado en la curva patrón respectiva para obtener la concentración final de dicho ácido. El contenido en los diferentes ácidos orgánicos se expresaron en mg/100g de producto.

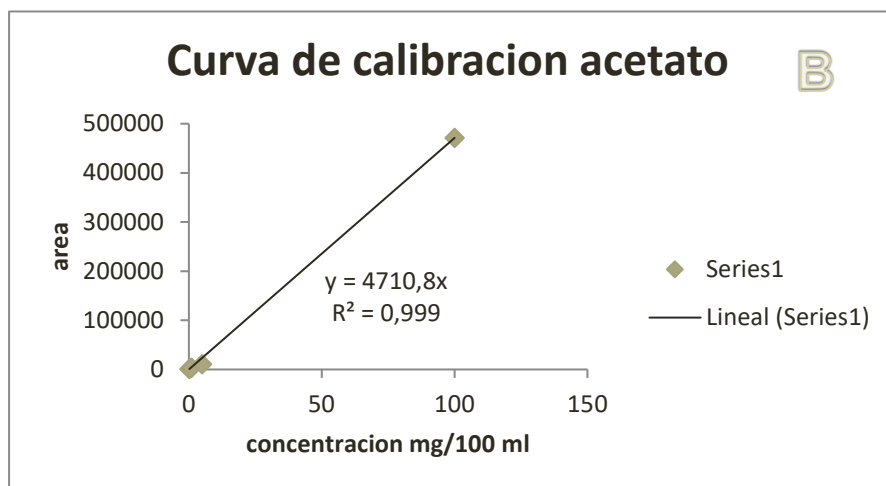
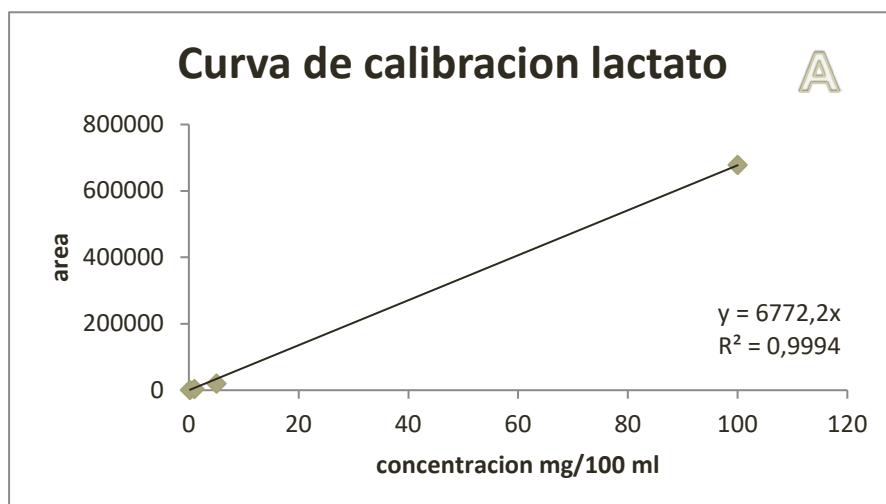


Figura 7. (A) Curva de calibración del ácido láctico con valores ajustados mediante regresión lineal e interpolando el valor del área obtenida para el ácido láctico. (B) Curva de calibración del ácido acético con valores ajustados mediante regresión lineal e interpolando el valor del área obtenida para el ácido acético.

Determinación de elementos minerales

El contenido en elementos minerales fósforo, magnesio y calcio se realizó a partir de la muestra digerida por vía húmeda con ácido nítrico concentrado (*Sigma*), siguiendo básicamente el método 986.09 propuesto por la AOAC (AOAC, 1999c) y siguiendo las recomendaciones de *Navarro et al.*, (2011) con las siguientes modificaciones, 1g de muestra homogeneizada, con una precisión de $\pm 0,1$ mg se mezcló con 5 ml de ácido nítrico concentrado, la mezcla se calentó durante 30 min a 60°C y a continuación se incrementó la 120°C durante 60 min. Después de la digestión, las muestras se diluyeron con agua desionizada hasta un volumen final de 25 ml. Finalmente, los minerales se analizaron, mediante espectrofotometría de emisión atómica acoplada inductivamente (ICP – AES), utilizando un espectrofotómetro (Perkin Elmer modelo 1000 *Emission Spectrometry*). Los análisis de cada muestra se llevaron a cabo por duplicado.

Determinación de pH

El pH fue valorado por inmersión del electrodo del pHmetro directamente en las muestras de leches fermentadas siguiendo las indicaciones de AOAC (2012). El análisis se realizó por triplicado para cada tipo de muestra.

Determinación de acidez titulable

La determinación de acidez se llevó a cabo mediante la adición de 20 ml de agua milliQ a 10 ml de muestra, que fue valorado con NaOH 0,1N, previa a la titulación se enrasó la bureta con NaOH antes mencionado y se anotó el gasto de la misma hasta su punto de viraje (8,1). Éste análisis se realizó por triplicado para cada tipo de muestra.

Determinación de nitrógeno amínico o aminoacídico

La determinación del nitrógeno aminoacídico se llevó a cabo por el método de la nihidrina, según la técnica de *Moore y Stein* (1948).

- a. El reactivo de nihidrina: 2 g de nihidrina y 0,3 g de hidridantina en 75 ml de etilenglicol monometil éter de peróxidos; una vez disuelta la mezcla se añaden 25 ml de tampón acético/acetato 4M a pH 5,5.
- b. Propanol al 50% (v/v)

c. Leucina para preparar la recta patrón 1000 mg/l

Para la obtención de la curva patrón (Ver Figura 8) se prepararon varias disoluciones acuosas de leucina de concentraciones comprendidas entre 1 y 10 mg/l. Se llevaron 0,5 ml de cada disolución a los correspondientes tubos de ensayo y se añadieron a cada uno, 1,5 ml de reactivo de la nihidrina, se agitaron y se enfriaron con agua corriente y se adicionaron 8 ml de propanol a cada tubo, se agitaron y después de 10 min se leyeron las absorbancias a 570 nm frente a un blanco sin leucina. Con estos datos se obtuvo la ecuación de la recta patrón.

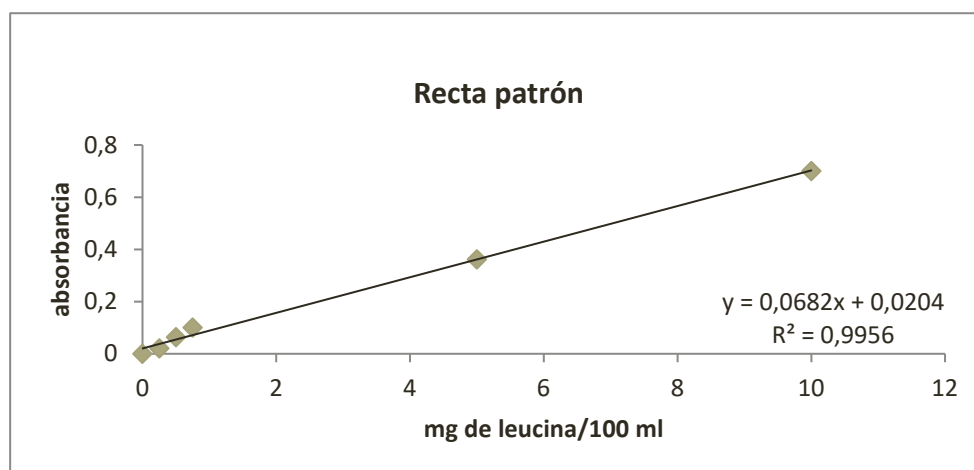


Figura 8. Recta patrón para la determinación de nitrógeno aminoacídico.

Y: Valores de absorbancia

X: Valores de concentración

Para las muestras se siguieron los mismos pasos dados en la preparación de los patrones, solo que en vez de disoluciones de leucina se añadieron disoluciones de los extractos perclóricos obtenidos según se describe anteriormente que tras la descongelación debieron ser diluidas en agua 10 veces.

3.3. Parámetros microbiológicos.

3.3.1. Recuento de microorganismos.

El estudio microbiológico de cultivos lácteos se llevó a cabo por dos métodos diferentes pero simultáneos. En primer lugar, se realizó el recuento de microorganismos viables en placa de las leches fermentadas siguiendo el método de la *International Dairy Federation (IDF)* número 149A, (1997). Con algunas modificaciones, los recuentos se llevaron a cabo en *Agar Man Rogosa Sharpe (MRS)* y las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 en aerobiosis. En segundo lugar, se realizó el recuento directo de microorganismos totales por citometría de flujo

mediante el citómetro analítico *Beckman Coulter (Serie Gallios)*. Siguiendo el *Protocolo B del método ISO/TC 34 (2013)*. Con algunas modificaciones, se utilizó el kit de viabilidad bacteriana *LIVE/DEAD BacLight* que nos permite diferenciar entre bacterias vivas y muertas basándose en la integridad de la membrana plasmática de las bacterias objeto de estudio. El kit está compuesto por dos colorantes fluorescentes afines a los ácidos nucleicos: SYTO 9® y yoduro de propidium (PI). El SYTO 9 tiñe las células de color verde y el PI penetra en las células con su membrana dañada, tiñéndolas de color rojo ⁽²⁵⁾. Se añadió 1µl de PI a cada muestra y fueron incubadas a 37°C durante 15 min en aerobiosis. Seguidamente se añadió 1µl de SYTO 9® y se realizó el mismo procedimiento. Finalmente los resultados fueron analizados con el software *Kaluza (Versión CXP 2.2)*. Una vez obtenidos los eventos, el cálculo del número de éstos se realizó de la siguiente forma y los resultados se dieron en log AFU/g para cada muestra;

$$AFU/ml = \left(\frac{\text{Numero de eventos de fluorescencia activa} \times \text{Velocidad de flujo}}{\text{Volumen o peso de la muestra}} \right) \times \text{Factor de dilución}$$

3.3.2. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos fueron introducidos de forma manual en el programa Excel (*versión 2010*) en el que se determinó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada uno de los parámetros estudiados. Además, en caso de estimarse conveniente establecer diferencias entre tipos de leches fermentadas se llevó a cabo el cálculo del estadístico de *la t-student*, realizado en el mismo programa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 3 se encuentra recogida la composición nutricional (componentes mayoritarios) de las leches fermentadas estudiadas en este trabajo. Como se puede observar, el contenido de agua (humedad) de las leches fermentadas comerciales se situó ente 85,03 hasta 90,09 g/100 g de muestra fresca. Estos valores se encuentran dentro del rango descritos por *Bourlioux et al., (2011)*, quienes indican que valores de humedad en las leches fermentadas comerciales en Francia oscilaba entre el 80 y el 90% ⁽²¹⁾. Este alto contenido de agua presente en estos productos lácteos ayuda a la hidratación del organismo.

El contenido de cenizas, osciló entre 0,595 y 1,750 g/100 g de muestra fresca, cuyo valor promedio e intervalo de confianza ($\alpha=0.05$) para todas las muestras estudiadas fue de $0,920 \pm 0,886$, respectivamente. Podemos observar que el contenido fue similar para todas las leches fermentadas excepto para la Leche 3, que mostró un contenido de cenizas significativamente superior ($p<0.05$ *t-student*) con respecto a las otras leches fermentadas estudiadas. El contenido de cenizas de las leches fermentadas permite estimar la cantidad de compuestos inorgánicos presentes en las misma y por lo tanto también conocer el aporte de minerales de las leches fermentada a la dieta.

El contenido de materia grasa de las leches fermentadas analizadas osciló entre $<0,1$ y $4,35\%$ (p/v). Este contenido es ligeramente comparable al de los valores indicados por *Bourlioux et al.*, (2011) quiénes muestran valores entre $0,1$ a $4,0\%$ (p/v)⁽²¹⁾. Además, como podemos ver en la Tabla 3, el valor de materia grasa fue superior para la Leche 3 y la Leche 4 respecto al resto de las leches fermentadas. Esta diferencia, puede ser debida a la adición de aceites con fitoesteroles a este tipo de productos lácteos durante su elaboración. Aunque se requieren más estudios para conocer el perfil lipídico de la materia grasa presente en las leches denominadas anticolesterol, es posible que esa materia grasa provenga de aceites con fitoesteroles bioactivos como: los β -sitoesteroles, campesterol y stigmasterol que son los más utilizados en la elaboración de alimentos funcionales⁽¹⁵⁾. Recientemente se han publicado algunos estudios que indican que el consumo de alimentos (o matrices) enriquecidos con fitoesteroles disminuye la absorción intestinal de colesterol⁽³³⁾. Además, la *European Food Safety Agency (EFSA, 2009)*, aconseja el consumo de fitoestoreles a razón de $1,6$ g al día para la reducción del LDL- colesterol.

El contenido de proteínas fue muy similar para todas las leches estudiadas, mostrando un valor promedio de $2,84$ (g/100g) y con un intervalo de confianza de $\pm 0,23$ ($\alpha=0,05$). Estos valores son inferiores a los encontrado por *Bourlioux et al.* (2011) para la leches fermentadas quiénes encontraron valor entre $3,5$ a $4,5\%$ (p/p) e inferiores al contenido de proteínas de la leche ($3,3$ g/100g)⁽²¹⁾. Estas diferencias pueden ser debidas a que en este trabajo se estudiaron leches fermentadas líquidas y en el trabajo de los autores antes mencionados fueron leches fermentadas de textura similar al yogur, con más concentración de sólidos. Las proteínas presentes en las leches fermentadas son principalmente caseína y proteínas de suero. Estas proteínas son fácilmente digeribles y presentan un buen equilibrio en aminoácidos esenciales. Por lo tanto, las leches fermentadas son una adecuada fuente de proteínas, especialmente para población infantil y anciana, debido a que son fáciles de ingerir.

Finalmente, pueden ejercer un efecto sobre la saciedad por la posible presencia de biopéptidos activos que pueden producirse en el momento de la fermentación ⁽³⁴⁾.

El contenido de hidratos de carbono en la leches fermentadas estuvo entre 3,90 y 8,02 % (g/100g). Aunque estos han sido calculados por diferencia respecto a los otros componentes. Los valores se encuentran dentro de los valores indicados por *Bourlioux et al.*, (2011) para las leches fermentadas estudiadas (5,5 y 13% p/p) excepto para la Leche 3, que presentó los valores más bajos ⁽²¹⁾.

El contenido nutricional declarado en la etiqueta se recoge en la Tabla 4. En términos generales y con cierto margen de tolerancia se encuentra concordancia entre los valores encontrados en este trabajo y los declarados en cuanto a grasa y proteína. Cabe destacar no obstante, el mayor contenido en grasa encontrado en la Leche 1 que el declarado (4,25% vs 2,2)

Tabla 3. Composición nutricional de leches fermentadas (g/100g*).
Datos experimentales.

TIPO DE MUESTRA		HUMEDAD	CENIZAS	MATERIA GRASA	PROTEÍNAS	HIDRATOS DE CARBONO
ANTICOLESTEROL	LECHE 1	85,0 ± 0,22	0,595 ± 0,004	4,25 ± 0,35	2,67 ± 0,01	7,40
	LECHE 2	90,1 ± 1,55	0,698 ± 0,005	2,35 ± 0,07	2,97 ± 0,03	3,90
OTRAS LECHE FERMENTADAS	LECHE 3	85,5 ± 0,10	1,750 ± 0,020	<0,01**	2,95 ± 0,02	8,02
	LECHE 4	89,7 ± 0,41	0,640 ± 0,006	0,35 ± 0,07	2,77 ± 0,14	6,52
TOTAL (MEDIA ± IC)		87,6 ± 4,20	0,920 ± 0,886	ND**	2,84 ± 0,23	ND

*los valores de las tablas están expresados en g/100 g de leche fermentada

**ND: no determinado por haber un valor menor a <0,01% que es el límite del método

IC: intervalo de confianza ($\alpha=0.05$)

Tabla 4. Composición nutricional de leches fermentadas (g/100g*).
Datos obtenidos a partir de la etiqueta.

TIPO DE MUESTRA		MATERIA GRASA	PROTEÍNAS	HIDRATOS DE CARBONO	CALCIO **	MAGNESIO **	FÓSFORO
ANTICOLESTEROL	LECHE 1	2,2	2,6	5,2	NI	NI	NI
	LECHE 2	1,1	3,2	4,3	NI	NI	NI
OTRAS LECHE FERMENTADAS	LECHE 3	0,4	3,2	7,9	500	NI	NI
	LECHE 4	1,6	3,0	10,8	120	NI	NI

*Los valores de las tablas están expresados en g/100 g de leche fermentada

**Los valores de los minerales (Calcio, Magnesio y Fósforo) están expresados en mg/100g de leche fermentada

***NI: valor no indicado en el etiquetado nutricional.

El contenido de minerales de las leches fermentadas analizadas en este trabajo se encuentra recogido en la Tabla 5. Entre los tres minerales analizados el contenido de calcio fue el mayoritario, seguido del fósforo y del magnesio. El valor promedio de calcio para todas las leches fermentadas fue de $171 \pm 9,10$ mg/100g. Éste es similar al encontrado por *Navarro et al.* (2011), quienes encontraron 194 mg/100g en leches fermentadas comerciales y ligeramente superior a encontrada por *Bourlioux et al.*, (2011) quienes mencionan valores de 136 mg/100g ^(35,21). La diferencia observada puede deberse al tipo de leche fermentada estudiada en este trabajo con respecto a las estudiadas por los autores antes mencionados. En este estudio las leches mostraron un contenido similar de calcio entre ellas, a excepción de la Leche 2 cuyo contenido alcanzó hasta 400 mg/100 g. Así mismo esta leche fermentada, fue la que mostró mayor contenido de cenizas 1.465 g/100g (*Ver tabla 3*). El contenido promedio del fósforo fue de $57,62 \pm 1,87$ mg/100g. El análisis de este mineral fue similar para todas las leches fermentadas. Finalmente, el contenido medio de magnesio fue de $8,9 \pm 0,05$ mg/100g. Este contenido fue inferior al encontrado por *Navarro et al.*, (2011), quienes encontraron 15 mg/100g ⁽³⁵⁾. Por lo tanto, la mayor cantidad de cenizas de la leche 3 se puede atribuir principalmente a elevados niveles de Ca sin que los otros minerales estudiados (P y Mg) suban con respecto a las otras leches fermentadas.

La relación calcio/fósforo de las leches fermentadas es aproximadamente de 1.4. Las recomendaciones de ingestión de P y Ca son similares en diferentes grupos poblacionales, aunque la relación 1:1 de P: Ca es la más adecuada ⁽⁴²⁾. Sin embargo, se ha demostrado que si la ingestión de Ca es adecuada, una relación precisa entre P y Ca no es importante ya que el P ingerido generalmente es suficiente. En este trabajo

se encontró una relación P: Ca de 1:7, posiblemente en personas sanas esta relación no descompensaría el balance P: Ca, pero en niños o persona mayores podría ocasionar un desbalance. Respecto al magnesio, es el segundo catión intracelular en el organismo y su importancia es bien conocida, es cofactor de más de 300 reacciones enzimáticas y es esencial para el metabolismo de varios minerales. Como podemos ver en los resultados la cantidad de éste catión en las leches fermentadas enriquecidas con calcio es ligeramente superior al resto de las leches fermentadas estudiadas, esta estrategia de maximizar la ingesta de Ca podría tener efectos adversos, especialmente en personas mayores en el metabolismo de otros micronutrientes como el Mg, que al igual que el Ca, está asociado a la mineralización de hueso ⁽⁴¹⁾.

Tabla 5. Niveles de P, Ca y Mg en leches fermentadas.

TIPO DE MUESTRA		CALCIO	FÓSFORO	MAGNESIO
		mg/100g		
ANTICOLESTEROL	LECHE 1	80 ± 1,01	54 ± 2,32	7,9 ± 1,06
	LECHE 2	80 ± 1,33	58 ± 0,27	8.5 ± 0,03
OTRAS LECHE FERMENTADAS	LECHE 3	447 ± 21,26	62 ± 2,11	9,6 ± 0,02
	LECHE 4	77 ± 2,63	55 ± 4,59	7,6 ± 0,40
TOTAL (MEDIA ± DES)		171 ± 9,10	57,62 ± 1,87	8,9 ± 0,50

Los valores de pH, acidez total, ácido láctico y ácido acético se encuentran recogidos en la Tabla 6. El valor de pH fue similar para todas las leches fermentadas y se situó en torno a 4. El valor de acidez total, determinado por volumetría, oscilo entre 0,47 a 0,64 (g de ácido en 100 g de muestra). El perfil de los ácidos orgánicos obtenido por HPLC de las leches fermentadas, a modo de ejemplo puede observarse en la Figura 9 y 10. Aunque, las leches fermentadas muestran diversos tipos de ácidos orgánicos, en este trabajo se cuantificó únicamente los ácidos láctico y acético. Los valores obtenidos de ácido láctico y acéticos se situaron entre 0,39 y 0,69 (g/100g) y 0,002 a 0,007 (g/100g), respectivamente. Sorprende que los valores de acidez total de la leches anticolesterol sean inferiores a las del ácido láctico, ácido por otra parte mayoritario.

Tabla 6. Valores de pH, acidez total (g de ácido láctico/100 g) y niveles de ácido láctico y acético en leches fermentadas (g de ácido/100 g).

TIPO DE MUESTRA		pH	ACIDEZ TOTAL *	ÁCIDO LÁCTICO**	ÁCIDO ACÉTICO**
ANTICOLESTEROL	LECHE 1	4,01 ± 0,02	0,51 ± 0,01	0,69 ± 0,01	0,007 ± 0,0001
	LECHE 2	4,13 ± 0,03	0,47 ± 0,04	0,61 ± 0,11	0,007 ± 0,0001
OTRAS LECHES FERMENTADAS	LECHE 3	4,17 ± 0,03	0,56 ± 0,02	0,39 ± 0,08	0,004 ± 0,0021
	LECHE 4	4,04 ± 0,02	0,64 ± 0,08	0,44 ± 0,01	0,002 ± 0,0004

*Determinación por valoración ácido – base con NaOH

**Obtenido por HPLC

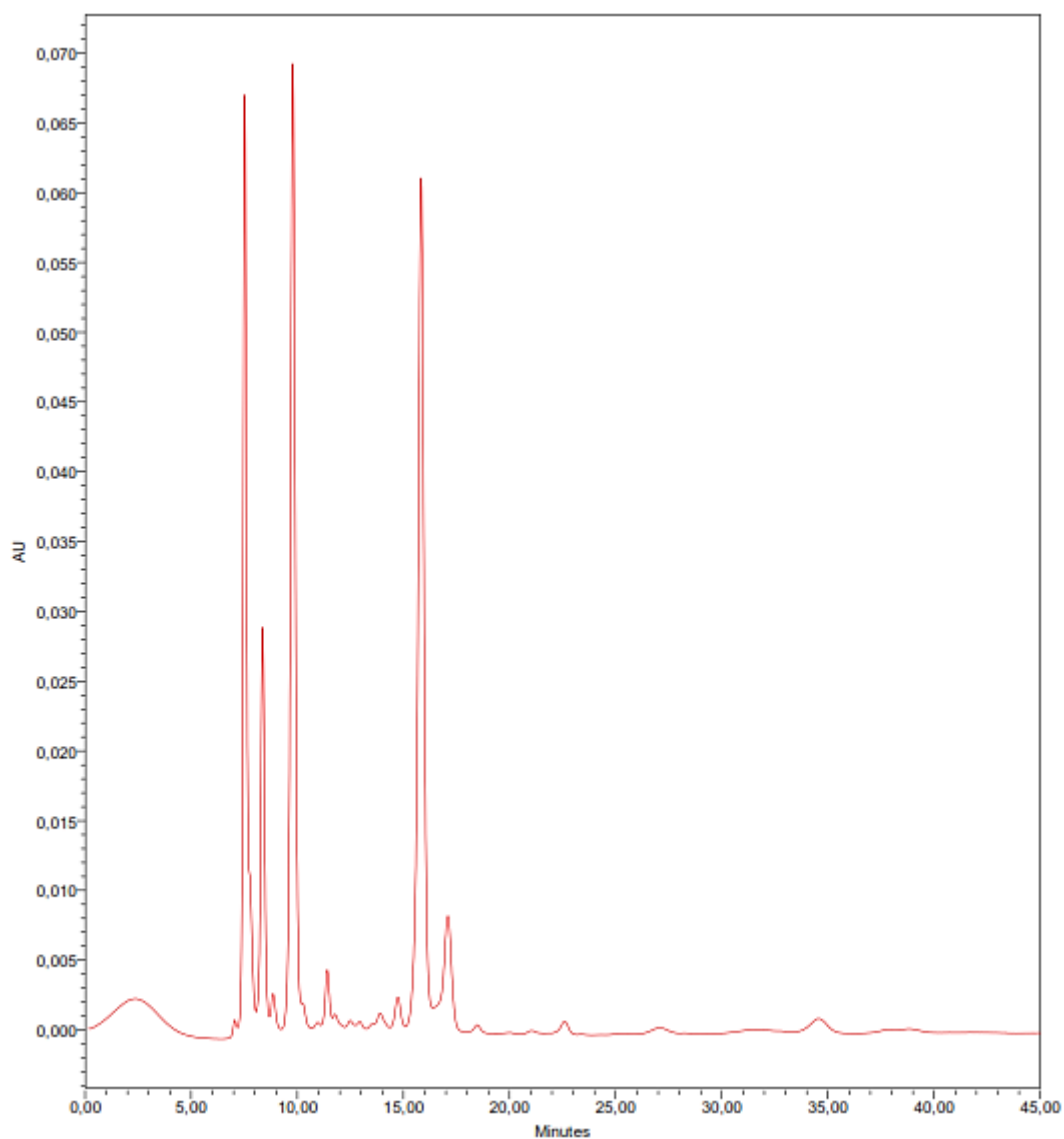


Figura 9. Ejemplo de Perfil de ácidos orgánicos presentes en la leche 3. Concentración *versus* tiempo de retención.

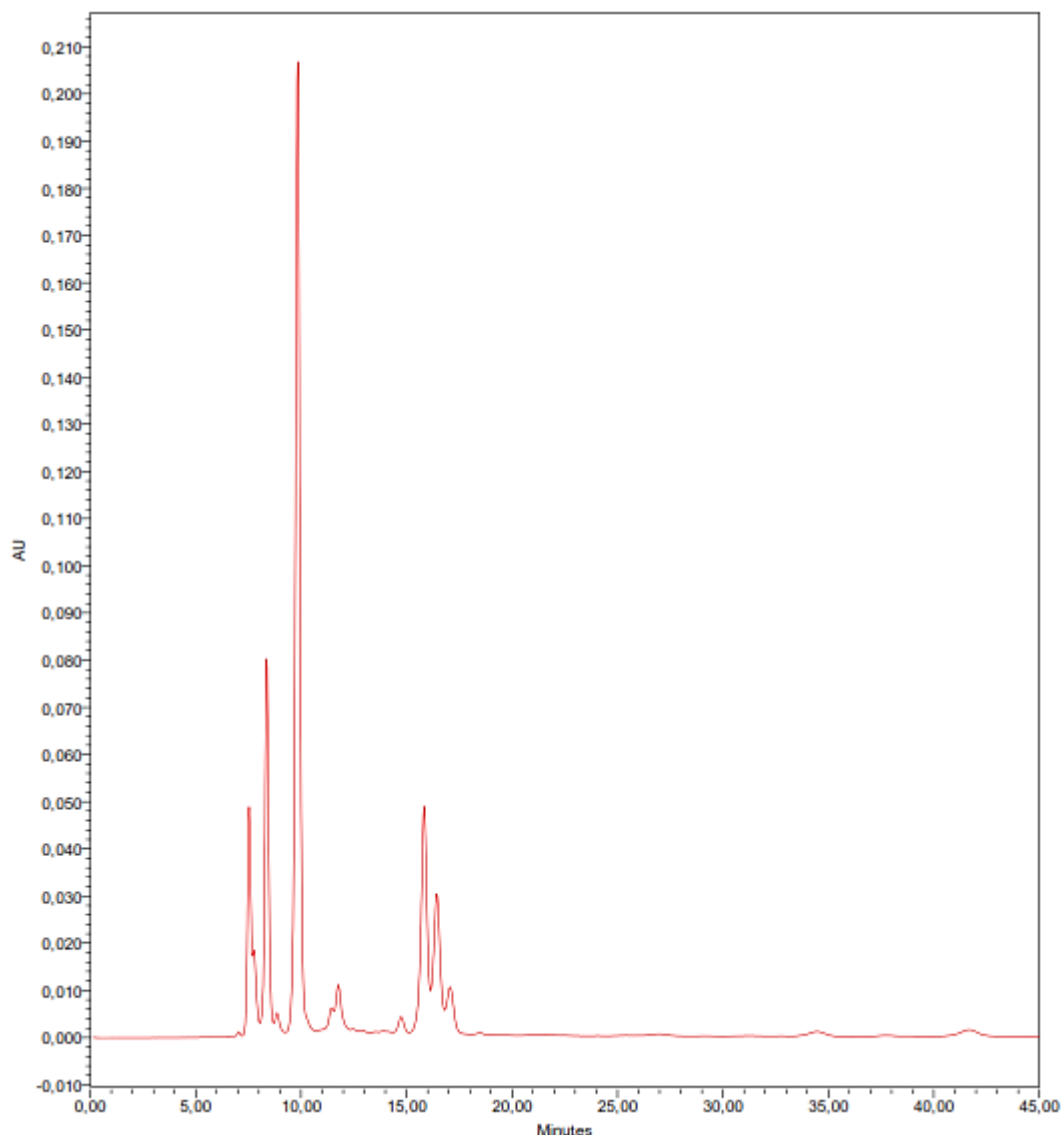


Figura 10. Ejemplo de Perfil de ácidos orgánicos presentes en la leche 2. Concentración *versus* tiempo de retención.

La Tabla 7 muestra la cantidad de nitrógeno total, principalmente nitrógeno de proteína. Como se observa el nitrógeno no proteico representa entre el 1,3 y el 3,1% del nitrógeno total. En el nitrógeno no proteico se incluyen péptidos y aminoácidos. Los péptidos de las leches fermentadas tienen un interés especial por su posible efecto bioactivo, incluso algunos autores indican que estos biopéptidos pueden favorecer el mantenimiento de peso debido a dos razones principales; a) su presencia en el intestino influye en la formación de las hormonas gastrointestinales relacionadas con la saciedad y b) pueden actuar como señales hormonales y unirse a diversos receptores o sustancia agonista ^(34,39,40). Por lo tanto esta fracción podría ser objeto de posterior

estudio detallado para identificar los péptidos de las leches fermentadas y estudiar sus posibles efectos de bioactividad.

Tabla 7. Contenido de distintas fracciones nitrogenadas (g de nitrógeno/100g).

TIPO DE MUESTRA		NITRÓGENO TOTAL	¹ NAN/ ² NT EXPRESADO EN %
ANTICOLESTEROL	LECHE 1	0,42 ± 0,01	1,87 ± 0,18
	LECHE 2	0,47 ± 0,06	3,09 ± 1,92
OTRAS LECHE FERMENTADAS	LECHE 3	0,47 ± 0,03	2,22 ± 0,74
	LECHE 4	0,44 ± 0,02	1,30 ± 0,03

¹NAN; Nitrógeno amino – ácido

²NT; Nitrógeno total

Relación en porcentaje del nitrógeno aminoácido *versus* nitrógeno total.

En la Tabla 8, se puede observar los recuentos de microorganismos viables presentes en las leches fermentadas utilizando, el método Citometría de Flujo (CMF) y recuento en MRSA. Los valores promedio obtenidos por CMF fueron de $7,82 \pm 0,57$ Log AFU/mL, y por recuento en MRSA fue de $5,99 \pm 2,11$ Log ufc/ml. De acuerdo con la norma *Codex Standard 243* (2003) las leches fermentadas deben tener como mínimo un recuento de microorganismos viables de 7 Log ufc/ml, además se debe consumir una cantidad mayor de 100mL al menos 2 veces por semana según refiere *Champagne y Gardner* (2005) ⁽³⁶⁾. Como podemos observar, los valores obtenidos en el recuento por CMF superan ligeramente las exigencias de la mencionada norma. Sin embargo los recuentos obtenidos por método tradicional MRSA fueron 2,5 Log ufc/ml, menores a lo establecido por la misma norma. La variación observada entre las muestras analizadas fue superior en el método tradicional (MRSA) comparada con el método CMF. Estos resultados son similares a los observados por *Bunthof et al.*, (2002), quienes indican que la CMF es más precisa que el recuento en placa para productos lácteos ⁽²⁸⁾. De acuerdo con la *FAO* (2006), los probióticos son microorganismos vivos, los cuales cuando se administran en cantidades adecuadas proporcionan un efecto saludable al hospedador ⁽⁴³⁾. Por lo tanto es importante conocer la cantidad de microorganismos vivos de las leches fermentadas comerciales, ya que ésta es un reflejo de su calidad. Además teniendo en cuenta que algunos de los microorganismos presentes en las leches fermentadas, son difíciles de cultivar con

métodos tradicionales en el laboratorio, el uso de técnicas más apropiadas puede ayudar a reflejar de forma más eficiente la calidad de un alimento.

Tabla 8. Recuento de microorganismos mediante citometría de flujo (AFU/100g) y recuento en placa (Log ufc/100g)

TIPO DE MUESTRA		RECuento POR CITOMETRÍA DE FLUJO	MRSA
		Log AFU/g	Log ufc/g
ANTICOLESTEROL	LECHE 1	8,04 ± 0,09	4,34 ± 0,49
	LECHE 2	7,10 ± 0,15	6,79 ± 0,01
OTRAS LECHE FERMENTADAS	LECHE 3	7,71 ± 0,27	4,23 ± 0,33
	LECHE 4	8,44 ± 0,08	8,63 ± 0,04
TOTAL (MEDIA ± DES)		7,82 ± 0,57	5,99 ± 2,11

Los valores obtenidos por el método CMF mediante el software de análisis se ven reflejados en las Figuras 11, 12, 13 y 14. Los resultados seleccionados para cada leche fermentada se expresaron en dos gráficas, en ellas se representaron las poblaciones microbianas acotadas por una región en la que solo ésta fue considerada para el recuento reflejado en la tabla 8. Esta región incluye el porcentaje de microorganismos considerados como viables según refiere el Protocolo B de la ISO/TC 34/SC 5 ⁽²⁵⁾.

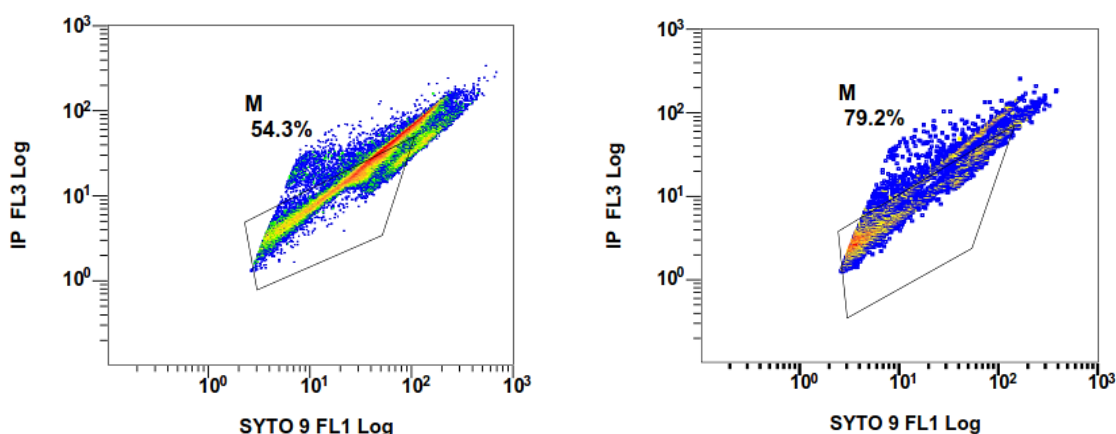


Figura 11. Gráfica de puntos con fluorescencia verde (SYTO 9®) vs. Fluorescencia roja (IP) del experimento llevado a cabo por CMF para la Leche 1.

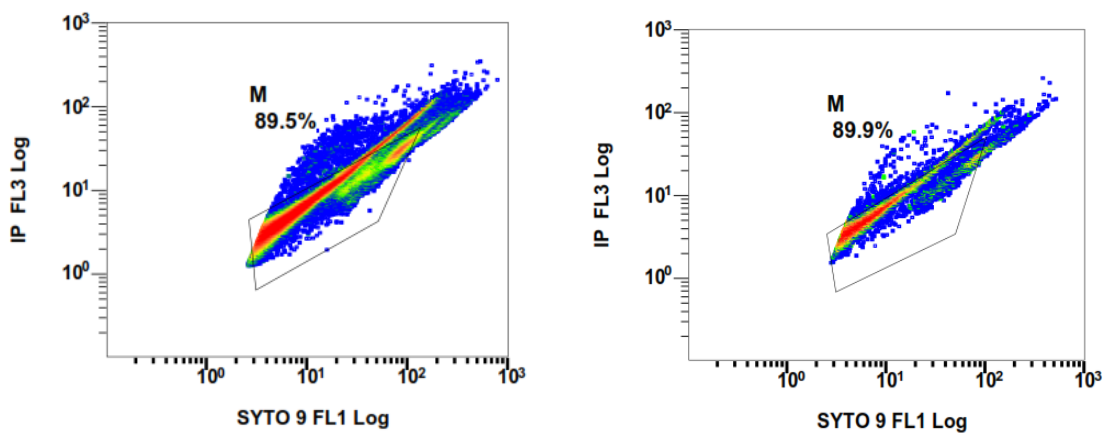


Figura 12. Grafica de puntos con fluorescencia verde (SYTO 9[®]) vs. Fluorescencia roja (IP) del experimento llevado a cabo por CMF para la Leche 2.

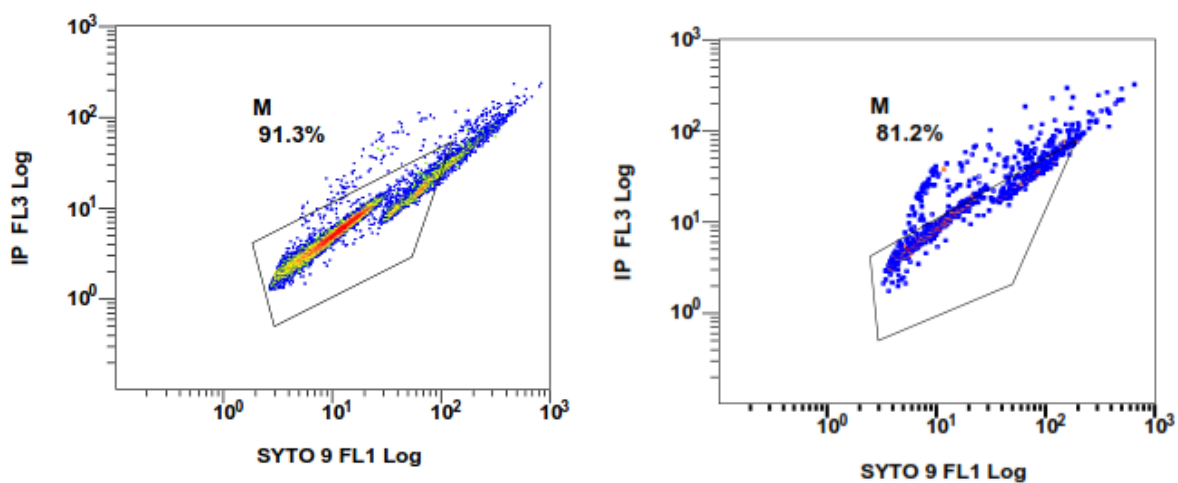


Figura 13. Grafica de puntos con fluorescencia verde (SYTO 9[®]) vs. Fluorescencia roja (IP) del experimento llevado a cabo por CMF para la Leche 3.

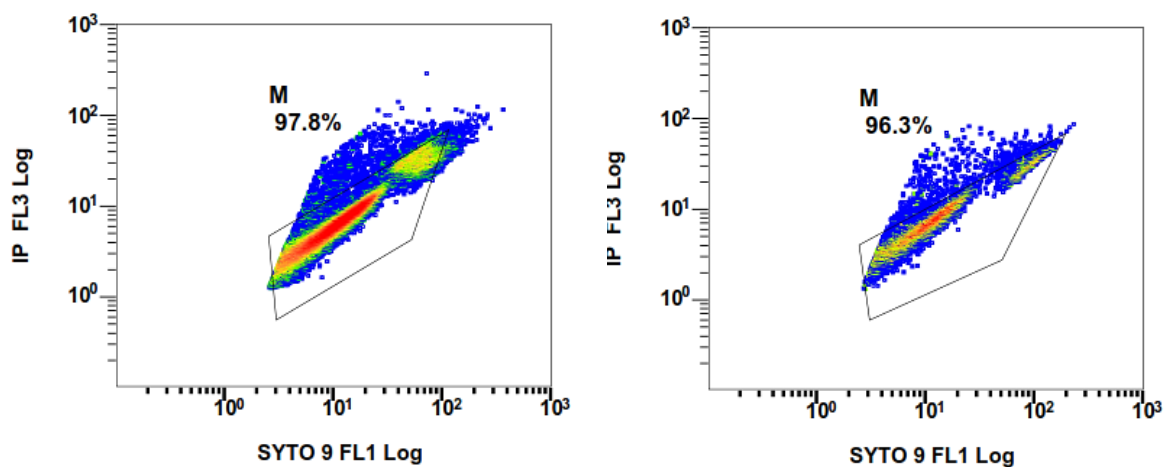


Figura 14. Grafica de puntos con fluorescencia verde (SYTO 9[®]) vs. Fluorescencia roja (IP) del experimento llevado a cabo por CMF para la Leche 4.

5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha descrito la composición nutricional de cuatro leches fermentadas comerciales más allá de lo declarado en el etiquetado, describiendo valores no encontrados antes en la bibliografía. Los valores del etiquetado coinciden en términos generales con los del análisis aunque hay cierta discrepancia. La cantidad de proteína es ligeramente inferior a la de la leche y la de lípidos depende del tipo de leche fermentada, las hay con muy poca grasa y con un contenido en grasa similar al de la leche entera, debido presumiblemente a la adición de grasas vegetales. En este sentido se debería realizar un perfil de ácidos grasos para conocer su calidad nutricional.

Teniendo en cuenta el aporte de calcio de las leches fermentadas estudiadas, en particular la Leche 3 por su alto contenido, pudimos observar que su ingesta sería favorable para el mantenimiento de una adecuada densidad ósea. Sin embargo, observamos una baja cantidad de magnesio. Es posible que exista un desequilibrio de minerales en las leches fermentadas comerciales, derivado de la estrategia de maximizar el consumo de Ca para la prevención y tratamiento de la osteoporosis en detrimento de otros minerales como el magnesio que también intervienen en el equilibrio óseo.

El nitrógeno no proteico de las leches fermentadas está en torno a 2-3%. En futuros estudios podría ser interesante caracterizar ese nitrógeno no proteico mediante el estudio de los péptidos que contienen y su posible efecto biológico.

El recuento viable de microorganismos de cada producto estudiado permitió conocer la cantidad de microorganismos presentes en cada uno de ellos, observando que las leches fermentadas comerciales estudiadas poseen una población microbiana viable superior a 7 Log ufc/mL, cantidad necesaria para ejercer algún efecto probiótico en el organismo.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Moreno, L., Cervera, P., Ortega, R., Díaz, J., Baladia, E., Basulto, J., Ver, S., Iglesia, I., López-Sobaler, A., Manera, M., Rodríguez, E., Santaliestra, A., Babio, N., & Salas-Salvadó, J. (2013). Evidencia científica sobre el papel del yogur y otras leches fermentadas en la alimentación saludable de la población española. *Nutrición Hospitalaria*, 28(6), 2039-2089.
2. Fernández, E., Martínez, J., Martínez, V., Moreno, M., Collado, L., Hernández, M., & Morán, F. (2015). Documento de Consenso: Importancia nutricional y metabólica de la leche. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1), 92-101.
3. Brito, C., (2009). Revaloración de la funcionalidad fisiológica de la leche y los lácteos. Estudios de optimización. *Agro Sur*, 37(2), 71-80.
4. Haug, A., Høstmark, A., & Harstad, O. (2007). Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids In Health And Disease*, 6(1), 25.
5. Tremblay, A., & Joannisse, D.R. (2005). Calcium intake, body composition and plasma lipidlipoprotein concentrations in adults. *Australian Journal of Dairy Technology*, 60, 66-69.
6. Ventura y colaboradores, (2015), Diet-Microbe Interactions in the Gut. 41-51.
7. Pérez, D., & Sánchez, L. Aspectos nutritivos, tecnológicos y probióticos más relevantes. Agencia Aragonesa de Seguridad Alimentaria.
8. Plan de nutrición y comunicación (2011). Productos lácteos insustituibles. Queso, yogur y otras leches fermentadas.
9. Axelsson, L., (1998). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, 2ª ed. Ed. Salminen, S. and von Wright, A. 1–72.
10. Revilla, A. (1982). Tecnología de la leche: Procesamiento, manufactura y análisis. 2º ed. San José, Costa Rica. IICA.
11. Shiby, V., & Mishra, H. (2013). Fermented Milks and Milk Products as Functional Foods—A Review. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 53(5), 482-496. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2010.547398>
12. Real Decreto 271/2014, de 11 de abril, por el que se aprueba la Norma de Calidad para el yogur o yoghurt. España. Ministerio de la presidencia. BOE-A-2014-4515.

13. Programa Conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comité del codex para leche y productos lácteos. *Leches fermentadas* (CODEX STAN 243-2003) Roma, FAO/OMS: 2011
14. Tojo, R., Leis, R., Barros, J., & Prado, M., (2006). Productos lácteos fermentados. *An Pediatr, Monogr.* 4(1), 54-66.
15. Sanz, Y., Collado, M.C., & Dalmau, J. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (CSIC). Valencia.
16. Ouwehand, A., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: An overview of beneficial effects.. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82(1/4), 279-289.
17. Sanders, M.E., & Huis in't Veld. (1999). Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 293-315.
18. Sanz, Y., Collado, M.C., Haros, M., & Dalmau, J. Funciones metabólicas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (CSIC). Valencia.
19. Guarner, F., & Malagelada, J. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 361(9356), 512-519.
20. Requena, T., & Peláez, C. Leches fermentadas probióticas. Departamento de ciencia y tecnología de productos lácteos. Instituto del frío (CSIC). Madrid.
21. Bourlioux, P., Braesco, V., & Mater, D. (2011). Yaourts et autres laits fermentés. *Cahiers De Nutrition Et De Diététique*, 46(6), 305-314
22. Kleyn, H., Lynch, Joanna, M., Barbano, David, M., Bloom, M., Jeffrey, Mitchell, Martin, W. (2001) Determination of Fat in Raw and Processed Milks by the Gerber Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 84(5), 1499-1508.
23. MARM Web (2009). Datos sobre el Consumo Alimentario en España. Disponible en: www.mapa.es/es/alimentacion/pags/consumo/ultimdatos.htm.
24. Subires, A. (2016). Citometría de flujo para detectar bacterias patógenas lesionadas en alimentos. Centre d'Innovació, Recerca i Transferència en Tecnologia dels Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

25. ISO/TC 34/SC 5 (2013). Fermented milk products – Quantification of lactic acid bacteria – Flow cytometry method (Reference method).
26. Servicio de citometría de flujo de IBGM. Valladolid. Disponible en: <http://www.ibgm.med.uva.es/servicios/citometria-de-flujo/>
27. Breeuwer, P., & Abee, T. (2000). Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *International Journal Of Food Microbiology*, 55(1-3), 193-200
28. Bunthof, C., & Abee, T. (2002). Development of a Flow Cytometric Method to Analyze Subpopulations of Bacteria in Probiotic Products and Dairy Starters. *Applied And Environmental Microbiology*, 68(6), 2934-2942
29. Givan, A.L. (2001). Instrumentation: into the black box. En Flow cytometry. First principles. *Wiley-Liss, New York, NY*. 15-39.
30. Stocks, S. (2004). Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight. *Cytometry*, 61A(2), 189-195.
31. Unidad de Citometría de Flujo. Red de apoyo a la investigación (RAI). Disponible en: <http://rai.unam.mx/pages/ucdf.html>
32. Abuajah, C., Ogbonna, A., & Osuji, C. (2015). Functional components and medicinal properties of food: a review. *Journal Of Food Science And Technology*, 52(5), 2522-2529.
33. Andrade, I., Santos, L., & Ramos, F. (2015). “Add-on” effect of phytosterols-enriched fermented milk on lipids and markers of cholesterol metabolism in statin-treated elderly patients. *Steroids*, 99, 293-298.
34. Baeza, P. (2016). ¿Cuál es el papel actual de los biopéptidos presentes en los productos lácteos sobre el control de la saciedad? [Trabajo Fin de Grado]. Valladolid. Universidad de Valladolid.
35. Navarro-Alarcón, M., Cabrera-Vique, C., Ruiz-López, M., Olalla, M., Artacho, R., & Giménez, R. et al. (2011). Levels of Se, Zn, Mg and Ca in commercial goat and cow milk fermented products: Relationship with their chemical composition and probiotic starter culture. *Food Chemistry*, 129(3), 1126-1131.
36. Champagne, C., Gardner, N., & Roy, D. (2005). Challenges in the Addition of Probiotic Cultures to Foods. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 45(1), 61-84.

37. Official Methods of Analysis of AOAC international (1999). Official Method 992.15. Crude protein in meat and meat products, (2) 16th Edition, 5th Revision. Cunniff, P. (Editor). Gaithersburg, Maryland, EEUU.
38. Danacol® and blood cholesterol Scientific substantiation of a health claim related to a low fat fermented milk product (Danacol®) enriched with plant sterols/stanols and lowering/reducing blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease purs. (2009). *EFSA Journal*, 7(7), 1177.
39. Chungchunlam, S., Henare, S., Ganesh, S., & Moughan, P. (2015). Dietary whey protein influences plasma satiety-related hormones and plasma amino acids in normal-weight adult women. *European Journal Of Clinical Nutrition*, 69(2), 179-186
40. Nongonierma, A., & FitzGerald, R. (2015). The scientific evidence for the role of milk protein-derived bioactive peptides in humans: A Review. *Journal Of Functional Foods*, 17, 640-656.
41. Nestares, T., Díaz-Castro, J., Alférez, M. J. M., López-Aliaga, I., Barrionuevo, M., & Campos, M. S. (2008). Calcium-enriched goat milk, in comparison with similarly enriched cow milk, favours magnesium bioavailability in rats with nutritional ferropenic anaemia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 319–327.
42. Hernández, G., (2010). Tratado de nutrición. Nutrición humana en el estado de salud (3), 65-67.
43. FAO (2006). Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. 12-13.

