



Revista Boliviana de Química

ISSN: 0250-5460

ISSN: 2078-3949

revbolquim@outlook.com

Universidad Mayor de San Andrés

Bolivia

Guel García, G. Paulina; Hernández Mendoza, José Luis; Rodríguez, Guadalupe
USO DE BACTERIAS OBTENIDAS A PARTIR DE SUERO DE LECHE Y SU
USO POTENCIAL COMO PROBIÓTICOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Revista Boliviana de Química, vol. 35, núm. 1, 2018, Enero-Abril

Universidad Mayor de San Andrés

Bolivia

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=426355610006>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

UMSA
redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso
abierto



USE OF BACTERIA OBTAINED FROM WHEY AND ITS POTENTIAL USE AS PROBIOTICS IN THE FOOD INDUSTRY. A SHORT REVIEW

USO DE BACTERIAS OBTENIDAS A PARTIR DE SUERO DE LECHE Y SU USO POTENCIAL COMO PROBIÓTICOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Received 01 07 2018
 Accepted 04 25 2018
 Published 04 30 2018

Vol. 35, No.1, pp. 40-45, Ene./Abr. 2018
 Revista Boliviana de Química

35(1), 40-45, Jan./Apr. 2018
 Bolivian Journal of Chemistry



Short review

Peer-reviewed

G. Paulina Guel García¹, José Luis Hernández Mendoza^{1,*}, Guadalupe Rodríguez Castillejos²

¹Laboratorio de Biotecnología Experimental, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Boulevard del Maestro, con Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, s/n, C.P. 88710, Reynosa Tamaulipas, México

²UAM Reynosa - Aztlán: Calle 16 y Lago De Chapala, Col. Aztlán CD. Reynosa, Tamaulipas CP.88740 Tel. (899) 921-3340

Keywords: Milk, Whey, Lactic acid bacteria, Probiotic, Characterization, Gen 16.

ABSTRACT

Some antimicrobial agents, as well as hormones, enzymes and antibodies can be found in whole milk. The two most abundant fractions of the protein content in bovine milk are casein and whey proteins. Due to whey properties, it is considered as a functional food, that is to say, in addition to having its intrinsic nutritional value, it has a benefic effect on one or more functions of the organism. In this way, it is suitable for health improvement and well-being and for the reduction of risk of certain diseases. Whey contains more than half the solids present in whole milk, including 20% of the proteins (lactalbumins and lactoglobulins) and 80% of dry matter in the form of lactose, mineral salts and water-soluble vitamins. The identification of lactic acid bacteria (LAB) is currently performed by biochemical tests like API 38 CHL, API 20 STREP and API 50 CHS strips. It has been shown that fraction A2 of milk protein decreases the incidence of cardiovascular diseases and diabetes type I. Finally, the knowledge currently generated about the genetics of lactic acid bacteria is interesting for the development of new foods with nutraceutical properties (functionality), texture or conservation.

*Corresponding author: jhernandezm@ipn.mx

RESUMEN



La leche entera contiene moléculas antimicrobianas, hormonas, enzimas y anticuerpos. Las dos fracciones más abundantes del contenido proteico en leche bovina son la caseína y las proteínas de lactosuero. Debido a sus propiedades, el lactosuero, es considerado como un alimento funcional, es decir que además de tener un valor nutricional intrínseco, tiene un efecto beneficioso sobre una o más funciones del organismo, de tal modo que resulta apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar y/o para la reducción de riesgo de ciertas enfermedades. El lactosuero contiene más de la mitad de los sólidos presentes en la leche entera, que incluyen 20% de las proteínas (lactoalbúminas y lactoglobulinas) y 80% de materia seca en forma de lactosa, sales minerales y vitaminas hidrosoluble. La identificación de las bacterias ácido lácticas (LAB), se realiza actualmente por procedimientos tales como pruebas bioquímicas por tiras API 38 CHL, API 20 STREP y API 50 CHS. Se ha demostrado que las proteínas de la leche, como la fracción A2, disminuye la incidencia de enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo I. Finalmente, el conocimiento generado en la actualidad sobre la genética de las bacterias ácido lácticas es interesante para el desarrollo de nuevos alimentos con propiedades nutraceuticas (funcionalidad), textura o en la conservación.

INTRODUCCIÓN

La industria láctea es uno de los sectores económicos más importantes de la industria alimenticia tanto en países industrializados como de economía emergente [1]. En la leche entera, se pueden encontrar moléculas antimicrobianas, hormonas, enzimas y anticuerpos [2]. Las dos fracciones más abundantes del contenido proteico en leche bovina son la caseína y las proteínas de lactosuero. La caseína es una mezcla compleja de fosfoproteínas presentes en forma de micelas de 500 - 600 nm de diámetro, las cuales funcionan como transportadoras de calcio y fosfato [2], así mismo, representan la mayoría del nitrógeno contenido en la leche [3]. Dentro de este grupo, la β -caseína contempla dos variantes: A1 y A2 [4]. El lactosuero es usado para una gran cantidad de productos alimenticios, como ser ácidos orgánicos, productos de panadería, alcohol [5], bebidas para deportistas, bebidas fermentadas, empaques biodegradables, gomas, sustancias inhibidoras de crecimiento, proteína unicelular, exopolisacáridos y concentrados proteicos [6-8]. La producción anual a nivel mundial estimada de lactosuero alcanza aproximadamente 145 millones de toneladas, de las cuales 6 millones son de lactosa [9]. La producción de queso demanda una gran cantidad de leche, ya que de cada 10 litros de leche se obtiene aproximadamente 1 kg de queso y se generan 9 litros de lactosuero como subproducto [7]. En el año 2016, México produjo más de 2,500 galones de leche, a nivel nacional, de los cuales 36,500 toneladas se usaron para la producción de queso [10].

Por sus diversas propiedades, el lactosuero es considerado un alimento funcional, es decir que además de tener un valor nutricional intrínseco, tiene un efecto benéfico sobre una o más funciones del organismo, de tal modo que resulta apropiado para mejorar el estado de salud, el bienestar y para la reducción del riesgo de contraer ciertas enfermedades [7]. La presente revisión está enfocada en las más recientes investigaciones sobre las bacterias ácido lácticas y su relación con la industria alimentaria.

REVIEW

El lactosuero contiene más de la mitad de los sólidos presentes en la leche entera, que incluyen 20% de las proteínas (lactoalbúminas y lactoglobulinas) y 80% de materia seca en forma de lactosa, sales minerales y vitaminas hidrosolubles (Tabla 1) [7, 11].

Las proteínas del lactosuero más representativas son:

- β -Lactoglobulina. Representa aproximadamente la mitad de las proteínas totales del lactosuero. Es capaz de unirse a moléculas como colesterol, retinol, ácidos grasos, vitamina D y palmitol. Puede causar intolerancia o alergenidad en humanos debido a su alta resistencia a la digestión gástrica [3, 7].
- α -Lactoalbúmina. Comprenden aproximadamente del 20-25% de las proteínas del lactosuero. Posee una gran afinidad por el calcio y otros como el zinc, manganeso, cadmio, cobre y aluminio [3, 7].

Tanto la β -lactoglobulina como la α -lactoalbúmina contribuyen a las propiedades funcionales en las formulaciones de alimentos, tales como hidratación, emulsificación, textura, consistencia, formación de espuma y propiedades de gelificación de las proteínas de lactosuero [1].

Otras proteínas que se encuentran en menor cantidad son: albúmina de suero sanguíneo, inmunoglobulinas, lactoferrina, transferrina, lactoperoxidasa, glicomacropéptidos, una gran variedad de factores de crecimiento, lactato de potasio ácido y la fracción proteosa-peptona [3, 12].



Tabla 1. Composición del lactosuero dulce y ácido [7]

Componente (g/L)	Lactosuero dulce	Lactosuero ácido
Sólidos totales	63.0 - 70.0	63.0 - 70.0
Lactosa	46.0 - 52.0	44.0 - 46.0
Grasa	0.0 - 5.0	0.0 - 5.0
Proteína	6.0 - 10.0	6.0 - 8.0
Calcio	0.4 - 0.6	1.2 - 1.6
Fósforo	0.4 - 0.7	0.5 - 0.8
Potasio	1.4 - 1.6	1.4 - 1.6
Cloruros	2.0 - 2.2	2.0 - 2.2

Características microbiológicas de las bacterias ácido lácticas.

La mayoría de las bacterias de ácido láctico (LAB) son facultativamente anaeróbicas, catalasa-negativas, no móviles, cocos o barras sin formación de esporas, productoras de ácido láctico como producto final y principal causa de la fermentación de carbohidratos, así mismo son reconocidas como bacterias GRAS [13, 14]. Los géneros más representativos de LAB son los *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactosphaera*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, *Mlissococcus*, *Oenococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Dolosigranulum*, *Globicatella*, *Teragenococcus*, *Alloiococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, y *Weissella* [13, 15, 16]. Las LAB pueden ser clasificadas en dos grupos:

- Homofermentativas: Convierten la mayor parte de la glucosa en ácido láctico. Generalmente actúa bajo la vía metabólica de Embden-Meyerhof (glucólisis) donde se producen dos moléculas de ácido láctico a partir de cada molécula de glucosa. Este grupo de bacterias son las únicas usadas en la industria para la producción de ácido láctico. Dentro de grupo se encuentran la *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *S. lactis*, *S. cremoris*, *S. faecalis*, *S. thermophilus* y *P. cerevisiae* [14, 16, 17].
- Heterofermentativas: Éstas catabolizan la glucosa en etanol y CO₂, así como en ácido láctico. Dentro de este grupo se encuentran la *L. mesenteroides*, *L. cremoris*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *Leuconostoc* [14].

Estas bacterias han sido usadas por mucho tiempo en alimentos fermentados ya que muestra características benéficas nutricionales y organolépticas. En lactosuero fresco, las bacterias más representativas encontradas fueron *Lactobacillus* sp. con 87.18% de las bacterias totales identificadas y aisladas. Dentro de la especie *Lactobacillus*, se encontraron las especies *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. fermentum* [18]. En otro estudio similar, se detectaron en muestras de lactosuero, seis especies de microorganismos: *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. zeae* y *L. hilgardii* y *Pichia kudriavzevii*. Todas las especies de lactobacilos demostraron tener actividad antibacteriana [19].

Por a su alto contenido nutricional, se ha sugerido el uso de este producto en diversas industrias, sin embargo del total de lactosuero producido, aproximadamente sólo el 40% es destinado para el consumo animal y aplicaciones alimentarias, mientras que el 60% restante es vertido sin tratamiento al ambiente [6]. Aun cuando se ha demostrado su alto valor nutricional, su eliminación sin regulación de normas federales establecidas, crea un serio problema ambiental. Esta eliminación sin norma afecta física y químicamente la estructura del suelo debido a la cantidad de materia orgánica que contiene, resultando en la disminución del rendimiento de cultivos y cuando se libera en agua, el lactosuero reduce la vida acuática al reducir el nivel de oxígeno disuelto en agua [13, 20]. Ya que la mayoría de las plantas procesadoras de leche no tienen un apropiado manejo de sistemas de disposición de lactosuero, constituye



una pérdida significativa de alimento y energía que podría ser usada, ya que el lactosuero contiene aproximadamente 55% de los nutrientes totales de la leche [7, 13].

Las bacterias ácido lácticas como inhibidoras de microorganismos, tienen una gran importancia en el contexto de la industria alimenticia, ya que sobresale su importancia en la conservación y seguridad de alimentos [16, 19]. Hoy en día, la industria alimenticia usa LAB a través de la adición de éstas como cultivos iniciadores a la matriz alimentaria, lo que resulta en un alto grado de control sobre el procesamiento de alimentos fermentados [21]. Así mismo, la fermentación del ácido láctico es uno de los procesos más investigados tanto en la industria alimenticia como farmacéutica por la aplicación potencial de ácido láctico y biomasa de LAB [21, 22]. El uso de LAB en la industria se utiliza tanto como el mejoramiento de la calidad de alimentos fermentados y no fermentados mediante el enriquecimiento de cultivos de este tipo de bacterias [22]. Sin embargo se ha descrito que las LAB son inhibidas al estar en un medio con ácido láctico [23], esto es un problema en el sentido que hay limitantes en el desarrollo de sistemas que llevan a la obtención de sistemas de alta densidad celular, provocando generalmente un lote no rentable [17, 21]. Diversos autores han referido varias alternativas para este problema, los cuales incluyen el uso de bio-reactores, así como sistemas de microfiltración o ultrafiltración [24].

En este sentido, cuando se ingieren los organismos vivos en cantidades adecuadas, ejercen un beneficio para la salud del huésped, y se denominan probióticos. Así mismo, los más usados son los *Lactobacilos*, *Bifidobacterias* y levaduras no patógenas. Aun así, no hay que olvidar que no todas las especies de *Lactobacillus* son consideradas como probióticos [25]. Para considerar un microorganismo como probiótico, es necesaria su caracterización de género, especie y cepa, lo cual garantizará que se trata de un microorganismo inocuo y seguro. Esta caracterización permitirá denominarlo como un organismo GRAS (Generally Regarded as Safe) según su estudio en efectos biológicos y clínicos [26].

El lactosuero es un líquido obtenido a partir de la elaboración del queso durante la etapa de separación del coágulo de leche [1, 7, 27]. Dependiendo del proceso al que se someta la leche, el lactosuero puede ser principalmente de dos tipos: lactosuero ácido y dulce.

El lactosuero dulce se obtiene de la elaboración de quesos de pasta cocida y prensada (leche de vaca) y quesos de ovejas. Éste es pobre en ácido láctico, calcio y fósforo [28] y se obtiene mediante el uso de enzimas proteolíticas, las cuales actúan sobre las caseínas de la leche y las fragmentan, haciendo que se desestabilicen y precipiten. Por otra parte, el lactosuero ácido se obtiene mediante la precipitación ácida de la caseína, que se logra disminuyendo el pH de la leche a 4.5 [7, 28].

La identificación de las bacterias ácido lácticas (LAB), se realiza actualmente por procedimientos tales como pruebas bioquímicas por tiras API 38 CHL, API 20 STREP y API 50 CHS. Así mismo, también se usan métodos moleculares como RAPD-PCR, análisis y secuenciación del gen 16S rRNA y PCR-DGGE. Estas técnicas ofrecen una rápida identificación y caracterización de LAB [18, 29-31].

Las propiedades probióticas.

Las propiedades probióticas se determinarán según las siguientes características:

1. Resistencia a sales biliares y acidez gástrica. La viabilidad de los microorganismos es necesaria para su transporte al final del intestino para ejercer sus efectos benéficos [26]
2. Adherencia a la mucosa intestinal y células epiteliales. Necesaria para reducir la adhesión de microbiota competitiva y permitir el desarrollo de actividad microbiana que favorece el desplazamiento de patógenos. Se ha descrito que los *Lactobacillus* pueden unirse a la mucosa intestinal a través de ciertos glicoesfingolípidos [26].

A partir de estas características, se pueden obtener los beneficios de las propiedades de los probióticos, las cuales se han demostrado ayudar en el transcurso del proceso digestivo, ya que el proceso de fermentación incrementa la disponibilidad de proteínas, péptidos y aminoácidos por medio de su acción proteolítica. Así mismo, se ha demostrado en modelos animales que los niveles de macrófagos, células natural-killer e interferón gamma se encuentran aumentados [32].

Los avances en las investigaciones de las bacterias ácido lácticas y las proteínas asociadas al suero de leche, han revelado que proteínas del tipo A1 descrita por Laugesen y McLachlan de ciertas razas de ganado vacuno genera diabetes tipo I, así como los anticuerpos asociados producen enfermedad coronaria, esquizofrenia y autismo [33-35]. Elliott y colaboradores en 1999 puntualizaron en una variante de la A1 de la caseína, que conducía a la producción de



β -casomorfina 7, la cual afecta a los receptores opioides del sistema nervioso, endocrino y del sistema inmune [36]. En tanto, que la proteína A2 ha demostrado disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo I [2]. Lo anterior indica que el conocimiento generado sobre la genética de las bacterias ácido lácticas es interesante para el desarrollo de nuevos alimentos con propiedades nutraceuticas (funcionalidad), textura o en la conservación.

RECONOCIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional, a la Secretaria de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional y a la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas.

REFERENCIAS

1. Parra Huertas, R.A. **2009**, Whey: importance in the food industry. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 62 (1), 4967-4982.
2. Singh, N.K., Kour, S., Sharma, N. **2016**, Impact of A1/A2 forms of Cow's Milk on Human Health-A review. *Journal of Animal Research*, 6(6), 923-931.
3. Jovanović, S., Barać, M., Mačej, O. **2005**, Whey proteins-properties and possibility of application, *Mljekarstvo*, 55(3), 215-233.
4. O'mahony, J.A., Smith, K.E., Lucey, J.A. **2014**, Purification of beta casein from milk, *Google Patents*.
5. Parashar, A., Jin, Y., Mason, B., Chae, M., Bressler, D.C. **2016**, Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry, *Journal of Dairy Science*, 99(3), 1859-1867.
6. Guerra, A.V.A., Castro, L.M.M., Tovar, A.L.Q. **2013**, Utilization of whey as a source of nutritional energy to minimize the problem of environmental pollution, *Revista de Investigacion Agraria y Ambiental*, 4(2), 55-66.
7. Hernández-Rojas, M., Vélez-Ruiz, J. **2014**, Whey and its application in the preparation of functional food, *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(2), 13-22.
8. Pasin, G., Comerford, K.B. **2015**, Dairy foods and dairy proteins in the management of type 2 diabetes: A systematic review of the clinical evidence, *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 6(3), 245-259.
9. Carrillo, J.L. **2006**, Treatment and reuse of whey, *Revista Mundo Lácteo y Cárnico*, 6, 20-30.
10. SAGARPA and SIAP, *Milk Newsletter*, January - March **2017**, 66.
11. Fernández, A., Rojas, E., Garcia, A., Mejia, J., Bravo, A. **2016**, Physical-chemical, sensory and shelf-life evaluation of biscuits enriched with whey protein byproducts, *Revista Científica*, 26(2).
12. Baro, L., Jiménez, J., Martínez-Férez, A., Bouza, J. **2017**, Peptides and milk proteins with functional properties, *Ars Pharmaceutica*, 42(3-4), 135-145.
13. Panesar, P.S., Kennedy, J.F., Gandhi, D.N., Bunko, K. **2007**, Bioutilisation of whey for lactic acid productio, *Food Chemistry*, 105(1), 1-14.
14. Patel, S.A., Parikh S.C. **2016**, Production of lactic acid from whey by *Lactobacillus* sp. isolated from local dairy products, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5, 734-741.
15. König, H., Fröhlich, J. **2017**, Lactic acid bacteria, in *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, Springer, 3-41.
16. Crowley, S., Mahony, J., Van Sinderen, D. **2013**, Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives, *Trends in food science & technology*, 33(2), 93-109.
17. Yun, J.-S., Wee, Y.-J., Ryu, H.-W. **2003**, Production of optically pure L (+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(4), 416-423.
18. Díaz-Monroy, B.L., Iglesias, A.E., Valiño-Cabrera, E. **2014**, Microbial consortia with promising acid-lactic activity isolated from native bacterial inoculants for silages, *Ciencia y Agricultura*, 11(1), 17-26.
19. Caballero Jimenez, P., Perez Castro, M., Rodriguez Morgado, B., Parrado Rubio, J. **2015**, Lactic acid bacteria from fermented whey as a biocontrol tool against phytopathogenic microorganisms, *Fermentation Technology*, 3(2), 82-82.
20. Conde-Báez, L., Castro-Rosas J., Villagómez-Ibarra J., Páez-Lerma J., Gómez-Aldapa C. **2017**, Evaluation of waste from the cheese industry for the production of 2-phenyl ethanol, *Acta Universitaria*, 27(3), 57-63.
21. Alfano, A., Donnarumma, G., Cimini, D., Fusco, A., Marzaioli, I., De Rosa, M., Schiraldi, C. **2015**, *Lactobacillus plantarum*: Microfiltration experiments for the production of probiotic biomass to be used in food and nutraceutical preparations. *Biotechnology Progress*, 31(2), 325-333.
22. Rzepkowska, A., Zielińska, D., Ołdak, A., Kołożyn-Krajewska, D. **2017**, Organic whey as a source of *Lactobacillus* strains with selected technological and antimicrobial properties, *International Journal of Food Science & Technology*, 52(9), 1983-1994, <https://doi.org/10.1111/ijfs.13471>.
23. Burgos-Rubio, C.N., Okos, M.R., Wankat, P.C. **2000**, Kinetic study of the conversion of different substrates to lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology Progress*, 16(3), 305-314.
24. Sirisansaneeyakul, S., Luangpipat, T., Vanichsriratana, W., Srinophakun, T., Chen, H.H.-H. and Chisti Y. **2007**, Optimization of lactic acid production by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(5), 381.
25. Quigley, E.M. **2010**, Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota, *Pharmacol Res*, 61(3), 213-218.
26. Amorocho Cruz, C.M. Characterization and probiotic potential of lactic bacteria isolated from guirra sheep's milk, Editorial Universitat Politècnica de Valencia, Ph.D. dissertation, tesis UPV 3685, **2011**, Valencia, Spain.
27. Esnoval, V., Octavio, C., Pinto Ruiz, R., Rodríguez Hernández, R., De la Torre, J.C., De Jesús, A.G. **2017**, Use, production and nutritional quality of whey in the central region of Chiapas. *Avances en Investigacion Agropecuaria*. 21(1).



28. Callejas Hernández, J., Prieto García, F., Reyes Cruz, V.E., Marmolejo Santillán, Y., Méndez Marzo, M.A. **2012**, Physicochemical characterization of a whey: phosphorus recovery potential, *Acta Universitaria*,. 22(1), 11-18.
29. Khalil, I., Anwar, N. **2016**, Isolation, Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Milk and Yoghurts. Research & Reviews. *Journal of Food and Dairy Technology*, 4(3), 17-26.
30. Ashmaig, A., Hasan, A., El Gaali, E. **2009**, Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese fermented camels milk (Gariss), *African Journal of Microbiology Research*, 3(8), 451-457.
31. Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G., Coppola, S. **2001**, The potential of a polyphasic PCR-DGGE Approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(4), 610-617.
32. Fooks, L.J., Fuller, R., Gibson, G.R. **1999**, Prebiotics, probiotics and human gut microbiology, *International Dairy Journal*, 9(1), 53-61.
33. McLachlan, C. **2001**, β -casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Medical Hypotheses*, 56(2), 262-272.
34. Laugesen, M., Elliott, R. **2003**, Ischaemic heart disease, Type 1 diabetes, and cow milk A1 β -casein. *The New Zealand Medical Journal*, 116 (1168).
35. Parashar, A., Saini, R.K. 2015, A1 milk and its controversy-a review, *International Journal of Bioassays*, 4(12), 4611-4619.
36. Elliott, R., Harris, D., Hill, J., Bibby, N., Wasmuth, H. **1999**, Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. *Diabetologia*, 42(3), 292-296.