TESIS DOCTORAL

Victoria Eugenia García Casas

Caracterización del lactosuero dulce procedente de Ecuador, antes y después de un proceso de digestión in vitro: evaluación de los péptidos bioactivos, composición mineral y propiedades antioxidantes

DOCTORADO EN NUTRICIÓN Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

CARACTERIZACIÓN DEL LACTOSUERO DULCE PROCEDENTE DE ECUADOR, ANTES Y DESPUÉS DE UN PROCESO DE DIGESTIÓN *IN VITRO*: EVALUACIÓN DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS, COMPOSICIÓN MINERAL Y PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

Victoria Eugenia García Casas

Dirigida por:

Dra. Isabel Seiquer Gómez-Pavón

Dra. Raquel Olías Sánchez

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Nutrición y Ciencias de los Alimentos

Granada, 2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Victoria Eugenia García Casas
ISBN: 978-84-1195-356-6
URI: https://hdl.handle.net/10481/92799

La doctoranda Victoria Eugenia García Casas y las directoras de la Tesis, Isabel Seiquer Gómez-Pavón y Raquel Olías Sánchez, garantizamos, al firmar esta Tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de las mencionadas directoras y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, xxxxxxxxxxxx2024

Directoras de la Tesis:

Dra. Isabel Seiquer Gómez-Pavón

Dra. Raquel Olías Sánchez

Doctoranda:

Victoria Eugenia García Casas

La presente Memoria de Tesis Doctoral se ha realizado bajo la dirección de las Doctoras Isabel Seiquer Gómez-Pavón, Investigador Científico, y, Raquel Olías Sánchez, Científico Titular del Departamento de Nutrición y Producción Animal Sostenible de la Estación Experimental del Zaidín (Armilla, Granada), perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), en cuyos laboratorios se ha desarrollado la mayor parte de la experimentación reportada en esta memoria.

La preparación inicial de las muestras se realizó en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Tecnológicas de la Universidad de Guayaquil (Ecuador). Además, parte de las determinaciones analíticas se realizaron en el Departamento de Proteómica del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" de Granada, así como en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, (CIAL) de Madrid, ambos centros del CSIC.

El financiamiento del presente trabajo se llevó a cabo gracias a la contribución del Departamento de Nutrición y Producción Animal Sostenible de la Estación Experimental del Zaidín y a una Beca de Formación Doctoral otorgada por la Universidad de Guayaquil.

Las muestras ecuatorianas analizadas en esta investigación fueron provistas por el Centro de Acopio Diprolac del cantón Balzar de la Provincia del Guayas-Ecuador, mientras que la muestra española fue proporcionada por la Granja "Las Maravillas" de la ciudad de Granada-España.

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral se han publicado en una revista de impacto mundial y han sido presentados en diversos congresos internacionales:

Publicación en revista de impacto mundial

García-Casas, V. E., Seiquer, I., Pardo, Z., Haro, A., Recio, I., & Olías, R. (2022). Antioxidant potential of the sweet whey-based beverage *Colada* after the digestive process and relationships with the lipid and protein fractions. Antioxidants, 11(9), 1827, https://doi.org/10.3390/antiox11091827. Índice de impacto: 7.675 (Food Science &Technology 12/143; Medicinal Chemistry 4/63) Q1, D1.

Presentaciones en congresos internacionales

García-Casas Victoria. 2017. Termocoagulación ácida aplicada a la recuperación de proteínas del lactosuero residual de la industria ganadera. Congreso Internacional de Agricultura Sustentable, Latacunga (Ecuador), 23-25 de mayo. Centro de Investigación y Desarrollo Ecuador, 2017. pp. 34.

García-Casas V., Olías R., González-Cañas G., Seiquer I. 2021. Propiedades antioxidantes del lactosuero dulce antes y después de la digestión in vitro. Estudio comparativo con un preparado alimenticio elaborado con lactosuero. XIX Congreso Latinoamericano de Nutrición (SLAN), Asunción (Paraguay), 31 octubre- 4 noviembre. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 2021, 71, Supl. 1, pp. 104. https://doi.org/10.37527/2021.71.S1.

García-Casas V., Olías R., Haro, A., Pardo Z, Seiquer I. 2021. Efecto de las variaciones estacionales en la composición nutricional del lactosuero dulce, el perfil de ácidos grasos y el contenido en aminoácidos. XIX Congreso Latinoamericano de Nutrición (SLAN), Asunción (Paraguay), 31 octubre- 4 noviembre. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 2021, 71, Supl. 1, pp. 265. https://doi.org/10.37527/2021.71.S1.

García-Casas V., Seiquer I., Pardo Z., Olías R. 2022. Nutritional properties of a Colada drink supplemented with whey. 7th International Conference on Food Digestion, Cork (Irlanda), 3 - 5 Mayo. Book of Abstracts, http://hdl.handle.net/10261/309343.

Además, durante el periodo doctoral se han realizado otras contribuciones directamente relacionadas con el tema de la Tesis, que se citan a continuación:

Libro publicado

García-Casas V. E., Sánchez-Companioni Roberto, Ramón Ramón Tania Jackeline. (2018). Suero de Leche, la ciencia detrás de su rescate. Ed: Grupo Compás 2019. ISBN: 978-9942-770-04-2; URI: http://142.93.18.15:8080/jspui/handle/123456789/340.

Trabajo de titulación de tercer nivel

Guevara, L., León, R. (2019). Aprovechamiento del lactosuero dulce en la elaboración de un alimento enriquecido con Hordeum vulgare y Passiflora edulis (Universidad de Guayaquil). Dirigido por Victoria García Casas. https://repositorio.ug.edu.ec/items/9c57e9f4-d669-4894-8438-725ead7beb36

Publicaciones

García Casas, V. E., Vargas Pérez, J., Sánchez Companioni, R., Diez García, N. (2021). Protein recovery from residual bovine whey: Influence of acid thermo-coagulation. Bionatura, 6(1), 1602-1607. https://doi.org/10.21931/RB/2021.06.01.24. Índice de impacto: 0.265 Q4.

Agradecimientos

Tengo que empezar agradeciendo a mi Padre Celestial por concederme el tiempo necesario para poder llegar al cumplimiento de esta nueva meta y a mi maravillosa familia por su apoyo permanente e incondicional. Gracias Rodrigo, Liliana, Paola, Geovanna y Diego por estar a mi lado siempre siendo mi fortaleza en cada instante de mi vida, especialmente en los momentos difíciles que hemos tenido que afrontar.

Mi profundo agradecimiento para mi tutora y directora de tesis, la Doctora Isabel Seiquer Gómez-Pavón por aceptar la dirección de esta Tesis. Su generosidad al compartir sus conocimientos y experiencia ha sido fundamental en el desarrollo de esta investigación; por su compromiso y entrega le estaré siempre agradecida. Mil gracias mi bella Doctora por su constante disposición para responder mis preguntas y brindarme su orientación experta; sin su ayuda no lo hubiera logrado.

De igual manera mi inmenso agradecimiento para la Doctora Raquel Olías Sánchez por acceder a formar parte de esta investigación como cotutora en el área de proteómica; sin su colaboración y experticia hubiese sido imposible terminar este proyecto.

Por las dos siento gran admiración y respeto. Mi eterno agradecimiento por su inmensa paciencia, comprensión y dedicación. Su guía y colaboración a lo largo de este proceso ha sido invaluable y permanecerá por siempre en mi memoria. Las estancias con ustedes fueron muy enriquecedoras y han permitido mi crecimiento profesional y académico, por lo que, estoy muy agradecida por haber tenido la oportunidad de aprender de las mejores; sin su apoyo incondicional no hubiera conseguido culminar este trabajo.

Al Doctor Ignacio Fernández-Fígarez Ibáñez por su colaboración y valiosas enseñanzas durante mi estancia doctoral.

A la Doctora Rosa Nieto por la acogida brindada durante mis estancias doctorales en el Centro de Investigación.

A Zaira Pardo, doctoranda y compañera durante mis estancias en el centro de investigación, muchas gracias por todo el apoyo brindado en este proceso.

A todos los técnicos de laboratorio del Departamento de Nutrición y Producción Animal Sostenible de la Estación Experimental del Zaidín del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Armilla, a quienes les agradezco por toda la colaboración brindada y por ese compartir de conocimientos de forma desinteresada, sus valiosas enseñanzas me han sido de gran valía durante este proceso; especialmente quiero agradecer a mis queridos Lesly, Guille, Toñi y Ana por toda su valiosa ayuda.

A mis queridos Antonio y Vivi del Departamento de Proteómica del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neyra” del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Armilla por aceptarme en el centro de investigación y enseñarme a través de sus clases magistrales, las que aún prevalecen en mi memoria.

A mi mentor, el Ing. Roberto Sánchez Companioni por sembrar en mí la semilla de la investigación y apoyarme a lo largo de estos años. Gracias, mi Robert querido por ese compartir de conocimientos, los que me han fortalecido en mi rol de docente e investigadora. Tu mentoría ha sido una inspiración para mi, y estoy segura de que tus enseñanzas seguirán guiándome con el pasar del tiempo.

A mi querida Doctora Nardy Diez García, docente e investigadora de la Escuela Superior Politécnica del Litoral quiero agradecerle por sus enseñanzas en la etapa inicial de este proceso, sin sus clases no hubiera podido iniciar este recorrido. Por la apertura de siempre, gracias.

Al Dr. Jesús Francisco Rodríguez Huertas, catedrático de Fisiología de la Universidad de Granada, por ser el puente de acceso a la Universidad de Granada y al honorable Departamento de Nutrición y Producción Animal Sostenible de la Estación Experimental del Zaidín del CSIC. Gracias Doctor por darme la oportunidad de ingresar a la Escuela Internacional de Posgrado de la Universidad de Granada.

A las autoridades del Departamento de Nutrición y Producción Animal Sostenible de la Estación Experimental del Zaidín del CSIC en Armilla por acogerme durante mis estancias de investigación y contribuir con recursos para poder llevado a cabo la fase experimental de este proyecto.

A las autoridades de la Universidad de Guayaquil, Alma Mater donde me desempeño como docente, por todo el apoyo brindado durante mi formación doctoral; especialmente mi agradecimiento para el Señor exdecano de la Facultad de Ingeniería Química, Ing. Guillermo Cárdenas Murillo, Mgtr., por haber hecho viable mi participación en el programa de doctorado.
De igual manera quiero agradecer a la directora de la carrera de Gastronomía MAE. Grace Molina por su constante apoyo durante mi formación doctoral; así mismo expreso mi gratitud a mis compañeros Marina, Sandra, Gabriela, Asalia, Fernando, David y Fabian por su colaboración durante mis estancias de investigación.

Al Centro de Acopio "Diprolac" del cantón Balzar en el Ecuador y a la Granja "Las Maravillas" de la ciudad de Granada-España por proporcionarnos las muestras de lactosuero objeto de estudio de esta investigación. Mi agradecimiento especial para Don Miguel Silva Briones por abrirme las puertas del centro de acopio a su cargo y facilitarme la toma de muestras durante el proceso productivo.

Para llevar a cabo este trabajo de investigación he contado con el apoyo directo e incondicional de personas extraordinarias, todos y cada uno de ustedes han aportado en las diferentes etapas de este proyecto, su apoyo ha hecho viable la cristalización de los resultados que se exponen en esta memoria.

A todos, gracias por el apoyo brindado.

Dedicatoria

Este logro es para ustedes, amada familia y para mi querido hermano ausente, quien estaría feliz al ver que lo conseguí a pesar de todo.

Índice

Capítulo I. Justificación y objetivos....10

1.1. Justificación....10

1.2. Objetivos....12

Capítulo II. Revisión Bibliográfica....14

2.1. El lactosuero....14

2.1.1. Origen y producción a nivel mundial....15

2.2. Producción de lactosuero en el Ecuador....17

2.3. Producción de lactosuero en España....19

2.4. Proceso tecnológico para la obtención de lactosuero....20

2.4.1. Preparación de la leche....21

2.4.2. Coagulación de la caseína....22

2.4.2.1. Coagulación por acción enzimática....22

2.4.2.2. Coagulación ácido-láctica....23

2.4.2.3. Coagulación mixta....23

2.4.3. Corte de la cuajada....23

2.4.4. Sinéresis....23

2.4.5. Aumento de la temperatura para acelerar el desuerado....24

2.4.6. Moldeado y prensado....24

2.4.7. Salado....24

2.5. Aprovechamiento del suero de quesería....25

2.6. Composición nutricional del lactosuero....29

2.6.1. Fracción proteica....31

2.6.1.1. β-lactoglobulina....33

2.6.1.2. α-lactoalbúmina....34

2.6.1.3. Albúmina sérica o Albúmina de suero bovino....35

2.6.1.4. Inmunoglobulinas....35

2.6.2. Carbohidratos....38

2.6.3. Grasa y perfil de ácidos grasos 39
2.6.4. Minerales 40
2.6.5. Vitaminas 40
2.7. Péptidos del lactosuero con actividad biológica *41*
2.7.1. Péptidos con actividad antihipertensiva 43
2.7.2. Péptidos con actividad antitrombótica 44
2.7.3. Péptidos con actividad inmunológica 44
2.7.4. Péptidos con actividad antitumoral 45
2.7.5. Péptidos con actividad antimicrobiana 45
2.7.6. Péptidos con actividad opioide 46
2.7.7. Péptidos con actividad antiinflamatoria 47
2.7.8. Péptidos con actividad antiviral 47
2.7.9. Péptidos con actividad hipocolesterolémica 48
2.7.10. Péptidos con actividad antidiabética 48
2.7.11. Péptidos con actividad osteoanabólica 49
2.7.12. Péptidos con actividad antioxidante 49
2.8. Biodisponibilidad de los nutrientes del lactosuero *56*
2.9. Usos y aplicaciones del lactosuero *58*
2.10. Importancia del lactosuero en la industria alimentaria *60*
2.11. Aprovechamiento del lactosuero en el Ecuador *66*
2.12. La Colada como bebida de la cultura gastronómica ecuatoriana *71*
Capítulo III. Material y métodos 75
3.1. Muestras *75*
3.1.1. Lactosuero procedente del Ecuador 75
3.1.2. Lactosuero procedente de España (Granada) 75
3.1.3. Bebida a partir de lactosuero (*Colada*) 75
3.2. Determinaciones analíticas *78*
3.2.1. Composición nutricional 78

3.2.1.1. Determinación de proteína 79
3.2.1.2. Determinación de grasa 79
3.2.1.3. Determinación de minerales 80
3.2.1.4. Determinación de energía 80
3.2.2. Digestión *in vitro* 81
3.2.2.1. Fase oral 82
3.2.2.2. Fase gástrica 82
3.2.2.3 Fase intestinal 82
3.2.3. Actividad antioxidante y polifenoles totales 84
3.2.3.1. Extracto químico 84
3.2.3.2. Ensayo ABTS 84
3.2.3.3. Ensayo DPPH 85
3.2.3.4. Ensayo FRAP 85
3.2.3.5. Contenido total de polifenoles (PFT) 85
3.2.4. Ensayos en cultivos celulares 85
3.2.4.1. Medida de la generación de ROS 86
3.2.4.2. Ensayos de absorción intestinal 87
3.2.5. Perfil de ácidos grasos (AG) 88
3.2.6. Perfil de proteínas 89
3.2.7. Perfil de aminoácidos 89
3.2.8. Grado de hidrólisis de las proteínas (GH) 90
3.2.9. Peso molecular 90
3.2.10. Identificación de péptidos 91
3.3. Evaluación sensorial de la Colada *92*
3.4. Análisis estadístico *96*
Capítulo IV. Resultados y discusión 98
4.1. Composición nutricional *98*
4.2. Perfil de ácidos grasos antes y después de la digestión in vitro: efecto del proceso digestivo *101*

4.3. Actividad antioxidante antes y después de la digestión in vitro: efecto del proceso digestivo y marcadores celulares de estrés oxidativo: (generación de ROS en células Caco-2) *110*

4.4. Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de minerales en las muestras de lactosuero y Colada *119*

4.4.1. Bioaccesibilidad mineral 120

4.4.1.2 Bioaccesibilidad del calcio 121

4.4.1.3. Bioaccesibilidad del fósforo 122

4.4.1.4. Bioaccesibilidad del magnesio 123

4.4.1.5. Bioaccesibilidad del sodio 125

4.4.1.6. Bioaccesibilidad del potasio 125

4.4.1.7. Bioaccesibilidad del hierro 126

4.4.2. Biodisponibilidad mineral. Ensayos en células Caco-2 127

4.4.2.1. Biodisponibilidad del calcio 129

4.4.2.2. Biodisponibilidad del magnesio 130

4.4.2.3. Biodisponibilidad del Sodio 130

4.4.2.4. Biodisponibilidad del potasio 131

4.4.2.5. Biodisponibilidad del hierro 132

4.5. Perfil de aminoácidos *133*

4.6. Proteólisis y liberación de péptidos durante la digestión in vitro *136*

4.7. Identificación de péptidos *141*

4.8. Artículo publicado: Antioxidant potential of the sweet whey-based beverage Colada after the digestive process and relationships with the lipid and protein fractions *197*

Capítulo V. Conclusiones y resumen **241**

Conclusiones *242*

Resumen *244*

Referencias *246*

Índice de Tablas

Tabla 1. *Composición media del lactosuero según su clasificación*.....15

Tabla 2. *Métodos empleados para la concentración de proteínas de suero*.....28

Tabla 3. *Composición nutricional de diferentes tipos de suero de leche*.....29

Tabla 4. *Aminoácidos esenciales presentes en el lactosuero (g/100g de proteína)*.....32

Tabla 5. *Proteínas del lactosuero* 33

Tabla 6. *Inmunoglobulinas séricas* 36

Tabla 7. *Resumen de compuestos proteicos minoritarios en el lactosuero* 36

Tabla 8. *Vitaminas del grupo B presentes en el lactosuero (concentración/100g)* 41

Tabla 9. *Propiedades funcionales de los péptidos del lactosuero* 42

Tabla 10. *Péptidos del lactosuero con actividad biológica* 52

Tabla 11. *Aplicaciones del lactosuero en la industria alimentaria* 60

Tabla 12. *Propiedades funcionales de las proteínas de la leche (caseínas) y del lactosuero* 62

Tabla 13. Formulación de la *Colada*.....78

Tabla 14. *Fluidos de digestión simulada* 81

Tabla 15. *Enzimas empleadas en la digestión simulada*.....82

Tabla 16. *Análisis sensorial discriminante de diferentes formulaciones de Colada (25-5 % jugo de maracuyá) por jueces entrenados (n=5).* 93

Tabla 17. *Evaluación hedónica de colada (15 % de jugo de maracuyá) por los consumidores (n=80).*.....94

Tabla 18. *Composición nutricional de las muestras de lactosuero y Colada*.....99

Tabla 19. *Perfil de ácidos grasos antes de la digestión in vitro* 103

Tabla 20. *Perfil de ácidos grasos después de la digestión in vitro (FB).* 107

Tabla 21. *Efecto del proceso digestivo en el perfil de AG expresado en veces de aumento.*.....108

Tabla 22. *Actividad antioxidante (mM Eq. trolox /kg) y contenido en polifenoles totales (PFT, mM ácido gálico/kg) de las muestras antes y después de la digestión in vitro (fracciones bioaccesible y residual)*.....112

Tabla 23. *Bioaccesibilidad del calcio, fósforo y magnesio en las muestras de lactosuero y Colada después de la digestión in vitro (fracciones bioaccesible y residual)*.....120

Tabla 24. *Bioaccesibilidad del sodio, potasio y hierro en las muestras de lactosuero y Colada después de la digestión in vitro (fracciones bioaccesible y residual)*.....124

Tabla 25. *Transporte y captación de minerales en células Caco-2 tras 2h de exposición a la fracción bioaccesible de las muestras digeridas.*.....128

Tabla 26. *Perfil de aminoácidos (mg/g muestra fresca)* 134

Tabla 27. *HD durante la fase gástrica e intestinal* 140

Tabla 28. *Actividad biológica de los péptidos identificados (MBPDB)** 144

Tabla 29. *Péptidos identificados LEc-I (MBPDB)*.....147

Tabla 30. *Péptidos identificados LEc-V (MBPDB)*.....159

Tabla 31. *Péptidos identificados LEs (MBPDB)*.....173

Tabla 32. *Péptidos identificados Colada (MBPDB)* 181

Tabla 33. *Identificación de péptidos con posible actividad antioxidante* 192

Tabla 34. *Péptidos identificados a partir de α-LA con posible actividad antioxidante*.....196

Tabla 35. *Caracterización in silico de péptidos de la cebada identificados en la fracción bioaccesible de la bebida de suero digerida (Colada). Predicción de la actividad antioxidante mediante AnOxPePred-1.0*.....197

Índice de figuras

Figura 1. *Provincias de mayor producción de leche en el Ecuador (%)* 18

Figura 2. *Comunidades autónomas de mayor producción de leche en España (%)*.....19

Figura 3. *Flujo de proceso de elaboración de queso* 20

Figura 4. *Obtención de lactosuero* 21

Figura 5. *Procesamiento para la obtención de derivados del lactosuero*.....27

Figura 6. *Composición nutricional media del lactosuero* 30

Figura 7. *Investigaciones dirigidas al aprovechamiento del lactosuero en el Ecuador* 67

Figura 8. *Uso del lactosuero en la industria alimentaria del Ecuador*.....68

Figura 9. *Colada morada* 72

Figura 10. *Flujo del proceso de elaboración de las Coladas* 73

Figura 11. *Muestras objeto de estudio y su procedencia* 76

Figura 12. *Proceso de elaboración de la Colada*.....77

Figura 13. *Digestión in vitro de las muestras* 83

Figura 14. *Esquema del ensayo de transporte* 88

Figura 15. *Esquema del diseño experimental* 95

Figura 16. *Índices de los AG de las muestras antes de la digestión in vitro*.....104

Figura 17. *Índices de los AG de las muestras después de la digestión in vitro* 108

Figura 18. *Efecto del proceso digestivo en los índices de los AG*.....109

Figura 19. *Efecto del proceso digestivo en las propiedades antioxidantes y la cantidad de polifenoles totales de las muestras de lactosuero y Colada (expresado en veces de aumento)* ..115

Figura 20. *Contribución a las propiedades antioxidantes y la cantidad de polifenoles totales de las fracciones bioaccesible (FB) y residual (FR) obtenidas tras la digestión in vitro de las muestras de lactosuero y Colada (expresada en %).* 116

Figura 21. *Generación de ROS en células Caco-2 preincubadas con los digeridos (FB) de las muestras de lactosuero y Colada (expresada en unidades de fluorescencia) y comparación con las células control incubadas con medio de cultivo.*.....118

Figura 22. *Biodisponibilidad mineral (transporte + captación) en células Caco-2 tras 2h de exposición a la fracción bioaccesible de las muestras digeridas (expresado en % de la cantidad inicial presente en la cámara apical)*.....129

Figura 23. *Perfil de aminoácidos en la fracción soluble (% de cada aa respecto al total)*.....135

Figura 24. *Perfil proteico de las muestras después de la fase oral SDS-PAGE (4-12%)*.....136

Figura 25. *Perfil proteico de las muestras después de la fase gástrica (SDS-PAGE (4-12%).*...137

Figura 26. *Perfil proteico de las muestras después de la fase intestinal (digestión completa) (SDS-PAGE (4-12%)*.....138

Figura 27. *Perfil de proteínas y péptidos analizado por cromatografía de exclusión molecular(SEC).*.....139

Capítulo I

Justificación y objetivos

Capítulo I. Justificación y objetivos

1.1. Justificación

La obtención de queso a nivel mundial da como resultado la producción de millones de litros de lactosuero al año, que en gran parte son vertidos al medio ambiente o utilizados para alimentación animal. Sin embargo, los estudios realizados ponen de manifiesto la importancia desde el punto de vista nutricional del suero lácteo y los resultados de múltiples investigaciones certifican la excelente calidad y funcionalidad de los compuestos en él presentes. En este sentido existe una falta de información entre los pequeños y medianos productores de la industria quesera especialmente en los países en vías de desarrollo y la inexperiencia de estos sectores productivos ha limitado la implementación de nuevas metodologías destinadas al desarrollo de alimentos funcionales a partir de esta materia prima.

El lactosuero dulce posee una composición de proteínas tal que sus péptidos pueden presentar funciones biológicas de interés, identificables en base a su secuencia aminoacídica (Brandelli et al., 2015). En la última década se han destinado esfuerzos al estudio de los péptidos bioactivos, fragmentos de proteínas que tienen una función específica en el organismo, acorde a su secuencia de aminoácidos (Kitts & Weiler, 2003; Olvera-Rosales et al., 2022), así como a su papel como compuestos reguladores en el organismo.

Las proteínas de origen lácteo son fuente de péptidos que son inactivos biológicamente en la proteína nativa; su bioactividad se pone de manifiesto a través de la digestión mediante la acción de las enzimas digestivas, por la acción proteolítica microbiana o por la proteólisis de enzimas producidas por microorganismos (Korhonen & Pihlanto, 2006). Los péptidos derivados de la leche de vaca son de gran beneficio para el ser humano ya que presentan efectos beneficiosos, basados en sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, antimicrobianas y reguladoras del sistema inmunológico (Gauthier et al., 2006; Olvera-Rosales et al., 2022).

Es conocido que las proteínas de la leche, mayoritariamente la caseína, actúan como coloides estabilizadores del calcio y otros minerales, es decir, forman complejos con el mineral llamados "micelas" y favorecen su solubilización (especialmente la caseína κ), lo cual es una de las razones por los que la leche es considerada una fuente de minerales con buena biodisponibilidad (Monti et al., 2018). Las proteínas mayoritarias del lactosuero son las globulinas y las albúminas, de gran valor nutritivo por su especial composición en aminoácidos, pero que además pueden ser fuente de

péptidos capaces de unirse a minerales. La α-lactoalbúmina presenta una alta afinidad por iones metálicos como magnesio, potasio, sodio, hierro y especialmente calcio (Domínguez-Puerto et al., 2018). El lactosuero contiene, además, metaloproteínas (lactoferrina, transferrina y ceruloplasmina), proteínas que fijan específicamente el cobre y el hierro, con una constante de disociación elevada que proporciona gran estabilidad del enlace metal-proteína, por lo que tienen un papel esencial en el transporte de los metales en el organismo (Hill et al., 2019). Por otra parte, se ha demostrado que algunos péptidos obtenidos a partir de hidrolizados de proteínas lácteas producen efectos positivos en la estabilidad, absorción y biodisponibilidad de minerales divalentes como el hierro, calcio, magnesio y zinc (Yadav et al., 2015), ya que tienen la capacidad de formar complejos solubles con los mismos; en este sentido, la administración de minerales en forma de complejos se considera una excelente alternativa para mitigar los problemas relacionados con su deficiencia, uno de los problemas nutricionales de mayor prevalencia en todo el mundo. Por tanto, el lactosuero puede ser una fuente de macrominerales y de oligoelementos biodisponibles para el organismo. Esto supone la posibilidad de utilizarlo en situaciones fisiológicas de especial carencia, o de incluirlo como compuesto bioactivo en preparados alimenticios para reforzar la ingesta y la disponibilidad mineral.

Con cierta frecuencia se produce en el organismo una situación de estrés oxidativo, que tiene lugar cuando hay un desequilibrio entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes. Los radicales libres están implicados en multitud de patologías y en el proceso de envejecimiento, por lo que, en esta situación, los antioxidantes de la dieta cobran especial importancia. Las proteínas del lactosuero presentan propiedades antioxidantes, potencialmente beneficiosas para la salud (Burd & Phillips, 2010; Corrochano et al., 2019; García et al., 2019; Nabuco et al., 2019; Parra, 2009), atribuidas a la capacidad neutralizadora de radicales libres de sus aminoácidos aromáticos (Mann et al., 2019).

Hoy día se acepta que para valorar el valor nutritivo y potencialmente saludable de un alimento, es necesario conocer la bioaccesibilidad de sus componentes, es decir, la fracción del total que se libera durante el proceso de digestión y está disponible para ser absorbida por el epitelio intestinal (Seiquer et al., 2015). Dicha liberación es el primer requisito para la utilización de los nutrientes del alimento, y para que éstos puedan ejercer una actividad biológica.

En Ecuador el lactosuero que se genera producto de la industria quesera es desperdiciado casi en su totalidad (Cortez Latorre, 2018). En este aspecto en el Plan Estratégico Integral de

Agroforestal, Pesca y Acuicultura en el Ecuador del 2015 se reportó que el 55 % del lactosuero producido en el país es desechado sin ningún tipo de tratamiento, mientras que el 45 % restante se destina a la producción de queso ricota, bebidas o a la alimentación de cerdos (SIIPRO, 2015).

En el país, la mayoría de las aplicaciones del lactosuero se basan en su aprovechamiento en forma líquida; esto se debe principalmente a los altos costos de ensamblaje y mantenimiento de los equipos necesarios para la obtención de compuestos aislados, o de mayor concentración de una proteína en particular. El atractivo de la utilización del lactosuero se debe a que es una materia prima de bajo costo con grandes potenciales nutricionales, sin embargo, como se ha expuesto anteriormente, elevar los costos de producción para la fabricación masiva de productos lo haría poco accesible, como los productos de alto nivel proteico que ya se encuentran en el mercado; razón por la cual, los estudios realizados en el Ecuador se han centrado principalmente en la elaboración de alimentos para consumo inmediato, especialmente bebidas.

A partir de lo anterior, la caracterización del lactosuero de la zona y la difusión de los resultados obtenidos mediante esta memoria busca revalorizar este subproducto de la industria quesera, incentivando además el aprovechamiento de su valor nutricional entre la población más vulnerable mediante el desarrollo de una bebida (*Colada*) (bebida elaborada a partir de cereales, frutas y especias aromáticas) que reúna las características de las *Coladas* que se consumen de manera regular en la cultura gastronómica del Ecuador; introduciendo en la formulación como ingrediente el lactosuero con la finalidad de aprovechar sus ventajas nutricionales, reforzar la economía circular y estimular la salud de la población, especialmente la de niños y adolescentes.

1.2. Objetivos

Con los antecedentes expuestos, la presente memoria de Tesis Doctoral tiene como **Objetivo General** caracterizar el lactosuero dulce procedente de Ecuador antes y después de un proceso de digestión *in vitro*, evaluando los péptidos bioactivos, la composición mineral y las propiedades antioxidantes.

Para lograr este Objetivo general, se han planteado los siguientes **Objetivos específicos**:

1. Realizar la caracterización fisicoquímica de las muestras de lactosuero dulce bovino procedentes del Ecuador, obtenidas en dos épocas diferentes del año (estación seca y

lluviosa), y realizar un estudio comparativo con el lactosuero dulce bovino procedente de España, obtenido durante la época de otoño.

2. Determinar en dichas muestras el perfil proteico, la composición en ácidos grasos, la composición mineral y las propiedades antioxidantes antes y después de un proceso de digestión *in vitro*.
3. Evaluar el efecto de la matriz alimentaria, analizando una bebida (*Colada*) de consumo habitual en Ecuador cuya base es el lactosuero de la zona.

Capítulo II

Revisión bibliográfica

Capítulo II. Revisión Bibliográfica

2.1. El lactosuero

El lactosuero es la fracción líquida resultante de la elaboración del queso tras la separación de la cuajada (Brandelli et al., 2015). Representa del 80 al 90 % del volumen total de la leche, en el que queda retenido el 55 % de los sólidos como la lactosa, proteínas séricas, minerales y grasa; su color es translúcido verde amarillento debido a las altas concentraciones de riboflavina; contiene además cantidades importantes de vitaminas del complejo B como la B2 y la B12 (Arce-Méndez et al., 2016; Gutiérrez-Cortés et al., 2018; Mollea et al., 2013). El lactosuero puede considerarse como sustrato de bajo costo, que puede ser empleado en la producción de nutraceúticos y diversos bioproductos (Chourasia et al., 2022), de igual forma, puede usarse como sustrato eficiente para el desarrollo de probióticos (Rengel dos Passos et al., 2021).

El queso puede elaborarse por distintos procesos, lo que ocasiona variaciones en las características del lactosuero. En este sentido, se han clasificado dos tipos de lactosuero según su palatabilidad: el **lactosuero ácido**, el cual proviene de la coagulación mixta, proceso que consiste en una disminución del pH de la leche empleando ácidos orgánicos o por fermentación de la lactosa con bacterias acido-lácticas más la adición de cuajo, lo que resulta en una sustancia ácida, debido al ácido láctico producido a partir de la lactosa por las bacterias que se añaden en el proceso. Contrariamente, el **lactosuero dulce** es obtenido durante la elaboración tradicional del queso fresco y su palatabilidad es más agradable, para esto se realiza la coagulación enzimática de la caseína, utilizando proteasas como la quimosina u otra similares a un pH relativamente neutro de 6,5 a 6.8 (Mazorra-Manzano et al., 2019).

El proceso con el que se elabore el queso atribuye distintas propiedades y composición nutricional al lactosuero (Tabla 1). En el caso del lactosuero ácido, contiene mayor cantidad de ácido láctico (6 a 4 g/L), lo que le confiere un pH < 5.6 teniendo mayor cantidad de cenizas y menor cantidad de proteínas (6 a 8 g/L), esto debido a los procesos de precipitación, producto de la acidificación de la leche, de igual forma menor contenido de lactosa (44 a 46 g/L); sin embargo, el contenido de calcio es mayor, lo que potencia su valor nutricional (Smith et al., 2016). Es importante destacar que la mayor producción de lactosuero a nivel mundial (un 94 %) es la del lactosuero dulce, mientras que el otro 6 % corresponde a lactosuero ácido El lactosuero dulce tiene una menor acidez y mayor cantidad de lactosa, 46 a 52 g/L (Anon, 2001; Kaur et al., 2022).

Tabla 1. *Composición media del lactosuero según su clasificación*

Componente	Suero lácteo dulce (g/L)	Suero lácteo ácido (g/L)
Sólidos totales	63-70	63-70
Lactosa	46 - 52	44-46
Proteína	6-10	6-8
Calcio	0.4-0.6	1.2-1.6
Fosfatos	1-3	2-4.5
Lactatos	2.0	6.4
Cloruros	1.1	1.1

Nota: Tomado de Kaur et al., (2022)

Otra diferencia entre los tipos de suero la constituye los glicomacropéptidos (GMP) obtenidos por la fragmentación de la caseína *k*; los GMP representan el 20 % de la fracción proteica que constituye el suero dulce, pero está ausente en el suero ácido, haciendo del lactosuero dulce una materia prima de alta calidad gracias al contenido de aminoácidos de gran valor que componen los GMP, convirtiéndolo en un ingrediente codiciado por sus propiedades nutracéuticas (Neelima et al., 2013). En este sentido, la proteína del lactosuero dulce ha sido una de las más buscadas en el mercado, aunado a la tecnología necesaria para la verificación de las propiedades funcionales, como la formación de espuma, emulsificación, entre otras propiedades de interés para la industria; lo que le confiere una mayor valoración que al lactosuero ácido (Rocha-Mendoza et al., 2021).

2.1.1. Origen y producción a nivel mundial

La producción de lactosuero está estrechamente vinculada con el surgimiento del queso; en este sentido, se dice que el queso surgió en Mesopotamia hace unos 4000 años (Ribeiro & Ribeiro, 2010), pero no es sino hasta el año 460 a. C. cuando el filósofo griego Hipócrates, padre de la medicina, documenta la utilización de las propiedades del lactosuero, revelando el efecto desintoxicante y depurador que este tiene en el organismo, atenuando enfermedades estomacales, así como su poder antiséptico y cicatrizante; en el siglo XVIII se llegó a utilizar como alimento y durante el siglo XIX tenía usos terapéuticos a nivel tópico (Onwulata y Huth, 2008). En los últimos años el conocimiento de estas propiedades y usos se ha disipado en la esfera de la cultura popular

y hasta hoy el lactosuero ha llegado a considerarse como residuo, representando el 90 % de los desechos de la fabricación del queso.

Aún en este siglo que transita el 45 % de estos residuos son desechados en su totalidad, al punto de convertirse en un serio contaminante del suelo y del agua, debido a la alta demanda de oxígeno en sus procesos de descomposición, tanto químicos como biológicos (Parra, 2009). Esta alta demanda de oxígeno para la descomposición del lactosuero se debe a su alto contenido de lactosa, proteínas y micronutrientes, en el que se ha estimado una demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de 35 a 60 mg/L y una demanda química de oxígeno (DQO) de 50 a 102 mg/L. Estos desechos degradan las propiedades físicas y químicas de los suelos y aguas, no solo afectando de forma ecológica, sino también en el rendimiento de los cultivos; en consecuencia, termina afectando la producción de otras fuentes de alimentos, incluso la salud humana (Kaur et al., 2020).

La demanda diaria de los productos lácteos como la leche, el queso y la cuajada, constituye una fracción importante en el mercado mundial. Para el 2022 la FAO pronosticó una producción de 930 millones de toneladas de leche, esto representaría un crecimiento anual del 0,6 % por encima del 2021 (FAO, 2022). Se estima que la producción de leche aumentará para el 2030 en 1020 millones de toneladas y que de este total se destinará al menos el 40 % a la elaboración de subproductos como queso, mantequilla, leche en polvo y suero en polvo (OCDE/FAO, 2021).

El queso es el producto lácteo de mayor consumo en Europa, África y América del Norte. En Asia esta posición recae en la mantequilla. Por su parte, el lactosuero es de gran interés en los mercados internacionales para su empleo en la industria panadera, repostera y farmacéutica, es así que durante el año 2020 el suero de quesería ocupó el 0,029 % del total del comercio mundial (OEC, 2020); siendo el suero de leche en polvo el producto más comercializado (un 16 %) y se vaticina un aumento del 11 %, incluso más que el queso el cual se prevé que registrará solo un aumento del 3 % (Wickramasinghe & Dekermendjian, 2021).

Se espera una expansión general del comercio de productos lácteos en la próxima década, así como un fuerte crecimiento del suero de leche; se estima, además, que el volumen del lactosuero continúe en aumento en la misma proporción que la leche ±1,5 % al año, dada la creciente demanda de subproductos como el yogurt griego (Buchanan et al., 2023). Países como China, Países bajos, Estados Unidos y Alemania durante el año 2020 fueron el principal destino de este remanente del sector lechero y para este mismo periodo se reportó una producción de 183 millones de toneladas (Osorio-González et al., 2022). Se estima que anualmente se producen más de 200 millones de

toneladas de lactosuero (Chen et al., 2023), y se prevé un aumento para el 2030 de 241 millones de toneladas si continua el crecimiento proyectado del 1 % al 2 % (Buchanan et al., 2023).

En la actualidad, el lactosuero ya no se considera como descarte o un subproducto, sino como un coproducto de la industria quesera (Brandelli et al., 2015; Guinee, 2021; Von Oesen et al., 2023). Estas aseveraciones surgen debido a que la reutilización del lactosuero ha cobrado gran relevancia en la industria alimenticia a nivel mundial, gracias al avance tecnológico que ha hecho posible los descubrimientos de sus proteínas bioactivas, lo que le confiere excelentes propiedades como nutriente funcional y la utilización amplia en la industria alimentaria y de productos nutracéuticos (Osorio-González et al., 2022; Tallapragada & Rayavarapu, 2019). Una de las formas más comercializadas es el suero deshidratado y la pasta de suero (FAO, 2021), siendo muy apreciada en el mercado mundial del suero de leche, valorado en $ 78,7 mil millones de USD en 2019 gracias a sus proteínas de alta calidad (Chourasia et al., 2022) y proyecciones para llegar a $ 81,4 mil millones para 2025 (Tsermoula et al., 2021).

2.2. Producción de lactosuero en el Ecuador

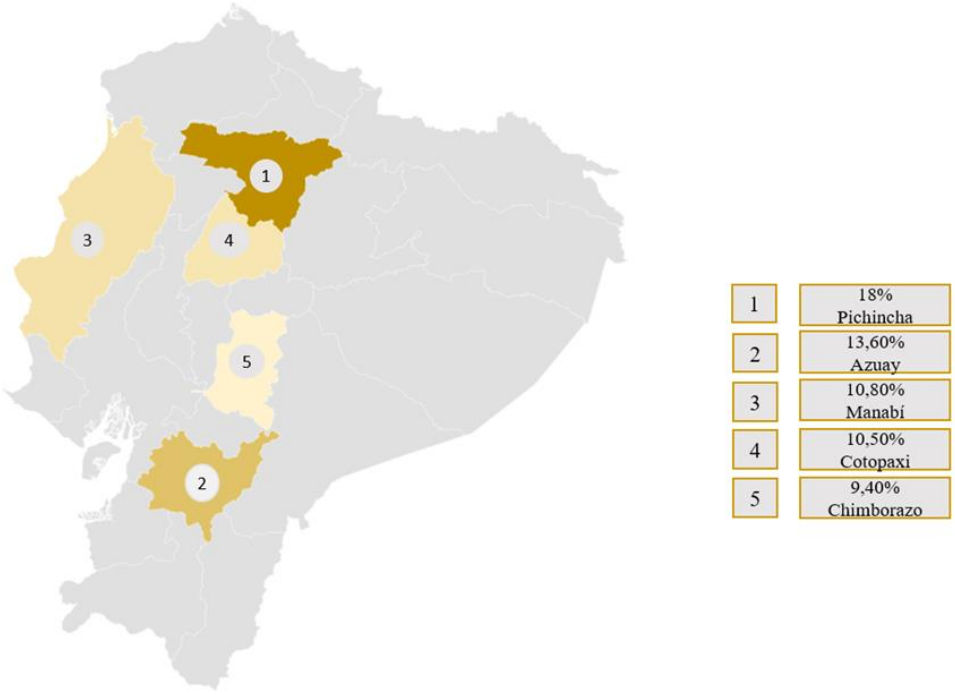
En el Ecuador el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN) a través de la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN:2594 define al lactosuero como "*el producto lácteo líquido obtenido durante la elaboración de queso, la caseína o productos similares, mediante la separación de la cuajada, después de la coagulación de la leche pasteurizada y/o los productos derivados de la leche pasteurizada"* (INEN, 2011).

La producción de lactosuero está estrechamente ligada a la elaboración del queso, en este sentido, la cultura gastronómica ecuatoriana se caracteriza por un constante consumo de queso, principalmente queso artesanal o queso fresco, aunque existen alrededor de 35 tipos de quesos y más de 300 marcas en el mercado local (Romero Betancourt, 2020), por lo que la producción de lactosuero en el país es bastante alta. En el Ecuador no hay estadísticas en cuanto a la producción de lactosuero, sin embargo, acorde a la encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua realizada en el 2020 por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC), la producción de leche en ese periodo fue de 6,15 millones de litros/día, concentradas principalmente en las provincias de la sierra: Pichincha, Cotopaxi, Chimborazo y Azuay. Manabí por su parte es la provincia de la costa donde se registra la mayor producción de leche (Figura 1). La provincia de Pichincha cuenta con la mayor producción lechera en el país, con una participación del 18 % de la

producción nacional (INEC, 2021). Se prevé que para el 2026 ocurra un incremento en la producción lechera en el país del 85 %, donde el 31,3 % se destinará a la producción de queso, lo que se convertirá en un problema ambiental, ya que en la actualidad más del 50 % del lactosuero resultante de la industria quesera es vertido al medio (OECD/FAO, 2016).

La Superintendencia de Control del Poder de Mercado (SCPM) reportó que del total de la leche producida en el país, se destina el 31 % a la producción quesera (SCPM, 2016), por lo que se estima que durante el 2020 hubo una producción de 1.75 millones de litros/día de lactosuero. Se ha reportado también que en la provincia de Cotopaxi se producen 498.043 litros diarios de leche, los cuales son destinados a la producción de queso en 18 fábricas procesadoras; de estas solo tres reutilizan el lactosuero para la producción de bebidas energéticas, mientras que las restantes lo descartan de forma inadecuada o es utilizado en la alimentación animal, donde el efluente de lactosuero es de aproximadamente 373.000 litros diarios (Cervantes et al., 2018).

Figura 1. *Provincias de mayor producción de leche en el Ecuador (%)*



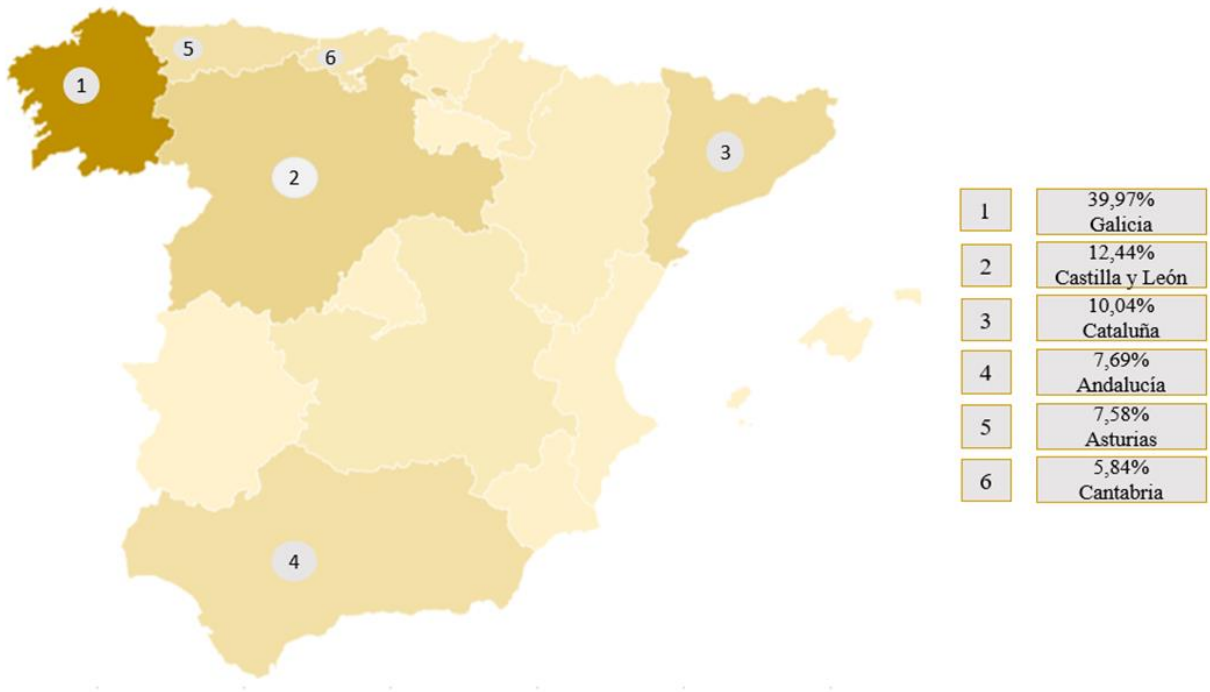
Nota: Adaptado de INEC, (2021)

Por otro lado, en el cantón Cayambe se produce 35 mil litros diarios de leche, de los cuales el 70 % es destinado a la fabricación de queso, y el lactosuero es utilizado como alimento para los animales de la zona, perdiéndose la oportunidad de aprovecharlo en la producción de alimentos alternativos para la población de esa localidad producto del desconocimiento de la valía nutricional que este tiene (De la Cruz et al., 2018).

2.3. Producción de lactosuero en España

En España por su parte, según el reporte presentado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), la producción de leche durante el año 2022 fue de 7.324.900 toneladas, de las cuales se destinaron a la fabricación de queso 187.400 toneladas, concentradas principalmente en seis comunidades autónomas (Figura 2), durante el último año MAPA, (2022); cifra que supone una producción de suero lácteo de 166.860 toneladas durante el mismo periodo.

Figura 2. *Comunidades autónomas de mayor producción de leche en España (%)*



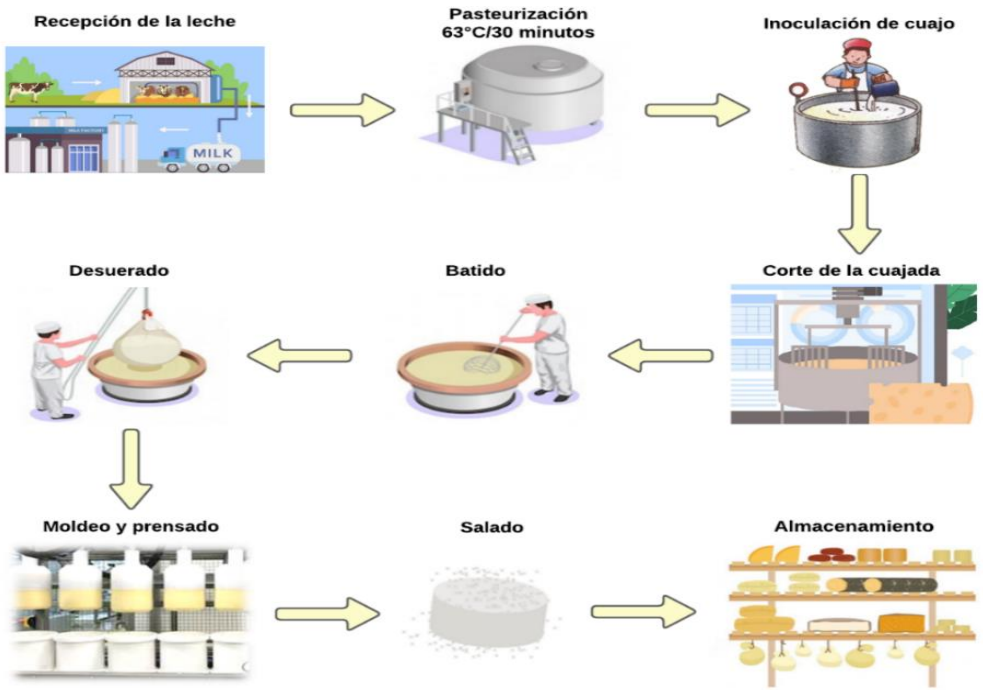
Nota: Adaptado de MAPA, (2022)

La mayor producción de leche y subproductos estuvo concentrada mayormente en las comunidades autónomas de Galicia, con una participación del 39,97 %, Castilla y León 12,47 %, Cataluña 10,04 %, Andalucía 7,69 % y Cantabria 5,84 %. A diferencia de Ecuador, España dirige sus investigaciones al mejoramiento y descubrimiento de nuevas propiedades, usos y aplicaciones del lactosuero estando a la par con las tendencias a nivel mundial.

2.4. Proceso tecnológico para la obtención de lactosuero

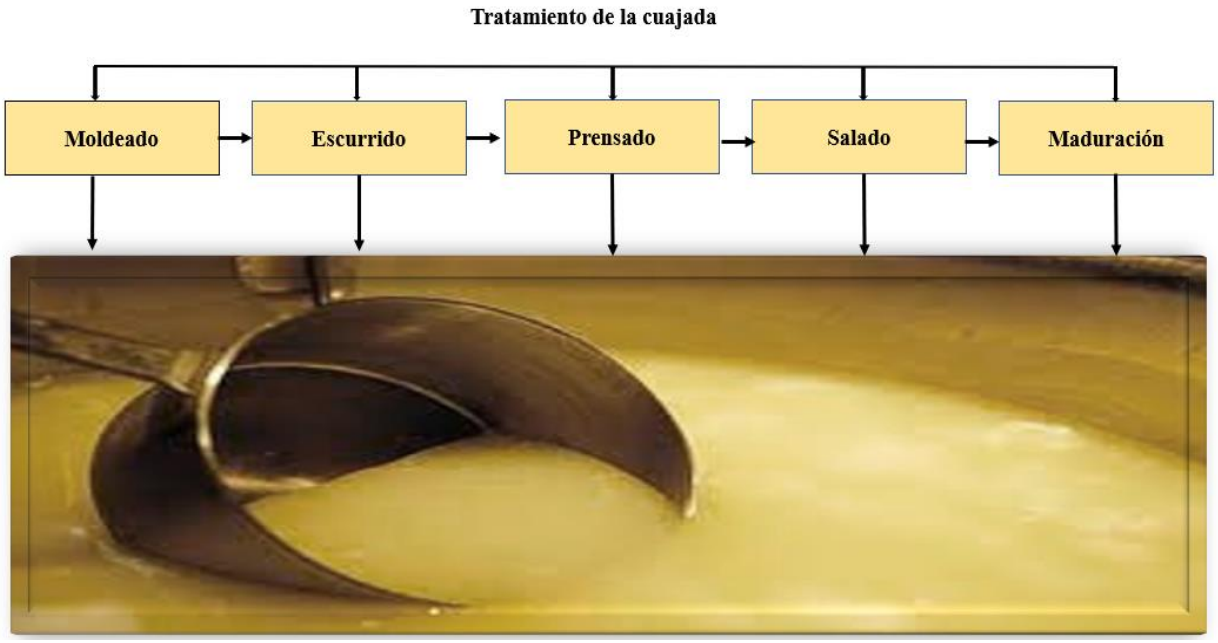
El lactosuero es un derivado de la fabricación del queso, por lo tanto, su obtención está íntimamente relacionada con la producción quesera. Existen diversos tipos de quesos y procesos tecnológicos por los cuales se puede obtener esta sustancia (Figura 3); sin embargo, todos los procesos consisten en la precipitación de la caseína por medio de coagulantes, lo que permite obtener la separación de gran parte de la fracción sólida y la fracción líquida en un proceso conocido como desuerado.

Figura 3. *Flujo de proceso de elaboración de queso*



La extracción del suero se produce en diferentes etapas: tratamiento de la cuajada, moldeado, escurrido, prensado, salado y en el caso de los quesos maduros, durante la fase de maduración (Figura 4), este proceso puede marcar distintos porcentajes de extracción según el tipo de queso (Veisseyre, 1988).

Figura 4. *Obtención de lactosuero*



Nota: Adaptado de: Del Castillo y Lagarriga, (2004).

2.4.1. Preparación de la leche

El inicio de la elaboración del queso comienza con la preparación de la leche, la que contempla una serie de tratamientos con la finalidad de homogeneizarla y estandarizar el proceso. Para el efecto se inicia con un filtrado para quitar cualquier sólido en suspensión no deseado, posteriormente se realiza el desnatado o adición de nata, con el propósito de obtener una proporción de grasa adecuada según el productor, seguido de la homogeneización de los glóbulos grasos y por último se continua con la pasteurización, la que por lo general se realiza a 72 °C durante 15 s o a 63-65 °C durante 30 min (Fernández-Regatillo, 1987; Reyes Herrera & Vergara Baldovino, 2016).

2.4.2. Coagulación de la caseína

En los procesos artesanales de la elaboración del queso se busca la coagulación de la caseína produciendo una especie de gel proteico, para ello se debe desnaturalizar por medio de agregación de ácidos orgánicos para aumentar la interacción de los iones de hidrógeno, o por medio de inoculación de bacterias lácticas para lograr transformar la lactosa en ácido láctico, afectando el pH y las modificaciones fisicoquímicas de las micelas de caseína. La coagulación también puede lograrse con la adición de enzimas específicas que, aunado al aumento de temperatura también provoca modificaciones en la estructura de las proteínas, acciones que desnaturalizan y precipitan en forma de gránulos la caseína y separan el suero de la fracción sólida.

2.4.2.1. Coagulación por acción enzimática

Este mecanismo se caracteriza por utilizar enzimas proteolíticas, entre estas se puede mencionar las de origen microbiano que están constituidas por varias proteinasas procedentes de *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus* y *Mucor miehei*; las proteinasas vegetales provienen de cardo (*Cynara cardunculus*, *Cynara humilis*) e higuera (*Ficus carica*). Sin embargo, las más estudiadas son aquellas excretadas del estómago de los rumiantes, como la quimosina, enzima específica para la caseína segregada por rumiantes recién nacidos y la pepsina, que se segrega en etapas de vida más avanzada y capaz de hidrolizar la inmonoglobulina del calostro (Del Castillo y Lagarriga, 2004); también puede emplearse pepsinas de los porcinos (Fernández-Regatillo, 1987).

Durante el proceso enzimático se suele utilizar la adición de cuajo líquido en proporciones que pueden ser de 0.01 % (p/v) el cual debe ser mezclado uniformemente para garantizar una reacción enzimática homogénea, esta mezcla debe reposar durante 45 min para que la reacción enzimática surta efecto y ocurra la formación del coágulo (Montesdeoca & Piloso, 2020). Se puede también agregar antes de la adición del cuajo diluido 0,01 % (p/v) $CaCl_2$ de 92 % pureza al 0,03 % (p/v), con esto se ejercerá un efecto estabilizador, mayor rapidez de coagulación, escurrimiento más rápido y un suero más claro según lo descrito por Molero-Méndez et al., (2017); también se utilizan concentraciones de $CaCl_2$ de 18 a 20 g/100 litros y una dosificación de quimosina de 2 a 3 g/100 litros (Huanca, 2017).

2.4.2.2. Coagulación ácido-láctica

Esta coagulación se produce por un descenso en el pH al añadir ácidos orgánicos, disminuyendo la carga eléctrica de las micelas de caseína, lo que impide la interacción con los iones de calcio, el cual se solubiliza con el fósforo, produciendo una desintegración de las micelas de caseína, despolimerizando la caseína α. El coágulo se obtiene cuando el pH llega al punto isoeléctrico, neutralizando las cargas eléctricas, ocasionando pérdida de la capa de hidratación y su posterior insolubilidad, en este punto, se forma un retículo proteico insoluble cuyos nudos son submicelas desmineralizadas con enlaces intermoleculares de naturaleza electroestática e hidrofóbica, de baja estabilidad. Esta clase de coagulación da lugar a lo formación del suero ácido.

2.4.2.3. Coagulación mixta

Como su nombre lo indica, este tipo de coagulación es un mecanismo que combina los mecanismos anteriores, sin embargo, al estar presente la disminución del pH, termina predominando el carácter ácido.

2.4.3. Corte de la cuajada

El corte de la cuajada es importante porque permite el aumento de la superficie contribuyendo así en la velocidad del desuerado y cantidad del lactosuero obtenido. Luego de este proceso se agita la cuajada ya cortada, con la finalidad de acelerar el proceso del desuerado y evitar la adherencia de granos. La agitación debe comenzar de forma lenta e ir aumentando la intensidad a medida que aumenta la densidad, consistencia del grano y la contracción de la cuajada (Fernández-Regatillo, 1987; González, 2019).

2.4.4. Sinéresis

La sinéresis es el proceso de exudación espontánea y constante del lactosuero, gracias a la aparición de enlaces secundarios entre las caseínas; durante el proceso, el lactosuero forma una envoltura líquida que permite que pueda ser decantado o filtrado para separarlo de la cuajada, a este proceso se le denomina desuerado. Durante este proceso se obtiene la mayor cantidad de suero entre 70 a 80 % del suero total. El proceso de exudación solo se da cuando hay intervención de enzimas que coagulen la paracaseína *k*, ya que cuando se realiza una coagulación ácido-láctica el

proceso de extracción del lactosuero debe ser por prensado, dado que los enlaces entre las caseínas son débiles. Estudios han reportado que la velocidad del desuerado está sujeta a una combinación de diversas variables, entendiendo por velocidad del desuerado, como una medida en función de la variación del tiempo de la humedad de la cuajada. En este aspecto, el tiempo de floculación está influenciado significativamente por la concentración de las enzimas adicionadas, y en menor medida por la disminución del pH y aumento en la temperatura, en donde la sinéresis muestra un modelo exponencial, mostrando una correlación entre el pH y la concentración del calcio (Pauletti et al., 2005).

2.4.5. Aumento de la temperatura para acelerar el desuerado

Para acelerar el proceso de desuerado se recomienda elevar la temperatura 2 o 3 °C por encima de la temperatura de la coagulación, esto ayudará a la formación de enlaces intermoleculares, haciendo el suero menos viscoso, además de evitar que la cuajada se mezcle con el lactosuero nuevamente. La temperatura debe mantenerse en un rango de 20 a 55 °C y se debe aumentar gradualmente en 1 °C por minuto, de lo contrario podría formarse una película impermeable alrededor de la cuajada que evitará la exudación del lactosuero (Del Castillo & Lagarriga, 2004; Weber, 1990).

2.4.6. Moldeado y prensado

Las cuajadas enzimáticas que han sido fuertemente desueradas en cubas pasan a ser presionadas en los moldes para terminar de expulsar el suero que les haya quedado. La sinéresis ejerce una presión muy baja, de apenas 1 Pa, por lo que en ocasiones también se debe ejercer presión mecánica de hasta 24,5 KPa (Weber, 1990).

2.4.7. Salado

Para terminar de extraer el lactosuero se debe añadir del 1 al 2 % del peso total del queso en sal (NaCl), este procedimiento además de contribuir con la palatabilidad también favorece la exudación del suero. El proceso puede ser llevado a cabo durante el escurrido, en la cuba o después del moldeado, en el caso de quesos frescos, frotando la cuajada con las manos. Luego se adiciona la sal cuando la cuajada se encuentra cortada en cuba, gran parte de la sal queda en el lactosuero,

afectando las características fisicoquímicas de este, caso similar ocurre cuando se busca extraer el lactosuero por medio de inmersión en salmuera (Fernández-Regatillo, 1987).

El 58 % del suero producido se obtiene directamente de las tinas, mientras que el 33 % del filtrado, y el 8 % es conseguido una vez que se encuentra en el molde (González, 2019). Una vez obtenido el lactosuero en las distintas etapas de la elaboración del queso es recomendable que sea centrifugado con la finalidad de eliminar restos de grasa y caseína coagulada sobrantes para evitar contaminantes en las operaciones de extracción de las proteínas. De igual manera, es recomendable pasteurizarlo a una temperatura de 72 °C por 15 segundos para inactivar la acción enzimática del cuajo (Cantón, 2016).

2.5. Aprovechamiento del suero de quesería

La elaboración del queso requesón o queso de suero, que es un tipo de queso similar al queso Ricotta, fue uno de los primeros métodos para la recuperación de la proteína sérica a través de procesos artesanales que consisten en cambios térmicos combinados con acidez como agentes desnaturalizantes de la proteína resultando ser un proceso alternativo y económico para la recuperación de la proteína del lactosuero (Shelke et al., 2022).

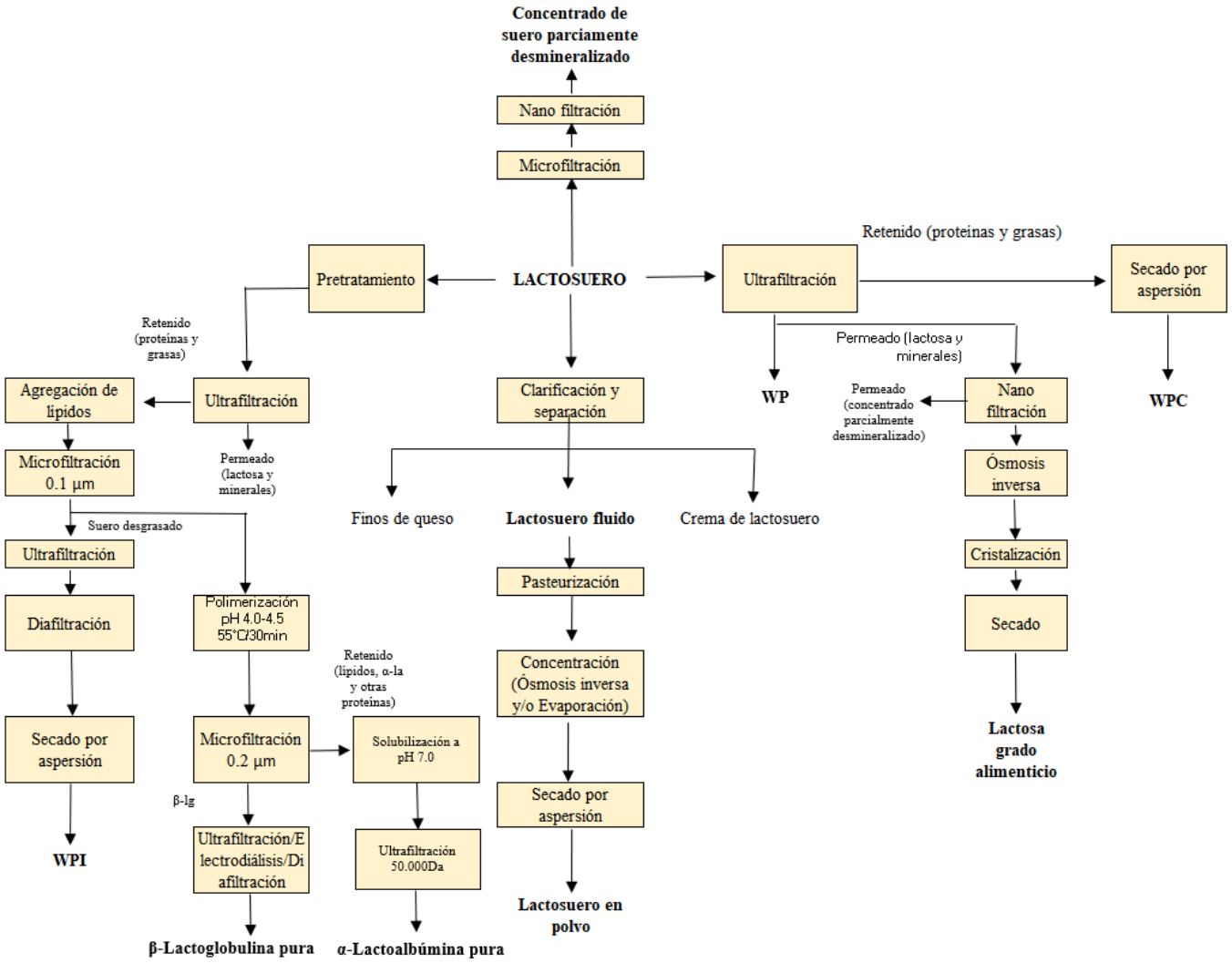
Los primeros procesos industriales empleados en la recuperación y concentración del lactosuero iniciaron hace más de un siglo, en 1920, cuando se implementaron los métodos de secado por calor y por aspersión; sin embargo, el primero resultaba ser un método caro y el segundo, aunque económico, debido a la degradación térmica, afectaba la proteína (Ramos et al., 2021). La finalidad de estos métodos era la deshidratación y obtención de lactosuero en polvo, el que puede ser deslactosado obtenido a través de un proceso de cristalización de la lactosa, lactosuero en polvo desmineralizado. Estos derivados del suero de menor concentración de proteínas son componentes importantes en la elaboración de fórmulas infantiles (Kelly, 2022).

Debido al contenido de minerales y ácido láctico del suero es recomendable la precristalización de la lactosa antes del proceso de secado, ya que esto evita que las partículas de suero se adhieran a la superficie del equipo y reduzca el rendimiento del producto, por lo tanto, realizar la filtración y precristalización de la lactosa es fundamental antes de los procesos de aspersión para mejorar la calidad del suero en polvo (Ozel et al., 2022).

En la elaboración y revalorización del lactosuero existen otros procesos que surgieron alrededor de la década de los 70 del pasado siglo. Estos procesos involucran mayor tecnología, a través de la

cual pueden obtenerse productos más puros y de mayor valor; entre estos se encuentran los procesos de filtración por membranas semipermeables a partículas de tamaños específicos; mediante este proceso las membranas funcionan como barreras selectivas por el tamaño de los compuestos de la leche dividiendo el suero en permeado (filtrado) y concentrado (retenido) (Wen-qiong et al., 2019). Este proceso permite excluir los lípidos y microrganismos residuales sin alterar la estructura nativa de la proteína (Baldasso et al., 2011). La Figura 5 muestra a manera de resumen el procesamiento para la obtención de derivados a partir del lactosuero.

Figura 5. *Procesamiento para la obtención de derivados del lactosuero*



Nota: Tomado de Ramírez et al., (2018)

Los métodos anteriores son relativamente fáciles de operar, con una buena rentabilidad gracias a los productos de alta calidad que pueden sustituir métodos convencionales (Ramos et al., 2015). Existe una gran variedad de productos finales dada la variedad de métodos creados (Tabla 2), entre los principales se puede mencionar: microfiltración, nanofiltración, ultrafiltración, ósmosis inversa; de igual forma, se pueden reconocer otros métodos utilizados con menos frecuencia en la industria, como: electrodiálisis, permeación de vapor, contactores de membrana y la pervaporación (Saxena et al., 2009).

Tabla 2. *Métodos empleados para la concentración de proteínas de suero*

Método	Peso molecular	Componentes seguros
Osmosis inversa	<0,1 kDa	Todo, menos agua
Nanofiltración	<0,1-1 kDa	Todo, excepto el agua y algunos iones
Ultrafiltración	<1-100 kDa	Proteínas, lípidos, bacterias
Microfiltración	<100 -500 kDa	Lípidos, bacterias, proteínas de alto peso molecular

Nota: Tomado de Teniza, (2008)

Las técnicas más eficientes para la purificación de las proteínas del suero son la cromatografía de afinidad, interacción hidrofóbica y técnicas de intercambio iónico, sin embargo, los procesos de control son complejos, puede presentarse obstrucción o ensuciamiento y los ciclos son largos prolongando el tiempo de aislamiento (Urtasun et al., 2018). La cromatografía es una técnica biofísica que permite el aislamiento, identificación y purificación de las proteínas que componen el suero, diferenciándolo según su tamaño, forma, hidrofobicidad y capacidad de enlace (Priyadarshini et al., 2016).

Se han desarrollo otras técnicas avanzadas y eficientes, aunque las técnicas de membrana y de cromatografía son consideradas como las más apropiadas para el aislamiento de las proteínas del suero. Mediante la filtración seguida de secado por aspersión se puede obtener concentrado de proteínas de suero (WPC por sus siglas en ingles de “whey protein concentrate”) de 35-80 % de proteína; mientras que con la filtración por membrana, combinada con la cromatografía de intercambio iónico, se consigue un aislamiento de proteína de suero (WPI por sus siglas en ingles de “Whey Protein Isolate”) de 90 % (Panghal et al., 2018; Schuck, 2002). En este sentido se puede obtener diversos porcentajes de pureza y concentración de proteínas; cuando el contenido del polvo

de proteína es ≥25 %, se denomina concentrado de proteína de suero (WPC). Los productos de WPC más comunes son los de 34 %, 50 % y 80 %, pero los productos de mayor concentración son los aislados de proteína de suero (WPI), con una pureza ≥90 %.

2.6. Composición nutricional del lactosuero

El lactosuero contiene una amplia gama de nutrientes de alto valor nutricional y con actividades biológicas, (Figura 6). Entre estos componentes se puede mencionar la materia nitrogenada, la cual representa el 20 % del nitrógeno de la leche, incluye las proteínas del suero, el nitrógeno no proteico y numerosos péptidos. El 50 % del nitrógeno que se encuentra en el lactosuero forma parte de una fracción conocida como Nitrógeno No Proteico (NPN por sus siglas en inglés) ((Rocchetti & O'Callaghan, 2021). Se ha categorizado esta fracción como un nitrógeno soluble de poco valor nutricional y sus componentes son de bajo peso molecular, como el ácido hipúrico y orótico, *N* - acetilamino-hexosas, urea, ácido úrico, amoníaco, creatinina, colina, aminoácidos libres, aminas biogénicas y otros péptidos menores (Cataldi et al., 2003; Magan et al., 2019; Ramos et al., 2015; Tienstra et al., 1992).

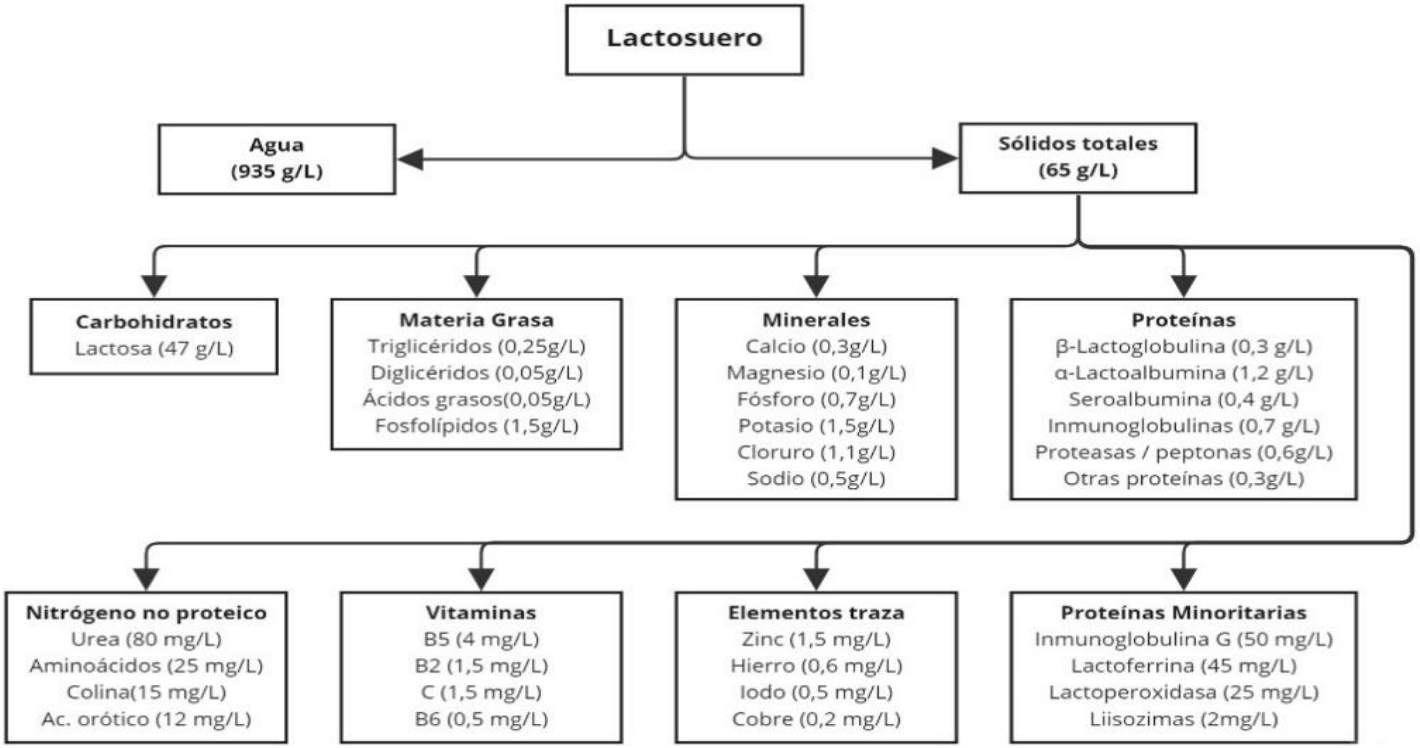
El perfil nutricional del lactosuero no está del todo establecido ya que este puede variar por factores intrínsecos del animal (genéticos, de salud, de nutrición, así como la etapa de lactancia) y por factores extrínsecos del tratamiento tecnológico empleado para su obtención (Tabla 3).

Tabla 3. *Composición nutricional de diferentes tipos de suero de leche*

Tipo de Suero	Proteína (%)	Lactosa (%)	Grasa (%)	Ceniza (%)	Humedad (%)
Suero en polvo	11 - 14,5	63 - 75	1 - 1,5	8,2 - 8,8	3,5 - 5,0
Reducido en lactosa	18 - 24	52 - 58	1 - 4	11 - 22	3 - 4
Desmineralizado	11 - 15	70 - 80	0,5 - 1,8	1 - 7	3 - 4
WPC-34	34 - 36	48 - 52	3 - 4,5	6,5 - 8,0	3 - 4,5
WPC-50	50 - 52	33 - 37	5 - 6	7,5 - 8,5	3,5 - 4,5
WPC-80	80 - 82	4 - 8	4 - 8	3 - 4	3,5 - 4,5
WPI	90 - 92	0,5 - 1,0	0,5 - 1,0	2 - 3	4,5

Nota: Tomado de Anon, (2001)

Figura 6. *Composición nutricional media del lactosuero*



Nota: Tomado y modificado de Muset y Castells, (2017)

2.6.1. Fracción proteica

Las proteínas del suero (WP, del inglés "whey protein"), consideradas también como proteínas séricas o proteínas lácteas solubles, ya que forman parte de los residuos solubles, en el proceso posterior a la coagulación de la caseína, resultan ser la fracción más valiosa del suero, lo que afecta a aspectos económicos y tecnológicos gracias a sus propiedades nutricionales y funcionales. Se entiende el término de proteína de suero como la proteína no asociada a la micela de la caseína y que incluyen GMP lo que las hace diferir de las proteínas de la leche (De boer, 2014). Las principales proteínas séricas son la β-lactoglobulina (β-LG) y la α-lactoalbúmina(α-LA), que representan el 70 % de las proteínas en el lactosuero y no se ven afectadas por la acción del cuajo ni del ácido. La más abundante es la β-LG, que representa más del 50 % del total de las proteínas presentes en el lactosuero (Broersen, 2020). Esta proteína presenta dos isoformas, la β-lactoglobulina A (β-LG-A) y la β-lactoglobulina B (β-LG-B) (Ding et al., 2011). La segunda proteína sérica más abundante es la α-LA.

El lactosuero posee otras proteínas en menor proporción, pero de igual importancia nutricional. En el primer grupo se encuentran las inmunoglobulinas (Ig) (siendo la más abundante la IgG), la albúmina sérica y la lactoferrina, mientras que las inmunoglobulinas A y M, lactoperoxidasa y osteopontina constituyen un tercer grupo (Kruger et al., 2006; O'Riordan et al., 2014). La lisozima y aquellas unidas a folato forman parte de un grupo menor junto con otras 900 proteínas identificadas, aunque poco estudiadas (Tacoma et al., 2016).

Las proteínas del lactosuero son altamente valoradas debido a su abundancia de aminoácidos esenciales (Tabla 4) y su fácil digestibilidad. Estas características les otorgan una gran importancia y versatilidad en diferentes aplicaciones dentro de la industria alimentaria (Sánchez, 2016). Además, se ha demostrado en numerosas investigaciones que los aminoácidos del lactosuero pueden tener beneficios para la salud, lo que los convierte en un componente altamente apreciado y estudiado (Burd & Phillips, 2010; Caldwell, 2016; Parra, 2009). En las proteínas séricas existe gran concentración de L-leucina, L-valina y L-isoleucina en comparación con otras fuentes de proteínas. Estos aminoácidos de cadena ramificada son especialmente notables porque se absorben rápidamente en el torrente sanguíneo (Cintineo et al., 2018; Goulart et al., 2014).Tienen además un contenido considerable de triptófano, aminoácido esencial que participa en la regulación

positiva de los genes de factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I) (Melnik et al., 2013; Thissen et al., 1994).

Tabla 4. *Aminoácidos esenciales presentes en el lactosuero (g/100g de proteína)*

Aminoácido	Lactosuero	Huevo	Recomendado (FAO)
Treonina	6,2	4,9	3,5
Cisteína	1,0	2,8	2,6
Metionina	2,0	3,4	2,6
Valina	6,0	6,4	4,8
Leucina	9,5	8,5	7,0
Isoleucina	5,9	5,2	4,2
Fenilalanina	3,6	5,2	7,3
Lisina	9,0	6,2	5,1
Histidina	1,8	2,6	1,7
Triptófano	1,5	1,6	1,1

Nota: Tomado de Parra, (2009)

La leucina juega un papel crucial en la activación de la síntesis de proteínas posprandial, siendo digerida rápidamente lo que resulta beneficioso para mejorar la sarcopenia al conservar la masa muscular en adultos y ancianos. por otro lado el aumento del consumo de este aminoácido también contribuiría a la pérdida de peso funcionando como un suplemento en las dietas bajas en calorías (Devries et al., 2018; Moon et al., 2020).

La presencia de estos aminoácidos indispensables en el suero es crucial para la síntesis y regeneración de tejidos, así como para el apoyo de procesos metabólicos fundamentales. La asimilación eficiente de estos aminoácidos esenciales contribuye a la formación de enzimas, hormonas y tejidos estructurales, impulsando la salud y el bienestar general.

Por esta razón, se establece que la fracción de proteínas presente en el suero exhibe una calidad biológica superior y contiene un elevado nivel de aminoácidos esenciales de fácil digestión, como se determina mediante el índice DIAAS (Digestible Indispensable Amino Acid Score, por sus siglas en inglés). No obstante, es importante señalar que estas composiciones nutricionales pueden variar en función de los métodos empleados para su obtención. El suero en sí posee un índice

DIAAS superior a 100. Sin embargo, los productos derivados muestran valores ligeramente inferiores, rondando alrededor del 90.

En las distintas presentaciones de suero, se observan disparidades en el índice DIAAS debido a sus procesos de obtención. El aislado de proteína de suero presenta el índice DIAAS más alto, alcanzando un valor de 125, mientras que el concentrado de proteína de suero exhibe un rango de índice DIAAS que oscila entre 110 y 134 (Herreman et al., 2020).

La concentración de las proteínas presentes en el suero de leche no son estándares, ya que la variabilidad de estas depende de diferentes factores desde la alimentación del animal, la raza hasta la elaboración del queso y los métodos de aislamiento y medición. Uno de los estudios más completos en cuanto a las características de las proteínas presentes en el lactosuero fueron los de Morr & Foegeding, (1990) y de Wit et al., (1988), los que estudiaron las concentraciones de las distintas proteínas, peso molecular y punto isoeléctrico, (Tabla 5) como se reporta en Anon (2001). Trabajos más recientes como el de Chen et al., (2023) se centraron en evaluar cómo las condiciones ambientales tales como la temperatura, la fuerza iónica, el pH y algunos agentes exógenos podrían ser los responsables de modificar el tamaño, la solubilidad y la carga de las proteínas séricas; concluyéndose que el tratamiento con membranas permite la obtención de fracciones proteicas de alta calidad.

Tabla 5. *Proteínas del lactosuero*

Proteína	Abundancia	Peso Molecular (g/mol)	Punto Isoeléctrico
β-lactoglobulina	48	18,400 - 36.900	5,2
α-lactoalbúmina	19	14,200	5,1
Proteosa peptona	20	4,000 - 80,000	5,1 - 6,0
Albúmina sérica	6	69,000	4,8
Inmunoglobulinas	8	160,000	5,5 – 6,8

Nota: Tomado de Anon, (2001)

2.6.1.1. β-lactoglobulina

β-lactoglobulina (β-LG) es la proteína más abundante en la leche de los rumiantes como vacas, cabras, ovejas y búfalos (Oftedal, 2013), tiene una variación entre especie de 0,6 a 16,2 mg/ml

(Sawyer, 2003); es un polipéptido de 18,3 kDa y contiene 162 aminoácidos; en su estructura tiene similitud con la proteína que se une al retinol plasmático y pertenece al grupo de las lipocalinas extracelulares y a la familia de las calicinas (Broersen, 2020). Comprende el 10 % de la proteína total de la leche y aproximadamente del 50 al 58 % de las proteínas del lactosuero (Swaisgood,1989). Es buena fuente de aminoácidos esenciales; rica en leucina que interviene en el anabolismo muscular y reduce el riesgo de sarcopenia (Goulding et al., 2020). β-LG se produce naturalmente como un dímero unido de forma no covalente, dimerización que juega un papel fundamental en la determinación de la afinidad de esta proteína por los ligandos (Broersen, 2020). Debido a su forma globular β-LG es resistente a la acción enzimática del cuajo, así como a sustancias ácidas, esto sugiere que debe tener una función biológica específica, y aunque se le han atribuido diversas funciones aún no hay acuerdo único, no obstante, se sabe que su función nutricional es proporcionar aminoácidos azufrados y de cadena ramificada, teniendo beneficios sobre el sistema inmunológico; puede unirse a ácidos grasos, lo que estimula la actividad de la lipasa; así mismo, puede unirse a minerales que transporta a través de las paredes intestinales (Deeth y Bansal, 2019; García-Garibay et al., 2008). En este sentido, se ha reportado recientemente que la β-LG protege de la oxidación al retinol durante su paso por el estómago y lo ayuda a la absorción en los intestinos (Tsermoula et al., 2021). Tambien puede unirse al colesterol y a la vitamina D 2 en su cavidad hidrofóbica por lo que se ha reportado el transporte de estos como una posible función biológica de β-LG (Broersen, 2020).

2.6.1.2. α-lactoalbúmina

Esta proteína constituye el 3,5 % de la proteína total de la leche y el 20 % de la proteína del suero con una concentración de 1,2 a 1,5 mg/ml, convirtiéndose en la segunda proteína más abundante e importante del lactosuero después de la β-lactoglobulina en bovinos, pero la primera en leche humana cuya función es contribuir con la lactosa sintetasa en la biosíntesis de la lactosa (Layman et al., 2018; Tsermoula et al., 2021). La α-LA es una proteína globular que tiene un peso molecular de 14 kDa (Hernández-Ledesma et al., 2011). Está formada por 123 aminoácidos con 8 residuos de cisteína, 4 de triptófano y es buena fuente de lisina; es rica también en aminoácidos de cadena ramificada (BCAA), leucina, isoleucina y valina. El perfil de aminoácidos de α-LA permite su eficacia en tratamientos terapéuticos de enfermedades como la sarcopenia y el cáncer (Barone et al., 2020; Deeth & Bansal, 2019; Layman et al., 2018).

Se ha reportado que la α-LA tiene dos sitios de unión para Ca^{2+} y que puede mejorar la absorción de zinc, además que los péptidos liberados tras la digestión son afines al hierro y que en células Caco-2 los complejos péptido-hierro pueden ser precursores de la absorción de hierro (Wang et al., 2014).

La α-LA es la proteína que posee los mayores beneficios nutricionales de las proteínas del suero Tsermoula et al.,(2021); comparte el 72 % de la secuencia de aminoácidos de la α-LA presente en el suero de la leche humana; similitud que la hace de gran valía en el desarrollo de fórmulas infantiles, en las que su incorporación permite satisfacer el requerimiento nutricional, acercándolas a la leche materna; se ha comprobado además a través de ensayos clínicos la mejora sustancial en la digestibilidad, la disminución en alergias, el mejoramiento en la flora intestinal y la regulación de la serotonina como promotora del sueño en adultos mayores (Barone et al., 2020; Layman et al., 2018).

Por otra parte, la inclusión de α-LA en el desarrollo de alimentos ha permitido mejoras sustanciales en la funcionalidad de los productos formulados en cuanto a la viscosidad, la estabilidad térmica y en la reducción de las interacciones proteína-proteína (Buggy et al., 2017; Crowley et al., 2016).

2.6.1.3. Albúmina sérica o Albúmina de suero bovino

Esta proteína, a pesar de estar entre las proteínas de la leche, no es sintetizada en la glándula mamaria, sino que del torrente sanguíneo entra de forma pasiva a la leche. Su concentración en la leche es de 0,4 mg/ml representando el 1,5 %, y el 6 % en el suero de leche; se encuentra constituida por 583 aminoácidos (Hirayama et al., 1990; Peters, 1985).

2.6.1.4. Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas al igual que la albúmina sérica, no se sintetizan en la glándula mamaria, sino que entran a la leche de forma pasiva a través de los conductos de la glándula jugando un papel fundamental en la inmunología de los terneros (Tabla 6). La Ig constituye el 2 % de la proteína de la leche y puede conseguirse en 4 formas distintas, donde todas comparten la misma estructura, compuesta por dos cadenas de bajo peso molecular 20 a 25 kDa y dos cadenas más pesadas de 50 a 70 kDa (Li-Chan, 2004). Las $IgG_{1\ y\ 2}$, IgA y IgM son las formas principales, donde IgG son

monómeros de 160 kDa, IgA son dímeros o tetrámeros de 370 kDa y IgM son pentámeros de 900 a 1000 kDa (Deeth y Bansal, 2019).

Tabla 6. *Inmunoglobulinas séricas*

Descripción	LgG (I)	IgA	IgM
Peso molecular (KDa)	160	320	960
Constante de sedimentación (s)	7	11	19
Glúcidos (%)	3	8	11
Cadena H característica (2)	Y	α	μ
Papel biológico principal	Anticuerpos	Grupo sanguíneo	Isoaglutininas

Nota: Tomado de Mehra et al., (2006)

Las Ig son glicoproteínas de estructuras moleculares complejas con carbohidratos unidos constantemente a regiones C-terminal en las cadenas pesadas, donde las cadenas ligeras IgG están unidas por enlaces de disulfuro y las cadenas pesadas unidas por enlaces de disulfuro a las cadenas ligeras, resultando moléculas en forma de Y (Deeth y Bansal, 2019).

Existen muchas más enzimas y proteínas de baja concentración en la leche y suero. Con la finalidad de incluirlas y para fácil comparación se presentan en la Tabla 7, donde pueden verse algunas características generales.

Tabla 7. *Resumen de compuestos proteicos minoritarios en el lactosuero*

Proteína	Peso molecular / # aminoácidos	Concentración	Tipo de proteína	Estabilidad al calor	Punto Isoeléctrico
Lactoferrina	80.000/689	20-500 mg/L	Metaloproteína glicosilada	Estable al calentamiento a pH 4.0 y 90ºC por 5 min	8,7
Osteopontina	29.283/262 Migra como 60.000 en electroforesis debido a glicosilación	18-22 mg/L	Proteína glicosilada, fosforilada	Estable al calentamiento en 95ºC por 30 minutos	4,3
GMP	6.755-10.000/64 Da (teórico); 20.000 50.000 Da (aparente por filtración en gel)	Baja Concentración natural en la leche (≈4	Mezcla de proteínas no glicosiladas, no fosforiladas	Estable al calor	≤ 4,0

		mg/L); 20-25 g/100 g proteína en suero de queso	y glicosiladas y fosforiladas		
Lactoperoxidasa	78.030/612	30 mg/L/ 0,73 U/mL	Metaloproteína glicosilada	Sobrevive HTST, inactivado en 78ºC durante 15 s	5-6
Lisozima	18.000/154	< 3 mg/L mucho más bajo que en la leche humana, de caballo y de burra/ 2,03 U/mL	Cadena polipeptídica única	75 % de supervivencia en 80ºC durante 15 s; más estable a pH 3-4 que a ≥ 7	7,5
Sistema de catepsina D	Catepsina madura D:39.000/346; procatepsina: 45.000, 46.000/474; pseudocatepsina activa, 43.000/473; cadena pesada madura, 31 000/245 y cadena ligera madura, 13 000-14 000/ 99	0,4 mg/L	Glicoproteína, enzima aspártica	8 % sobrevive HTST, inactivado a 70ºC por 10 min	3,4
Fosfatasa ácida	42.000 (una fosfatasa ácida minoritaria de Mr 37.000 ha sido aislada de una fracción rica en lactoferrina)	0,13 U/mL^{-1}	Una glicoproteína básica	80-90 % sobrevive a la pasteurización, 63ºC durante 30 min; inactivado en 88ºC por 10 min o 100ºC por 1 min	4
Ribonucleasa	A: 13.700/B: 14.700 6 300/125	11-40 mg/L /32 U/mL	B es una glicoproteína, A no contiene carbohidratos	En leche: 40 % de pérdida a 80ºC durante 15s; estable en suero ácido pH 3.5, a 90ºC por 20 min	7,0-7,5

Nota: Tomado y modificado de Deeth y Bansal, (2019)

2.6.2. Carbohidratos

La lactosa constituye uno de los componentes principales del suero dulce, representando aproximadamente el 70 % de los sólidos totales presentes en este. Desde el punto de vista químico la lactosa es un disacárido constituido por glucosa y galactosa mediante enlace β-glucosídico y es muy apreciado por la industria de alimentos. La lactosa favorece la salud intestinal al ser aprovechada por la microbiota como fuente de carbono. Su fermentación genera ácidos grasos de cadena corta, que reducen el pH del intestino, creando un entorno desfavorable para las bacterias patógenas. Esta acidificación intestinal también beneficia la absorción óptima de minerales como el calcio, el magnesio y otros nutrientes. La lactosa, con un dulzor del 20-30 % menor que la sacarosa, es un carbohidrato ideal en fórmulas infantiles y tiene aplicaciones en alimentos para bebés, así como en varios productos lácteos al igual que en la confitería y la panadería (Paterson, 2022). Aunque se usa en la industria farmacéutica como excipiente y agente portador, la intolerancia a la lactosa limita su uso en suplementos nutricionales. Sin embargo, la demanda de lactosa por parte de las industrias alimentaria y farmacéutica aún es insuficiente para absorber toda la lactosa del suero disponible en todo el mundo (Kareb & Aïder, 2019). En la actualidad, la transformación de la lactosa en productos de alto valor añadido se percibe como un desafío notable.

En la industria alimentaria, la lactosa se utiliza como un sustrato clave para la producción de oligosacáridos que actúan como prebióticos. Aunque muchos estudios y patentes se han centrado en la obtención de galactooligosacáridos (GOS) específicos a partir de la lactosa mediante la reacción enzimática conocida como transgalactosilación, estos no reflejan los oligosacáridos naturalmente presentes en la leche bovina producida en las glándulas mamarias de las vacas lactantes (Albayrak & Yang, 2002; Goulas et al., 2007; Splechtna et al., 2007). Se ha observado que algunos microorganismos utilizados en la elaboración de queso también pueden ser fuentes de enzimas con actividad transgalactosilasa, lo que sugiere la posibilidad de que se formen GOS durante el proceso de producción de queso. Sin embargo, los GOS producidos por la transgalactosilación enzimática de la lactosa están compuestos únicamente por unidades de galactosa y glucosa, careciendo de características típicas de los oligosacáridos de la leche bovina, como la presencia de N-acetilhexosamina (N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina) y ácido siálico. Aunque se han llevado a cabo varios intentos para concentrar y aislar los sialiloligosacáridos que se encuentran de manera natural en el suero de la leche (Pelletier et al.,

2004; Sarney et al., 2000; Sprenger et al., 2010), la falta de estándares comerciales disponibles para los oligosacáridos presentes en la leche bovina y las dificultades técnicas asociadas con el análisis de componentes poco abundantes, utilizando técnicas como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), que depende en gran medida de compuestos de referencia, ha complicado la identificación precisa del número y tipo de monosacáridos que conforman estos sialiloligosacáridos en el suero (Barile et al., 2009).

2.6.3. Grasa y perfil de ácidos grasos

La composición de la grasa láctea está determinada por varios factores, como las variaciones estacionales, la alimentación del animal, la fase de lactancia y la tecnología utilizada durante el proceso productivo, por lo que el perfil de ácidos grasos del lactosuero está influenciado por el tipo de queso del que se origina (Anankanbil et al., 2018). El lactosuero contiene aproximadamente un 0,5 % (p/v) de grasa. Los lípidos que conforman la grasa del suero están constituidos por un 66 % de lípidos no polares, principalmente triacilgliceroles y diacilgliceroles, y el resto de lípidos polares, principalmente fosfolípidos distribuidos en fosfatidiletanolamina (38,5 %), esfingomielinas (32,6 %), fosfatidilcolina (14 %), fosfatidilserina (9,6 %) y fosfatidilinositol (5,2 %) (Ferreiro & Rodríguez-Otero, 2018). Es de interés esta fracción de lípidos polares por sus beneficios en el neurodesarrollo y rendimiento cognitivo de los lactantes gracias a la gran cantidad de esfingomielinas que contribuyen además a la defensa contra infecciones (Timby et al., 2015; Verardo et al., 2017). El perfil de ácidos grasos del lactosuero ha sido poco estudiado, las investigaciones se han centrado mayoritariamente a la fracción proteica, sin embargo, se ha informado que la grasa del lactosuero tiene mayor contenido de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), poliinsaturados (AGPI) y de cadena larga que la grasa de la leche (Brożek et al., 2022). En este sentido, se ha reportado que el contenido de ácidos grasos saturados (AGS) en la leche de vaca representa aproximadamente el 70-75 % (Ortega-Pérez et al., 2013). La proporción mayor está en el ácido palmítico (C16:0) y el ácido esteárico (C18:0). En cuanto a los AGMI, el ácido oleico (C18:1 n9) se encuentra en mayor proporción (Muncan et al., 2021). Es conocido que los AGMI, especialmente el oleico, disminuyen el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares por lo que la ingesta a través de la dieta es de interés para la salud.

2.6.4. Minerales

El lactosuero es una buena fuente de minerales, como calcio, zinc, hierro, cobre, manganeso, fósforo, sodio y potasio. Los más abundantes son el potasio (1g/L), fósforo (0,7 g/L), calcio (0,6 g/L), sodio (0,3 g/L) y magnesio (0,17 g/L), valores que pueden variar según el tipo de suero. El lactosuero ácido es más rico en Ca y Mg que el lactosuero dulce (Mazorra-Manzano & Moreno-Hernandez, 2019; Smith et al., 2015).

El 90 % de los minerales presentes en la leche quedan retenidos en el lactosuero tras la elaboración del queso, constituyendo del 8-10 % de los sólidos totales. En el lactosuero los minerales cumplen una función estabilizadora y electrostática de las proteínas, por lo que se encuentran en forma ionizada.

Se ha evidenciado que el calcio proveniente del lactosuero se encuentra más biodisponible en comparación con otras fuentes comerciales ya que contiene factores que potencian su absorción intestinal, como la lactosa, el fósforo, algunos aminoácidos y compuestos bioactivos (Muset & Castells, 2017). También se ha reportado la presencia de zinc y elementos traza como el selenio (Guefai et al., 2022). Se ha observado además que el lactosuero proveniente de la elaboración del queso fresco es el que posee mayor concentración de calcio, fósforo y magnesio, mientras que las menores concentraciones de estos mismos elementos se encuentran en el lactosuero del queso madurado (Reyes et al., 2002).

2.6.5. Vitaminas

Otro grupo de micronutrientes de importancia en el lactosuero son las vitaminas hidrosolubles de la leche, como las del complejo B (Barth & Behnke, 1997; Glass & Hedrick, 1977) (Tabla 8); en este sentido, el alto contenido de riboflavina y cianocobalamina incluso supera en gran medida a la dosis diaria recomendada promedio para los diferentes grupos etarios de 1,68 µg para B12 y de 1,28 mg para B2 (Pérez Ríos & Ruano, 2004).

Tabla 8. *Vitaminas del grupo B presentes en el lactosuero (concentración/100g)*

Vitaminas	Lactosuero dulce	Lactosuero ácido
Tiamina (B1)	0,51 mg	0,49 mg
Riboflavina (B2)	2,14 mg	1,85 mg
Biotina (B7)	43 µg	35 µg
Acido pantoténico (B5)	11,5 mg	11,4 mg
Piridoxina (B6)	0,59 mg	0,62 mg
Cianocobalamina (B12)	2,4 µg	2,5 µg

Nota: Tomado y adaptado de Glass & Hedrick, (1977)

El lactosuero contiene además cantidades pequeñas, pero bastante apreciables de las vitaminas A, C, D y E. La vitamina D tiene una función importante en la absorción de calcio y fósforo y es imprescindible para mantener los huesos y dientes sanos (López-Sobaler et al., 2022).

2.7. Péptidos del lactosuero con actividad biológica

El descubrimiento de las propiedades bioactivas de los péptidos se hizo por primera vez en 1979, cuando Brantl et al. (1979) reportaron la actividad opioide de péptidos describiendo que es necesario la proteólisis enzimática para la liberación y activación de sus propiedades funcionales. El auge por las investigaciones alrededor de las propiedades bioactivas del lactosuero se inicia a principios del año 2000. El interés surge por las diversas funciones biológicas que estos poseen, la disponibilidad, el alto porcentaje de pureza que pueden alcanzar y los bajos costos de la materia prima; razón por la cual, la actividad biológica de los péptidos presentes en los alimentos está siendo objeto de extensa investigación debido a sus impactos beneficiosos en la salud humana. Estos péptidos, que inicialmente son secuencias encriptadas dentro de las proteínas, adquieren su función biológica después de ser liberados de la estructura primaria, ya sea por la acción de enzimas digestivas, fermentación bacteriana o mediante un proceso de proteólisis selectiva mediante el uso de enzimas específicas. La actividad biológica de los péptidos en general y del lactosuero en particular se fundamenta tanto en la exclusiva composición de aminoácidos que poseen como en la secuencia particular que conforman (Olvera-Rosales et al., 2022).

Entre las propiedades bioactivas que se han reportado en el lactosuero destacan las propiedades opioides con efectos sobre el sistema nervioso; péptidos inmunomoduladores que influyen positivamente sobre los macrófitos con efectos antimicrobianos y antivirales; péptidos que favorecen el sistema cardiovascular con propiedades antihipertensivas, hipocolesterolémicas y antitrombóticas, péptidos anticancerígenos y antioxidantes que neutralizan las especies reactivas de oxígeno (ROS) y evitan el daño celular (Kareb & Aïder, 2019; Kim & Wijesekara, 2010; Olvera-Rosales et al., 2022; Walstra, 2018). Las propiedades de los péptidos del lactosuero (Tabla 9) pueden considerarse como alternativas para la prevención de algunas enfermedades (Chacón, 2017).

Tabla 9. *Propiedades funcionales de los péptidos del lactosuero*

Efecto	Sistema Cardiovascular	Obesidad	Diabetes tipo 2	Sistema Inmune	Sistema Gastrointestinal	Sistema Nervioso
Hipocolesteromiantes	✔					
Antitrombóticos	✔					
Antihipertensivos	✔					
Antioxidantes	✔	✔	✔			
Inmunomoduladores		✔	✔	✔		
Antimicrobianos				✔	✔	
Unión a minerales					✔	
Antagonistas opioides						✔
Agonistas opioides	✔	✔	✔	✔	✔	✔

Nota: Tomado de Torres-Llanez et al., (2005)

Se conoce que las proteínas lácteas son precursoras de péptidos bioactivos con actividad biológica demostrada *in vitro* y que la digestibilidad ileal de las proteínas lácteas es del 95 % (Barbé et al., 2013); por lo que, a pesar de que muchos péptidos derivados del lactosuero han sido identificados con actividad biológica hay que tener en cuenta que la mayoría se ha obtenido mediante hidrólisis dirigida y casi ninguno se ha estudiado a partir de la digestión gastrointestinal *in vivo* de un alimento elaborado a partir del lactosuero; por lo tanto, este es un campo que aún debe ser explorado.

2.7.1. Péptidos con actividad antihipertensiva

La hipertensión se erige como un relevante desafío para la salud global, dado que su prevalencia y sus efectos en el sistema cardiovascular, cerebral y renal continúan siendo factores evitables primordiales en la mortalidad prematura y la discapacidad a nivel mundial (Chamata et al., 2021; Teza et al., 2023). La influencia de la hipertensión en la salud cardiovascular, que abarca condiciones como insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular, está sólidamente establecida (Escobar, 2002; Fuchs & Whelton, 2020; Iadecola & Davisson, 2008; Kannel et al., 1980).

Un elemento esencial en la regulación de la presión arterial es el sistema renina-angiotensina, donde uno de sus componentes centrales es la enzima convertidora de angiotensina (ACE por sus siglas en ingles de "Angiotensin Converting Enzime"). Esta enzima impulsa la transformación de la angiotensina I inactiva, una cadena de diez péptidos, en angiotensina II, una cadena de ocho péptidos con notables propiedades vasoconstrictoras (FitzGerald et al., 2004). Cabe mencionar que ACE también inactiva la bradiquinina, molécula con un papel esencial en la vasodilatación, ejerciendo una influencia significativa en la regulación de la presión arterial, y la inhibición de esta enzima puede resultar en efectos antihipertensivos. En la práctica clínica, los inhibidores sintéticos de ACE como el captopril, enalapril, alecepril y lisinopril se utilizan ampliamente para tratar la hipertensión esencial, a pesar de los efectos secundarios asociados. Dado el papel crucial de la dieta tanto en la prevención como en el tratamiento de la hipertensión, los esfuerzos actuales están orientados hacia el desarrollo de alimentos que muestren propiedades antihipertensivas, en este sentido estudios inherentes a la proteólisis de las proteínas de la leche ha dado lugar a la generación de péptidos inhibidores de la ACE *in vitro* y péptidos antihipertensivos *in vivo* Li et al., (2022)*;* estos péptidos también podrían surgir durante el proceso de fermentación de productos lácteos (Chen et al., 2014; FitzGerald et al., 2004.)

Se ha demostrado también que la actividad antihipertensiva de estos péptidos está relacionada con la secuencia aminoacídica del lado C-terminal Olvera-Rosales et al., (2022) y, que el consumo de hidrolizados de suero reduce significativamente la presión sanguínea en pacientes hipertensos (FitzGerald et al., 2004; Martínez y Martínez, 2006). En investigaciones recientes se han descrito dos nuevos péptidos de β-Lg con estas propiedades, YVEELKPTPEGDL y DTDYKKYLLVC, los cuales pueden relajar un 65,02 % los anillos aórticos (Ozorio et al., 2019).

Se han descrito péptidos derivados de la lactoferrina con propiedades antihipertensivas. Así el péptido DPYKLRP provoca la relajación de la arteria mesentérica, involucrada en la liberación del óxido nítrico y su sinergia con la relajación inducida por el clorhidrato de acetilcolina con efectos vasoactivos que reducen la resistencia periférica vascular (García-Tejedor et al., 2017). Además, posee biopéptidos con funciones vasorrelajantes en el fragmento 560–572 de secuencia WAKNLNREDFRL (Tonda et al., 2017).

2.7.2. Péptidos con actividad antitrombótica

La actividad antitrombótica de los péptidos del lactosuero viene dada gracias a la liberación de fibrinógenos y trombina, el factor dependiente de inhibición plaquetaria y a las casoplatelinas provenientes de la lactoferrina en su secuencia KRDSGRKDS (Rodríguez-Hernández et al., 2014). La β-LG posee un fragmento al que se le ha denominado lactostatina el cual ha demostrado poseer capacidad para disminuir los niveles de colesterol sérico; esta función viene dada por la disminución micelar del colesterol, en otras palabras, disminuye la absorción intestinal y la transcripción genética de la enzima responsable de metabolizar el colesterol (colesterol-7-hidroxilasa) (Ricci-Cabello et al., 2012). Más recientemente se ha descrito la actividad antitrombótica del péptido LRPVAAEIY derivado de esa proteína (Fan et al., 2019, como se citó en Olvera-Rosales et al., 2022).

2.7.3. Péptidos con actividad inmunológica

La actividad inmunológica también es de suma importancia y uno de los efectos más apreciados de los péptidos del lactosuero (Gauthier et al., 2006; Szwajkowska et al., 2011). Esta se atribuye a fragmentos derivados de α-LA; en la que se considera que los ligandos se unen a los receptores opiáceos de la membrana de los linfocitos o de los macrófagos, influyendo en la capacidad inmunorreactiva como el caso de la Arginina que tiene en sus extremos amino o carboxilo. Su reacción inmunológica puede ser tan fuerte que algunos péptidos del lactosuero se han empleado en el tratamiento contra el SIDA, gracias a la producción de linfoquinas, reacciones que se logra por medio de los dipéptidos YG de los fragmentos f(18-19) y f(50-51) y el tripéptido YGG en sus fragmentos f (18-20) (Hernández-Ledesma, 2002).

El péptido GLF de α-La es precursor de la fagocitosis de glóbulos rojos en ovejas, mientras que los péptidos YG y YGG mostraron aumentar los linfocitos en humanos (Jacquot et al., 2010).

IPAV, péptido derivado de β-lactoglobulina mostró reducción de la Interleucina-8 (IL-8) inducida en células Caco 2 con factor de necrosis tumoral (TNF) (Oyama et al., 2017).

2.7.4. Péptidos con actividad antitumoral

La actividad antitumoral de los péptidos del lactosuero se ha informado en LFcin, un fragmento de la lactoferrina con propiedades antitumorales que inhibe la metástasis e induce la apoptosis de las células cancerígenas, todo esto gracias a que puede actuar como factor de transcripción y atravesar la membrana nuclear y unirse al ADN, además de tener propiedades inhibitorias de la acción de citoquinas como la Isoleucina-6. Estas características le confieren propiedades anticancerígenas e inmunomoduladoras (Martínez & Martínez, 2006). Tales propiedades inmunomoduladoras de LFcina vienen dadas por la presencia de las cargas catiónicas de la molécula (Haque et al., 2008). Al péptido FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF, LfcinB, se le atribuye la mayor actividad anticancerígena, puede incitar apoptosis por rutas que implican mecanismos que dependen de endonucleasas y ceramidas (Solarte, 2016).

Recientemente se ha descubierto que β-LG y α-LA también poseen propiedades antitumorales con una potencial estabilización a base de polifenoles hidrófobos para alcanzar los órganos blancos (Wu et al., 2021).

2.7.5. Péptidos con actividad antimicrobiana

Los péptidos antimicrobianos están formados por pequeñas cadenas de aminoácidos hidrofóbicos y con carga positiva, responsables de afectar la bicapa lipídica microbiana, producto de la pérdida de iones y sustancias metabólicas, dando lugar a la lisis celular (Alvarado Carrasco & Guerra, 2010).

Las estructuras de los péptidos que se unen a la membrana bacteriana están relacionadas con especies catiónicas, con estructuras de hélice α, siendo fragmentos derivados de la lactoferrina f(17-41) capaces de inhibir el crecimiento de un gran número de bacterias, entre las que se encuentran *E. coli*, *Streptococcus, Pseudomonas, Listeria, Klebsiella, Salmonella, Proteus, Bacilus*; y entre las levaduras que puede inhibir se encuentra *Candida* (Hati et al., 2018).

La actividad antimicrobiana del lactosuero se atribuye a la Lactoferrina y a sus péptidos, efecto que está ampliamente estudiado (Bruni et al., 2016; Farnaud & Evans, 2003; García-Montoya et al., 2012; Moreno-Expósito et al., 2018). Se ha demostrado que el fragmento terminal de la

lactoferrina, conocido como lactoferricina (LFcina), posee una potente actividad antimicrobiana, capaz de inhibir los virus de Herpes simple tipo 1 y 2, *E.coli* 0111, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytógenes* y *Candida albicans* (Chatterton et al., 2006; Clare & Swaisgood, 2000; Park et al., 2018). Huertas Méndez et al., (2017) reportaron que el péptido RRWQWR tenía alto poder antimicrobiano.

La Lactoferrina es considerado como un potencial bio-conservante con propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram-negativas, capaz de permear la membrana de los hongos por lo que actúa como antifúngico; puede también quelar el hierro, de manera que compite contra bacterias patógenas (Biernbaum et al., 2021;Singh et al., 2021). En la actualidad se han estado realizando investigaciones concentradas en los fragmentos 17–41/42 para su uso como bio-conservantes y para aumentar la vida útil de los alimentos (Dinika et al., 2020). También se le atribuye actividad antimicrobiana al ácido *N*-acetilneuramínico presente en los (GMP) el que proporciona al organismo propiedades antimicrobianas contra *Helicobacter pylori* al reducir el crecimiento y la colonización (Kim et al., 2016).

β- LG ha mostrado también actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas en sus fragmentos f(15-20), f(25-40), f(78-83), f(92-100); por su parte, α-LA tiene propiedades bacteriostáticas sobre las bacterias Gram-positivas (Morrin et al., 2021; Pellegrini et al., 1999).

2.7.6. Péptidos con actividad opioide

Los opioides son compuestos que poseen propiedades analgésicas derivadas de la interacción de estos con los receptores opioides distribuidos en el sistema nervioso central (SNC) y periférico (Valiente et al., 2001). La actividad opioide de los péptidos del lactosuero se debe a que pueden unirse al músculo liso, relajándolo y favoreciendo el paso de electrolitos, de igual forma estas moléculas pueden unirse a los neurotransmisores o a los receptores de dolor localizados en el sistema nervioso, endocrino o inmune (Korhonen y Pihlanto, 2006). También pueden modificar la motilidad intestinal al unirse a los moduladores exógenos o liberando hormonas intestinales, como es el caso del fragmento de la lactoferrina conocido como *β*-lactorfina, mientras que, la *β*-lactotensina tiene efectos analgésicos y potenciadores de la memoria (Hernández-Ledesma et al., 2011).

Entre los fragmentos reconocidos con propiedades opiáceas se encuentra los derivados de *β*-LG YLLF y PEGD, los de la lactoferrina A en sus secuencias YLGSGT y el tetrapéptido *α*-lactorfina

derivado de α-La YGLF f(50-53) (Kamau et al., 2010). La característica en común que tienen estos péptidos es que en el N-terminal poseen residuos de Tyr con residuo aromático de Phe o Tyr en la tercera o cuarta posición (Alvarado Carrasco & Guerra, 2010). En la secuencia de α-LA ALKAWSVAR f(208-216 conocida como albutensina A, se ha comprobado además acción antinflamatoria en el íleon de cobayas por su homología con las anafilatoxias (C3a y C5a) en sus COOH-terminales, de manera que puede ocupar los sitios de unión de estos péptidos inflamatorios potentes (Pandey et al., 2020).

2.7.7. Péptidos con actividad antiinflamatoria

Se ha informado sobre la actividad antiinflamatoria de los péptidos del lactosuero liberados tras digestión *in vitro*, que han mostrado capacidad de reducir la inflamación en células epiteliales respiratorias de fibrosis quística CFTE29o (Iskandar et al., 2013). Además, en modelos murinos cirróticos se ha observado la disminución de la liberación de citocinas proinflamatorias, así como la reducción de marcadores del estrés oxidativo, tras la ingesta de proteínas de lactosuero (Jobara et al., 2014). En células RAW 264.7 tratadas con WPH disminuyeron los niveles de expresión del ARNm de las citocinas inflamatorias (Jung et al., 2022). La secuencia de β-lactoglobulina GTWYSL ha mostrado inhibición de las vías inflamatorias, y los péptidos de lactoferrina LSFNPTQL, MAASDISLL, DTDYKKYLLF, IIAEKTKIPAVF han contribuido en la reducción de las adipocinas y de interleucinas antiinflamatorias (Bamdad et al., 2017). En un sentido similar las GMP poseen propiedades antinflamatorias al suprimir el reclutamiento de células inflamatorias a los broncoalvéolos (Roldán et al., 2016).

2.7.8. Péptidos con actividad antiviral

La actividad antiviral del lactosuero se atribuye a los péptidos derivados de lactoferrina. Las secuencias KANEGLTWNSLKDK, TGSCAFDEFFSQSCAPGADPKSR, TNGESTADWAKN, GKNGKNCPDKFC, KSETKN, NDNTECLAKLGGRPTYEE han reportado actividad antigripal. Lactoferricina por su parte ha mostrado *in vitro* acción positiva contra citomegalovirus humano y herpes simple (Andersen et al., 2001, 2003). La secuencia de lactoferricina FKC1RRWQWRMKKLGAPSITC1VRRAF ha mostrado inhibición del virus del papiloma humano (VPH) Mistry et al., (2007), así como sobre el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Berkhout et al., 2002). Sobre este último, in vivo en ratas, se ha observado el efecto inhibitorio

de lactoferricina sobre el virus (Shestakov et al., 2012). Gambacorta et al., (2022) evaluaron la actividad antiviral de las secuencias MHI, IAEK y IPAVF contra el proceso de replicación del virus SARS-CoV-2. IPAVF fue la secuencia que reportó la mayor actividad inhibitoria.

2.7.9. Péptidos con actividad hipocolesterolémica

Se conoce que los péptidos hipocolesterolémicos pueden disminuir los niveles de lípidos en la sangre al cambiar su perfil plasmático aterogénico a un perfil plasmático cardioprotector, al inducir la expresión del receptor de LDL; mejorando al mismo tiempo la síntesis y excreción de ácidos biliares y permitiendo la reducción de la absorción de esteroides en el intestino y los niveles de colesterol (Erdmann et al., 2008).

Los péptidos lactostatina (IIAEK) y β-lactotensina (HIRL) derivados de β-lactoglobulina fueron identificados como hipocolesterolémicos (Nagaoka et al., 2001; Yamauchi et al., 2003). La lisina C-terminal del dipéptido EK es responsable de la actividad de lactostatina (Peighambardoust et al., 2021), y, supera al β-sitosterol en el control de los niveles de colesterol en sangre (Ohinata et al., 2002).También se ha informado que la β-lactotensina reduce el colesterol total LDL y sérico en ratones hiperlipidémicos (Yamauchi et al., 2003); y, que además de su actividad hipocolesterolémica, tiene acción antinociceptiva y antiestrés (Nath et al., 2015). El péptido albutensina A retrasa el vaciado gástrico y aumenta los niveles de glucosa en sangre (Ohinata et al., 2002).

2.7.10. Péptidos con actividad antidiabética

El lactosuero puede favorecer la producción de insulina en personas prediabéticas y con diabetes tipo 2 (Lesgards, 2023). La secuencia LDQWLCEKL del fragmento f(115–123) de α-lactoalbúmina ha mostrado capacidad de inhibición de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), enzima responsable de la degradación de las hormonas incretinas secretoras de insulina (Ashraf et al., 2021). Se ha demostrado que pacientes con diabetes tipo 2 al ingerir proteína de suero antes de las comidas han mejorado la glucemia posprandial; los estudios sugieren que los péptidos derivados de la hidrólisis de las proteínas de suero pueden tener efectos antidiabéticos al regular las concentraciones de glucosa y mejorar la sensibilidad a la insulina (Ma et al., 2009; Nongonierma & FitzGerald, 2013; Smith et al., 2020). Se ha reportado también que el consumo de proteína de suero (WP) puede retrasar la tasa de vaciado gástrico, posiblemente a través del péptido GLP-1 que

tiene actividad insulinotrópica, además es similar al glucagón, y se relaciona con un mejor manejo de la glucemia posprandial (PPG) (Smith et al., 2020; Watson et al., 2019; Wu et al., 2016). GLP-1 es importante para mantener la glucosa en sangre en equilibrio ya que estimula la producción de insulina en las células β del páncreas en respuesta a la glucosa, y a su vez, inhibe la producción de glucagón en las células α pancreáticas (Drucker & Nauck, 2006).

2.7.11. Péptidos con actividad osteoanabólica

Se conoce que la proteína del suero tiene un efecto positivo en la salud ósea, lo que indica que puede ser beneficiosa para la formación y mantenimiento del hueso, y, que los péptidos derivados de la hidrólisis de las proteínas de suero tienen un efecto positivo en la proliferación y diferenciación de los osteoblastos primarios (Pandey et al., 2018). Los péptidos inhibidores de la enzima oxidasa (AO) P2-YVEEL, al igual que los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) YLLF favorecen el recambio óseo por lo que pueden ser útiles para prevenir la pérdida de masa ósea y promover la formación de hueso nuevo (Mada et al., 2020; Pandey et al., 2018). Además, tienen efecto protector sobre el hueso al suprimir la inflamación producida por las citocinas inflamatorias, y mejorar los marcadores de formación ósea (Kim et al., 2015).

2.7.12. Péptidos con actividad antioxidante

Los antioxidantes son sustancias que poseen la capacidad de actuar en contra de los radicales libres, especialmente de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Palma & Seiquer, 2020).

Unos de los primeros autores en demostrar que el lactosuero tenía capacidad antioxidante fueron Lands et al., (1999), que observaron un aumento del antioxidante glutatión (GSH), que es un sistema de protección celular que destruye los ROS, siendo su biosíntesis dependiente de la disponibilidad de cisteína.

En la actualidad, se reconoce que el lactosuero mejora la actividad enzimática antioxidante y disminuye el estrés oxidativo (Nabuco et al., 2019). La capacidad antioxidante del lactosuero ha sido atribuida a ciertos péptidos que se liberan durante la hidrólisis de las proteínas, cuyas propiedades antioxidantes se relacionan con la composición, estructura e hidrofobicidad de sus aminoácidos. Así, los aminoácidos hidrófobos y aromáticos actúan como donantes de electrones para estabilizar los radicales libres (Corrochano et al., 2019; Mann et al., 2015).

Los aminoácidos Tyr, Trp, Met, Lys e His, y los aminoácidos que azufrados como Cys tienen un gran potencial antioxidante (Mann et al., 2015; Sadat et al., 2011). Por su parte, los aminoácidos hidrófobos lle, Leu, Phe, Trp, Tyr, Val, Trp y Tyr son capaces de reaccionar con los hidroperóxidos lipídicos de la membrana celular (Chanput et al., 2010; Kamau et al., 2010; Shahidi & Zhong, 2008; Udenigwe & Aluko, 2012), mientras que, los anillos aromáticos pueden quelar iones metálicos, como aquellos encontrados en la α-LA en las fracciones 1-15, 17-31 y 109-144, así como en la β-LG en sus fragmentos 15-20, 19-29, 12-46, 25-40, 78-83, 92-100 y 145-149 (Kamau et al., 2010). La lactoferrina en el fragmento 17-41 quela hierro gracias a que en sus lóbulos se encuentran los aminoácidos Tyr (2), His (1) y Asp (1) (Athira et al., 2021).

Los WPH pueden inactivar los ROS, eliminar radicales libres, inhibir la peroxidación lipídica, quelar iones metálicos o una combinación de lo anterior (Brandelli et al., 2015). Se reconocen varios mecanismos por los cuales el lactosuero puede beneficiar a la actividad antioxidante, uno de ellos es por medio del efecto en la expresión de genes Nrf2, HO-1 y NQO1, los cuales se encuentran involucrados en los procesos de defensa celular contra las especies reactivas de oxígeno, y otro es el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) (Xu et al., 2011).También puede atribuírsele actividad antioxidante gracias al incremento de la actividad citoprotectora de glutatión- *S* -transferasa (GST), una enzima que interviene en el sistema Nrf2 de las células endoteliales (Kerasioti et al., 2016).

Las funciones antioxidantes del lactosuero benefician al sistema cardiovascular y, en consecuencia las enfermedades coronarias se ven disminuidas (Chanput et al., 2010), además de contribuir a la disminución del índice de masa corporal (IMC) y mejorar los parámetros del síndrome metabólico (Simonson et al., 2020). Se ha reportado que WP y WPH mejoran la morfología de las mitocondrias produciendo un aumento de la capacidad antioxidante total y mayor actividad GPx y que a su vez disminuye el malondialdehido, producto final de los peróxidos de los lípidos; y que, las proteínas de suero también sirven como neuroprotectores ante el estrés oxidativo incrementando la actividad de la acetilcolinesterasa (Ling et al., 2022).

Las enzimas utilizadas para la hidrólisis y aislamiento de los péptidos con funciones antioxidantes son la flavourzyme, tripsina, pepsina, promatex, proteasa N o alcalasa. Esta última puede aislar siete péptidos con una potente capacidad antioxidante, entre ellos el péptido WYSL con la mayor capacidad para eliminar radicales libres 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) y

eliminación de radicales superóxidos con IC50 de 273,63 μM y 558,42 μM, respectivamente (Zhang et al., 2013).

Muchos de los péptidos aislados provienen de la β-LG y pueden tener múltiples funcionalidades, como la secuencia YQEPVLGP que además de tener propiedades antioxidantes, también posee propiedad antimicrobiana e inhibidora de ACE, y las secuencias TTMPLW y VMFPPQSVL igualmente pueden ser inmunomoduladoras y antimicrobianas, además de inhibidoras de ACE. Esto demuestra la riqueza funcional de los péptidos del lactosuero (Brandelli et al., 2015), siendo utilizados para combinar las propiedades nutricionales de otros alimentos (Singh et al., 2022).

La sinergia entre las proteínas de suero y otros antioxidantes presentes en los alimentos o en la dieta ha sido observada en diversos trabajos. Durante la digestión, algunos antioxidantes tienen poca biodisponibilidad, pero al unirse con las proteínas del lactosuero pueden aumentar la estabilidad y bioaccesibilidad (Yin et al., 2020); razón por la cual, en la actualidad las proteínas del lactosuero se han combinado con vegetales que poseen propiedades antioxidantes (Alam et al., 2020), demostrando que el lactosuero protege las capacidades antioxidantes de las frutas, a la vez que les da mayor biodisponibilidad (Zang et al., 2021) y estabilidad estructural (Li et al., 2021).

El mecanismo de acción de los péptidos antioxidantes no ha sido completamente dilucidado, pero se cree que implica la inhibición de la peroxidación lipídica, la inactivación de ROS, la eliminación de iones metálicos y la conversión intracelular de cisteína a glutatión (Olvera-Rosales et al., 2022).

A manera de resumen en la Tabla 10 se muestra la actividad biológica de los péptidos del lactosuero, su origen y secuencia de aminoácidos.

Tabla 10. *Péptidos del lactosuero con actividad biológica*

Actividad Biológica	Mecanismo de acción	Origen	Secuencia de aminoácidos	Referencia
Antihipertensiva	Inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE).	α-LA	IPP	(Martin et al., 2018)
			VPP	
			IW	
Antimicrobiana	Formación de poros antimicrobianos, inducción de permeabilidad y lisis celular.	α-LA	EQLTKGYGGVSLPEWVCTTF ALCSEK	(Pellegrini et al., 1999)
		β-LG	EIPTINT	(Ali et al., 2019)
		LF	IDALNENK	(Huertas Méndez et al., 2017)
			VLVLDTDYK	
			AASDISLLDAQSAPLR	
			RRWQWR	
Antidiabética	Inhibición de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV).	α-LA	LAHKALCSEKL	(Nongonierma et al., 2016)
			WLAHKAL	
	Inhibición de la alfa-amilasa (α-AAM) y la alfa-glucosidasa (α-AG).	β-LG	WL	(Jia et al., 2020)
			LDQWLCEKL	(Song et al., 2017)
			ALGIILA TGMVAGGIMGLPA	(Ashraf et al., 2021)
			PAGNFLM	(Baba et al., 2021)
			PAVACCL	
			PPLPCHM	
			PAGNFLP	
			PVAAAPVM	
			PAGNFLMNGLMHR	
			PAVACCLPPLPCHM	
			MLPLMLPFTMGY	
			PAGNFLPPVAAAPVM	

Antioxidante		β-LG		(Hernández-Ledesma et al., 2007)
	Inhibición de la peroxidación lipídica. Inactivación de especies reactivas de oxígeno (ROS)		MHIRL	
		β-LG	YVEEL	
	Eliminación de radicales libres.	α-LA	WYSLAMAASDI	
	Quelación de iones	α-LA	ALMP	(Corrochano et al., 2019)
		BSA	GDLE	
			TKIPA	(Nongonierma & FitzGerald, 2013)
			VEELKPT	
			WC	(Sadat et al., 2011)
			LDQW	
			INYW	(Corrochano et al., 2019)
			VGIN	
			AVEGPK	
Anticancerígena	Actividad antioxidante e inmunomoduladora, inhibición de la angiogénesis,	β-LG	MKCLLLALAL	(Sah et al., 2015)
	modulación de oncogen, inducción de apoptosis de células cancerosas,	α-LA	TCGAQALIVT	
	Inhibición de la β-glucuronidasa.	LF	QTMKGLDIQK	(Kimura et al., 2014)
			VAGTWYSLAM	
			AASDISLLDA	
			QSAPLRVYVE	
			MMSFVSLLLV	
			GILFHATQAE	
			QLTKCEVFRE	
			LKDLKGYGGV	
			SLPEWVCTTF	
			APRKN	
			VRWCT	
			ISQPE	

Antiinflamatoria	Inhibición de las vías inflamatorias. Reducción de las adipocinas. Inhibición de la liberación de óxido nítrico. Producción de interleucinas antiinflamatorias Unión a los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos.	β-LG	WFKCR RWQWR MKKLG GTWYSL	
		LF	LSFNPTQL MAASDISLL AMAASDISLL	(Bamdad et al., 2017)
			DTDYKKYLLF IIAEKTKIPAVF DIQKVAGTWYSL ELKPTPEGDLEIL LFP20	(Zong et al., 2019)
Antitrombótica	Inhibición de la unión del fibrinógeno al receptor de la trombina IIa.	α-LA	RGDGLF	(Fiat et al., 1993)
		LF	LRPVAAEIY	(Fan et al., 2019)
			LRPVAAEIY (LF-LR)	(Xu et al., 2020)
Antiviral	Unión al receptor de la membrana, supresión de la expresión génica viral, inhibición del virión, inhibición de la adsorción del virus.	β-LG	ALMPHIR	(Çakır et al., 2021)
		LF	IPAVFK FKC1RRWQWRMKKLGAPSITC1VRRAF	(Mistry et al., 2007)
			KANEGLTWNSLKDK TGSCAFDEFFSQSCAPGADPKSR TNGESTADWAKN GKNGKNCPDKFC KSETKN NDNTECLAKLGGRPTYEE	(Scala et al., 2017)
Inmunomoduladora	Estimula la proliferación de linfocitos, la fagocitosis de macrófagos y la síntesis de anticuerpos. Regulación de citocinas proinflamatorias, neutralización de endotoxinas bacterianas.	α-LA	LIVTQTMK	(Jacquot et al., 2010)

		β-LG	EILLQK	(Oyama et al., 2017)
			VLVLDTDYKKYLLF	
			YLLF	
			RELKDLK	
			WLAHK	
			IPAV	
Queladora de minerales	Quelación de complejos minerales	α-LA y β-LG	FD	(Zhao et al., 2014)
			TAT	(Zhao et al., 2015)
			EG	(Huang et al., 2015)
Osteoanabólica	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE),	β-LG	YVEEL	(Pandey et al., 2018)
	Supresión de las citocinas proinflamatorias,		YLLF	
	Inducción de la expresión génica.		IPP	(Narva et al., 2004)
			VPP	
Hipocolesterolémica		β-LG	HIRL	(Yamauchi et al., 2003)
	Aumento de la expresión del receptor de LDL.			
	Unión de sales biliares.		IIAEK	(Wakasa et al., 2011)
Opiode	Unión a los receptores opiodes	α-LA	YGLF	(Antila et al., 1991)
		β-LG	YLLF	(Teschemacher et al., 1997)

Nota: Tomado de Olvera-Rosales et al., (2022)

2.8. Biodisponibilidad de los nutrientes del lactosuero

Se ha cometido el error de usar el término de biodisponibilidad como sinónimo de absorción de nutrientes, y no todos los elementos nutricionales que atraviesan la barrera intestinal son utilizados por el organismo. En este sentido, hay dos conceptos fundamentales relacionados con el proceso digestivo y el estudio del potencial bioactivo de los alimentos: la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad. La bioaccesibilidad implica que una determinada fracción del alimento o dieta para tener una función biológica, debe ser liberada de la matriz alimentaria durante la digestión, convirtiéndose en disponible (o bioaccesible) para la absorción a nivel intestinal, mientras que la biodisponibilidad se refiere a la parte del alimento que alcanza la circulación sistémica y es utilizada para las funciones fisiológicas, lo cual incluye la digestión, absorción por las células intestinales y el transporte a las células del organismo (Lutz, 2013; O'Dell, 1984).

Diversos aspectos pueden modificar la biodisponibilidad de un nutriente determinado; por una parte, están los factores relacionados con la dieta, como la presencia de otras sustancias que compiten en el proceso de absorción, la cantidad y forma química en la que se encuentra el elemento y el procesado aplicado al alimento, que puede generar la desnaturalización térmica de las proteínas o la generación de nuevos compuestos que interfieran en la absorción mediante sinergias o antagonismos. Por otra parte, también influyen los factores intrínsecos del individuo que consume el alimento, como sus condiciones fisiológicas, edad, sexo, estado de salud, e incluso la genética o el estrés (Peralta, 2018; Thompson & Manore, 2008).

Es de esperar que la **proteína del lactosuero** posea una buena biodisponibilidad, dado que, no solo está presente en una cantidad elevada, sino que posee un perfil adecuado de aminoácidos esenciales. Como requisito previo a su utilización por el organismo, la proteína, como cualquier nutriente, debe ser digerida, en este sentido el proceso de digestión de las proteínas es complejo; en el tracto digestivo, los biopéptidos son desnaturalizados por las peptidasas, los ácidos gástricos presentes en el estómago y en una posterior proteólisis son transformados a péptidos, una parte de los cuales es aprovechada por enterocitos, otra es utilizada en las funciones hepáticas y el resto pasa al sistema sanguíneo para ser transportado a otros órganos (Martínez & Martínez, 2006). Durante la digestión los biopéptidos pueden ser transformados impidiendo el aprovechamiento de sus propiedades al no llegar de manera intacta al órgano diana (Madureira et al., 2010).

Actualmente, la digestión *in vitro* de los alimentos es el método de elección en el estudio de la bioaccesibilidad de los nutrientes, ya que mimetiza las transformaciones sufridas por la matriz alimentaria durante el proceso digestivo, teniendo en cuenta la presencia de enzimas digestivas y sus concentraciones, pH, tiempo de digestión y concentraciones de sales, entre otros factores (Minekus et al., 2014). Diversas investigaciones se han realizado en torno a las propiedades de los biopéptidos liberados del lactosuero durante la digestión simulada; se ha evaluado además la conservación de sus propiedades funcionales (Mulet-Cabero et al., 2020; Sandoval-Cuellar et al., 2020; Ye et al., 2020), entre las que se puede resaltar la actividad antioxidante, propiedad presente en las proteínas del lactosuero que no solo no se pierde, sino que se ve incrementada después de la digestión gastrointestinal simulada (Corrochano et al., 2019).

La biodisponibilidad de los macronutrientes suele ser alta, es decir, que una gran parte de los carbohidratos, proteínas y grasas ingeridas serán absorbidas y utilizadas por el cuerpo; sin embargo, en el caso de las proteínas, la biodisponibilidad se encuentra relacionada con la digestibilidad de la estructura proteica y la cantidad de aminoácidos esenciales que posee (Schönfeldt et al., 2016). En tal sentido, el lactosuero posee una buena proporción de aminoácidos esenciales y de fácil digestibilidad; no obstante, los micronutrientes y oligoelementos son menos biodisponibles que los macronutrientes, es decir, que la utilización de las vitaminas y minerales será de forma parcial, aspecto que hay que tener en cuenta a la hora de cubrir los requerimientos para la realización de sus funciones biológicas (Schönfeldt et al., 2016).

En general, la biodisponibilidad de los **elementos minerales** en el lactosuero está escasamente estudiada. Estudios realizados sometiendo a la proteína del lactosuero en polvo a una digestión gastro-intestinal simulada, han mostrado que los elementos que tienen mayor concentración como Na, K, Ca, y el Mg, tienen una bioaccesibilidad media tras la digestión gástrica del 53 %, mientras que la de elementos traza como el Zn, Mn y Fe es del 41 % (Guefai et al., 2022). La disponibilidad de los elementos es mayor después de la digestión intestinal, cuando se observa que la fracción soluble de Na, Mg, Ca y K es entre el 69 al 73 %, la de Mg y Na pueden llegar hasta el 96 %, el Fe con un 49 %, Zn con 56 % y el Mn con un 48 % (Guefai et al., 2022).

Uno de los oligoelementos de gran importancia para el organismo es el **hierro**, cuya biodisponibilidad se ve favorecida por la proteína cárnica (por sus residuos de cisteína e histidina), poco accesible para la población de bajos recursos y por suplementos como el ácido ascórbico. Otros factores, como el ácido fítico de los cereales, raíces y tubérculos, o los polifenoles del café

y el té, limitan la biodisponibilidad del hierro al formar compuestos insolubles y están presentes en alimentos más asequibles para la población general (Peralta, 2018).

En la industria alimentaria se emplean sales queladoras de hierro para ser usadas como vehículos, sin embargo, estas presentan poca biodisponibilidad. De acuerdo con esto, en la β-LG se han identificado 49 nuevos péptidos queladores de hierro (36,42 ± 0,184 µg Fe /mg de proteína), que promueven su absorción en mayor medida que las sales usadas tradicionalmente para fortificar alimentos y presentan una buena estabilidad (Athira et al., 2021; Considine et al., 2020).

La estabilidad de los péptidos es fundamental para el aprovechamiento de sus funciones, es por esto que se ha estudiado el incremento de la estabilidad por medio del incremento de la absorción intestinal (lipidización), incremento de la estabilidad y permeabilidad en el suero sanguíneo (glicosilación) o por medio de la microencapsulación, aumentando la farmacocinética; sin embargo, estas técnicas pueden disminuir la afinidad con los sitios de unión de los receptores (Ricci-Cabello et al., 2012; Udenigwe y Aluko, 2012). Aunque no todos los péptidos tienen esta desventaja, existen péptidos que han demostrado resistencia ante la peptidólisis, se trata de péptidos pequeños como los dipéptidos y tripéptidos que logran absorberse intactos y pasar a la circulación (Rodríguez-Hernández et al., 2014; Sipola et al., 2001).

En las últimas décadas, los cultivos celulares de células intestinales están siendo aplicados a los estudios de biodisponibilidad con el objetivo de simular las condiciones intestinales de absorción, y hoy en día se presentan como una alternativa viable a los estudios con animales o humanos, que son más complejos, caros y de larga duración (Seiquer et al., 2015). Acoplados a los métodos de digestión *in vitro*, los cultivos celulares suponen una herramienta útil para elucidar el impacto potencial de algunos compuestos y/o de toda la matriz alimentaria en la salud humana. En este sentido se utiliza con éxito la línea celular Caco-2, derivada de adenocarcinoma de colon humano, cuyas células en cultivo se diferencian espontáneamente en enterocitos maduros, con la morfología y características funcionales del epitelio intestinal.

2.9. Usos y aplicaciones del lactosuero

El lactosuero tiene diversos usos debido a la variedad y versatilidad de sus componentes. Estos usos están vinculados con las propiedades de dichos componentes y han sido estudiados desde hace más de dos décadas. Entre los usos que tiene el lactosuero destacan desde subproductos industriales como bioetanol, biogás y otra diversidad de productos bioquímicos, hasta productos

farmacológicos, sustratos de crecimiento para microbiota, nutracéutico o biocéutico, suplementos dietéticos y aditivos de alimentos, además de su uso en nutrición animal.

La **producción de bioetanol** es uno de los usos industriales más comunes del lactosuero, empleado como alternativa para la reducción del impacto que éste tiene al ser descartado en el ambiente. En países desarrollados y con gobernanza orientada a la sostenibilidad como EEUU, Irlanda y Nueva Zelanda, existen destilerías para el lactosuero desproteinizado que emplean como sustratos *Kluyveromyces fragilis* o *K. marxianus* a fin de realizar un proceso de fermentación, en el que se tiene un rendimiento de 0,53 kg de etanol de 1kg de lactosa metabolizada (Dragone et al., 2009). La relevancia de estos procesos ha llevado a la modificación de cepas como S*accharomyces cerevisiae* para un mejor rendimiento y utilización de la lactosa del lactosuero (Costa et al., 2022).

La composición nutricional del lactosuero lo hace un **sustrato potencial para procesos biotecnológicos y la producción de biomasas microbianas.** Al respecto, se ha utilizado ya desde hace varios años en la producción de proteína de levadura a través de los procesos de fermentación, uno de los organismos más utilizados ha sido *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus* con una biomasa de 4,65 a 26 (Revillion et al., 2003), mientras que, Ghaly y Kamal, (2004) obtuvieron una densidad de 8,5 ×108 células/ml con la cepa *K. fragilis*.

El lactosuero representa un sustrato económico para la producción enzimática a gran escala, ya que se han mostrado incrementos de hasta un 39 % comparando con los sustratos convencionales de lactosa (Hausjell et al., 2019). Además, tiene un gran potencial como sustrato para diversos organismos como se demuestra en el trabajo realizado por Abril Bonett et al., (2020), pudiendo producir carotenoides, carbohidratos y lípidos a partir de la producción de biomasa de la microalga *Desmodesmus* sp. L2B Bold. También puede ser empleado para la producción de otras enzimas como las lipasas. Estas son enzimas con diversidad de usos en la industria, que van desde la creación de detergentes, aceites, papel, cuero textil, biodiesel, biorremediación de aguas residuales, hasta alimentos y síntesis orgánicas (Knob et al., 2020). De igual manera se ha empleado para la producción de bioconservantes antifúngicos por su interacción con *Lactobacillus paracasei* y *Propionibacterium freudenii* Xie et al., (2022), los cuales también tienen efectos bacteriostáticos (Kadyan & Pradhan, 2020).

La producción de exopolisacáridos también puede ser llevada a cabo a partir de la lactosa del lactosuero como sustrato. Un ejemplo de un exopolisacárido ampliamente utilizado industrialmente es la goma xantana, elaborada por *Xanthomonas campestris*. El costo del sustrato para este

microorganismo es alto debido a los requerimientos de carbono, nitrógeno y microelementos como sales de calcio, hierro y potasio que este requiere, en este sentido. La lactosa presente en el lactosuero ha servido como un sustrato alternativo altamente eficiente en la obtención de este exopolisacárido (Silva et al., 2009; Sobenes & Alegre, 2015).

2.10. Importancia del lactosuero en la industria alimentaria

El lactosuero no solo es usado como materia prima para diversos procesos biotecnológicos como los descritos anteriormente, sino que también es utilizado en nutrición humana para la elaboración de diversos alimentos o suplementos de estos, debido fundamentalmente al potencial de los aminoácidos esenciales que constituyen sus proteínas y a los péptidos con actividades biológicas como los citados en anterioridad. En este sentido, uno de los usos más amplios que se le ha dado al lactosuero ha sido en la elaboración de bebidas en sus distintas presentaciones: bebidas energéticas, bebidas refrescantes, bebidas fermentadas, fórmulas en polvo para lactantes y como suplementos deportivos para el aumento de masa muscular, y muchos otros productos alimenticios como los que se exponen en la Tabla 11.

Tabla 11. *Aplicaciones del lactosuero en la industria alimentaria*

Aplicaciones	**Funcionalidad**
Productos de panadería como croissants, tortas, etc.	Incrementar el valor nutricional, como emulsificante, reemplazar la adición de huevo, para dar cuerpo a la masa.
Productos lácteos como bebidas fermentadas y quesos.	Valor nutricional, emulsificante, gelificante, mejorar propiedades organolépticas, mejorar consistencia, cohesividad.
Bebidas como jugos de fruta, refrescos, bebida a base de leche	Valor nutricional, solubilidad, viscosidad, estabilidad coloidal.
Postres como yogurt, helados	Propiedades emulsificantes, dar cuerpo y textura a los productos.
Confitería	Como emulsificante y para facilitar el batido
Productos cárnicos	Pre- emulsificante, gelificante, mejora la solubilidad

Alimentos para dietas especiales	Alimentos de mayor valor nutricional y bajo costo, alimentos para deportistas, para personas mayores, formulas nutricionales especiales para mantener peso saludable o aumentar consumo de proteína, fórmulas infantiles, fórmulas especiales para alimentación hospitalaria.
Para concentrados de proteína	Para productos alimenticios especiales, suplementos nutricionales, productos de panadería y confitería. Contiene aproximadamente 25-89 % de proteína, 4-52 % de lactosa y 1-9 % de grasa
Para obtener aislados de proteína	Para suplementos de proteína, bebidas y productos altos en proteína, Contiene aproximadamente 90-95 % de proteína, 0,5-1 % de lactosa y 0,5-1 % de grasa
Para obtener hidrolizados de proteína	Para fórmulas infantiles, productos para deportistas, productos nutricionales especiales. Contiene aproximadamente 80-90 % de proteína, 0,5-1 % de lactosa y 0,5-0,8 % de grasa
Purificación de proteínas aisladas	α lactoalbúminas, β Lactoglobulinas, inmunoglobulinas, glicoproteínas como lactoferrina y lactoperoxidasa.
Fuente de compuestos bioactivos	Péptidos y proteínas con potencial antihipertensivo, actividad antimicrobiana, antioxidante, incremento de la saciedad, etc.
Fuente de lactosa	Compuesto transportador en productos farmacéuticos, componente de fórmulas infantiles, materia prima para la producción de derivados de lactosa: lactulosa, GOS, lactitol, glucosa. Para bioconversión de lactosa: Alcohol, ácido láctico, biocombustible.
Fuente para extraer minerales	Prevención de deficiencias y patologías como anemia y osteoporosis, estimulación del desarrollo y crecimiento en edad infantil.

Nota: Tomado de Poveda, (2013).

La mayoría de las aplicaciones del lactosuero se basan en su aprovechamiento en forma líquida; esto se debe principalmente a los altos costos de ensamblaje y mantenimiento de los equipos necesarios para la obtención de compuestos aislados, o de mayor concentración de una proteína en particular. El atractivo de la utilización del lactosuero se debe a que es una materia prima de bajo costo con grandes potenciales nutricionales, como se ha expuesto anteriormente; elevar los costos de producción para la fabricación masiva de productos lo haría poco accesible, como los productos de alto nivel proteico que ya se encuentran en el mercado (Gómez Soto & Sánchez Toro, 2019).

Los constituyentes más apreciados del lactosuero son las proteínas, ya que estas ofrecen calidad nutricional a muchas fórmulas, así como mayor funcionalidad; en tal sentido, la proteína de suero, como se ha demostrado con anterioridad, es un ingrediente que brinda valor agregado por sus múltiples beneficios a la salud y por sus funciones en la calidad y estabilidad de alimentos, encontrándose en una variedad de productos como confites, carnes procesadas, enlatados, panes y diversas bebidas (Foegeding et al., 2002). Los constituyentes de las proteínas han tenido excelente aceptación por parte de la industria alimenticia que desde hace varios años ha comenzado a reemplazar otras proteínas para mejorar las propiedades funcionales de los productos elaborados (Spellman et al., 2005).

Las propiedades funcionales del lactosuero apreciadas por la industria alimenticia son: la solubilidad, hidratación, gelificación, y viscosidad, así mismo su capacidad emulsionante, espumante, y de retención de sabores. En la Tabla 12 se muestra las propiedades funcionales que poseen las proteínas de suero, con respecto a las propiedades de la caseína.

Tabla 12. *Propiedades funcionales de las proteínas de la leche (caseínas) y del lactosuero*

Propiedades	**Caseínas**	**Proteínas de lactosuero**
Hidratación	Muy alta capacidad de retención de agua (CRA) con formación pegante a alta concentración	CRA incrementándose con desnaturalización de proteína
Solubilidad	Insoluble a punto isoeléctrico (pI)	Insoluble a pH 5 si es termodesnaturalizado

Gelificación	No gelificación térmica excepto en presencia de calcio. Gelificación micela por quimosina	Gelificación térmica desde 70 °C: influencia de pH y sales
Viscosidad	Soluciones muy viscosas a pH básico y neutral. Viscosidad más baja a pI	Soluciones no muy viscosas excepto si son termodesnaturalizadas
Propiedades emulsificantes	Excelentes propiedades emulsificantes especialmente a pH básico y neutral Baja estabilidad espumante	Buenas propiedades emulsificantes excepto a pH 4-5 si es termodesnaturalizada
Retención de sabores	Buena retención de sabores	Retención muy variable con la desnaturalización
Propiedades espumantes	Baja estabilidad espumante	Excelente estabilidad espumante

Nota: Tomado de Parra, (2009)

Los beneficios funcionales y estructurales que las proteínas le brindan a la industria alimenticia en cuanto a la elaboración de alimentos se han clasificado en: (1) La hidratación, la cual le da un efecto de adhesión, viscosidad, hinchamiento, retención de agua, solubilidad y dispensabilidad; (2) La agregación y gelificación, se relaciona con la formación de complejos e interacciones proteína-proteína para formación de geles y películas comestibles; (3) La capacidad de ser usado como un emulsionante, en la unión de grasas, formación de cremas y la formación de espuma y aireación, (4) La mejora sobre las propiedades organolépticas, la cual hace referencia a su efecto sobre la textura, color y sabor de los alimentos (Kresic et al., 2006).

La función de hidratación puede verse comprometida muchas veces por la pérdida de solubilidad de las proteínas por los tratamientos térmicos. Esta pérdida de la solubilidad se debe a la desnaturalización de la proteína, que a pH 4,0 – 6,5 forma agregados insolubles. De igual forma, la β-LG forma agregaciones cercanas a su punto isoeléctrico debido a la hidrofobicidad de la molécula lo que afecta de igual forma la solubilidad (Schmitt et al., 2009). La hidrolisis enzimática favorece la solubilidad al aumento de la hidrofilia molecular al presentar mayores números de aminos y carboxilos libres, evidenciando una relación directa entre el aumento de la hidrólisis producto de la actividad

enzimática con el aumento de la solubilidad (Kankanamge et al., 2014), mostrando además mejor estabilidad térmica por la pérdida de la estructura secundaria (Foegeding et al., 2002).

Las proteínas del lactosuero son capaces de mejorar la textura y calidad de los alimentos gracias a la adhesión, pudiendo unir eficientemente diversos alimentos con sus propiedades y aumentar así su valor agregado, como en la elaboración de *nuggets* de pollo o jamón reestructurado, y también pueden incrementar la cohesión de los embutidos como las salchichas y reducir la dureza y masticabilidad (Goode et al., 2013). Esto se debe a la formación de redes tridimensionales que ayudan a la adhesión y cohesión de las partículas (Prabhu, 2006). Estas redes tridimensionales creadas a partir de proteínas hidrolizadas de suero ayudan a retener agua durante la cocción de los alimentos, lo que reduce los costos de formulación. La preservación de humedad también contribuye con la viscosidad relacionada con la formación de geles e interacciones proteína-proteína.

Una de las propiedades funcionales de gran importancia de las proteínas de suero es la gelificación. El gel es concebido como una estructura tridimensional en un estado intermedio entre sólido y líquido, constituido por hebras de proteínas entrecruzadas con carbohidratos capaces de retener agua y grasa, y que brindan soporte estructural, donde los iones de calcio controlan los enlaces de disulfuro que determinan la red. Las interacciones hidrofóbicas de las proteínas parcialmente hidrolizadas desarrollan estructuras que pueden interactuar con otros polipéptidos cercanos, promoviendo la agregación de proteínas y el fraguado (Pinterits & Arntfield, 2007). La gelificación depende del tipo de enzima utilizada, la temperatura y el, pH, entre otros factores.

Las películas comestibles desarrolladas a partir de las proteínas del suero añaden propiedades funcionales a los alimentos; las elaboradas a partir de aislados de proteína forman películas más rígidas, mientras que las películas flexibles se forman a partir de las proteínas hidrolizadas, mejorando otras características como las propiedades de tracción e impermeabilidad contra el oxígeno (Schmid, 2013). Se ha reportado que la película de WPI con agua de quitosano muestra propiedades antifúngicas contra cepas asociadas a la descomposición de los alimentos. Se observó una inhibición del 100 % de *Aspergillus niger*, sin embargo, existen cepas resistentes a estos complejos como es el caso de las cepas de *Penicillium roqueforti* (Vanden Braber et al., 2020). Estas observaciones sugieren que las películas comestibles incorporan ciertas características innovadoras a los alimentos como antioxidantes, conservantes, aromas, color, entre otras, lo que

abre la posibilidad a implementar nuevos ingredientes que no afectan al ambiente y la salud, sino que pueden promoverla por medio de los bioactivos funcionales.

Entre las propiedades interfaciales que poseen las proteínas de suero se encuentran las propiedades emulsionantes, las cuales son usadas para mejorar las fórmulas de bebidas sustitutivas de comida, alimentos infantiles y salsas, entre otros. Los productos hidrolizados de proteína de suero han mejorado las propiedades interfaciales entre el agua y el aceite (Foegeding et al., 2002; Kilara & Panyam, 2003). Estas propiedades emulsionantes permiten la formación de geles con constitución de grasas, como es el caso de las albúminas de suero (Francis & Wiley, 2000).

Recientemente se ha reportado que los carbohidratos de origen vegetal aumentan las propiedades emulsionantes del WPI debido a las interacciones hidrofóbicas entre los compuestos, lo que brinda mayor estabilidad y protección (Guo et al., 2021). De igual forma, se ha mostrado que la estabilidad térmica de las emulsiones mejora con la formación de complejos covalentes entre polisacáridos como la pectina, el carragenano y la goma arábiga, reportando a su vez que la viscosidad y la estabilidad de la espuma también se ve mejorada (Setiowati et al., 2020). Estos complejos también reducen las agregaciones por calor, brindando estabilidad a las emulsiones (Du et al., 2021), además de potenciar la hidrofilicidad de las proteínas (Ozturk & McClements, 2016).

Se ha informado además, que los WPH glucosilados mejoran la viscosidad y la estabilidad de la espuma al combinarlos con polisacáridos, como la maltodextrina (Karbasi & Askari, 2021). Estas recientes investigaciones muestran la necesidad de exploración para seguir mejorando las propiedades alimenticias de las proteínas del suero debido a la compatibilidad que demuestran con otros compuestos.

Las proteínas de suero brindan estabilidad en la formación de espuma en la interfaz aire-agua, propiedad que le brinda viscosidad a los alimentos (Rullier et al., 2010). El estudio de Rullier reporta que las proteínas del suero no desnaturalizadas tienen mayor propiedad de formación de espumas, ya que no compiten con otros tensioactivos, estabilizándose mediante el aumento de la viscosidad en la interfaz aire-agua, siendo las proteosa peptona3 un componente con buenas propiedades espumantes (Innocente et al., 1998). Estos péptidos pueden absorberse con mayor velocidad y promover la formación de espuma con mayor estabilidad al reducir su tamaño, mediante la hidrolisis de la proteína del suero (Ye & Singh, 2000). En este aspecto, el WPH-30 tiene la más alta capacidad espumante reportada por la enzima flavourzyme (Yoon et al., 2010).

En cuanto a los beneficios sensoriales, los concentrados de proteína de suero pueden adicionar sabor a productos cárnicos bajos en grasa, en el sentido de sustituir el sabor que aporta la grasa, lo que representa una alternativa a los aditivos potenciadores de sabor de alto costo (Prabhu, 2006). Se ha reportado también el sabor amargo cuando se adiciona los WPH (Sinha et al., 2007), sin embargo, aquellos hidrolizados empleando las enzimas prolyve o corolase son menos amargos, indicando que los aminoácidos libres en conjunto con otros compuestos y aumento de la temperatura potencian el sabor umami (Spellman et al., 2009). La proteína de suero también ofrece mejoras en el color de los alimentos. Los WPI son conocidos como anti-pardeamientos, ya que inhiben la acción enzimática que pardea las manzanas recién cortadas, al igual que el jugo (Pérez-Gago et al., 2006; Yi & Ding, 2014).

En la actualidad se siguen realizando evaluaciones sensoriales sobre los WPI en combinación con otros alimentos, como el trigo en formulación de galletas, en los que se puede evidenciar un aumento de la viscoelasticidad con el aumento de WPI, así como mejoras en la textura, teniendo buena aceptación. Esto indica que los WPI son ingredientes prometedores para mejorar la estructura y la calidad de los alimentos a base de trigo (En Tay et al., 2022).

Estudios sugieren que los WPI presentan características diferentes en sus propiedades debidas básicamente a la forma de elaboración de los quesos y la obtención del lactosuero. El suero resultante de la elaboración del queso Cheddar y Cottage tiene un sabor más intenso a cartón, el WPI del requesón posee un sabor agrio, mientras que el mejor aroma y sabor corresponde a los WPI del queso mozzarella. En cuanto a la elasticidad, solubilidad, gelificación y estabilidad, no se han mostrado diferencias, aunque el WPI del requesón muestra una cantidad de aire más baja en la espuma y no gelifica al 10 % de proteína, también mostró menos solubilidad a pH 4,6 (Smith et al., 2016).

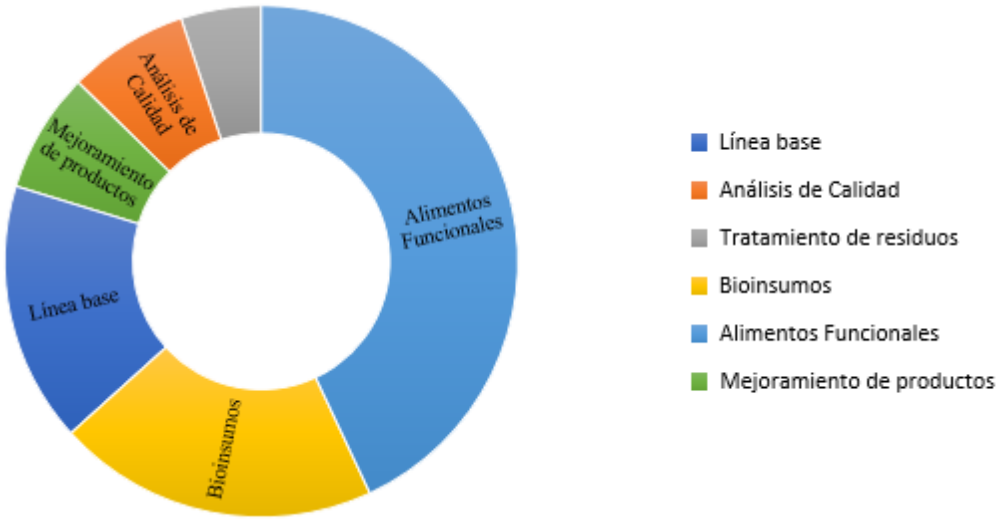
2.11. Aprovechamiento del lactosuero en el Ecuador

La producción de leche en Ecuador se estima que fue de en 5,5 millones de litros diarios durante el 2023 (INEC, 2023) siendo destinada una gran parte (37 % aproximadamente) a la elaboración de quesos. Este mercado se encuentra en crecimiento por la mayor demanda de este producto entre los consumidores y por el Acuerdo Multipartes Ecuador-Unión Europea que se inició en el año 2017 (Pardillos, 2020). El crecimiento de la industria quesera trae consigo el aumento en la producción del lactosuero que se genera, que en Ecuador es desaprovechado casi en su totalidad

(Cortez Latorre, 2018). En este aspecto, en el Plan Estratégico Integral de Agroforestal, Pesca y Acuicultura en el Ecuador del 2015 se reportó que el 55 % del lactosuero producido en el país es desechado sin ningún tipo de tratamiento, el 20,4 % es aprovechado para la alimentación de cerdos, el otro 20,4 % es utilizado en la elaboración de bebidas y el 3,3 % restante es destinado a la elaboración de queso ricota o requesón (SIIPRO, 2015). A pesar de la gran producción de lactosuero en Ecuador, recientemente se reportó que la importación de lactosuero al país es de 60.000 toneladas de suero en polvo, estas evidencias ponen de manifiesto la importancia de incrementar el uso del lactosuero nacional en diversos productos alimenticios (Agualongo et al., 2022).

El lactosuero en Ecuador, a pesar de desecharse más de la mitad, la fracción que es utilizada se destina principalmente a la **elaboración de alimentos**, especialmente bebidas. La **generación de bioinsumos** es otro uso que se le da al lactosuero, el cual es un tema relevante para el país. Por otro lado, existen numerosos estudios dedicados al análisis de las características, comercialización y formas de obtener proteínas a partir del lactosuero; en tal sentido, las investigaciones se orientan al mejoramiento de los procesos para el aislamiento y concentración de proteínas y análisis de calidad microbiológicos y fisicoquímicos de su obtención y en menor grado, a descartar el lactosuero de forma segura y sin impactar el medio ambiente (Figura 7).

Figura 7. *Investigaciones dirigidas al aprovechamiento del lactosuero en el Ecuador*

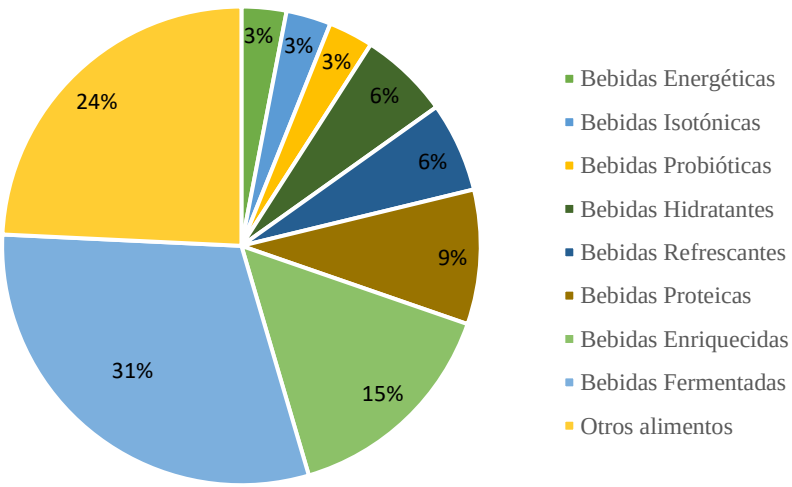


Nota: Tomado y adaptado de Cedeño et al., (2018); Salazar et al., (2017)

Las principales universidades del país afirman que el mayor número de alimentos formulados a base de lactosuero son **bebidas** (Figura 8), las que ocupan más del 75 %, entre las que se pueden encontrar bebidas fermentadas, proteicas, refrescantes, hidratantes, probióticas, isotónicas y energéticas. Por otro lado, se encuentran otros tipos de alimentos como helados y dulce de leche ocupando el 24 % restante.

Como se ha mencionado anteriormente, en el suero quedan retenidas gran parte de las proteínas de la leche, por lo tanto, su aprovechamiento es una excelente alternativa, no solo para fortalecer el tejido óseo, sino por los múltiples beneficios a nivel sistémico, aunado a que es una materia prima económica y que puede mezclarse con mucha facilidad con fitoquímicos igualmente beneficiosos (Rodríguez-Pérez et al., 2019). Esta práctica no solo se ha vuelto de interés a nivel de Ecuador, sino a nivel mundial donde los principales aditivos para dar sabor y otras propiedades son las frutas (Tallapragada & Rayavarapu, 2019).

Figura 8. *Uso del lactosuero en la industria alimentaria del Ecuador*



Nota: Tomado y adaptado de Arias, 2019; Robalino, 2017; Rodríguez-Basantes et al., (2020)

Investigaciones recientes señalan que la elaboración de alimentos como el queso Ricotta y la elaboración de bebidas son actualmente las principales formas de uso del lactosuero en Ecuador. Sin embargo, también señalan que el suero en polvo no parece suplir las necesidades del país, ya

que la importación de este sigue siendo alta (Agualongo et al., 2022). Se sabe que los requerimientos tecnológicos son elevados para la producción de suero en polvo, al igual que el mantenimiento de los equipos. De igual manera es importante acotar que el manejo del suero en polvo en Ecuador es pobre, ya que la mayor parte de la actividad de elaboración de queso es de forma artesanal, lo que puede afectar la calidad del suero.

En la generación de bioinsumos en el Ecuador a partir del suero de queserías confluyen diversas ciencias: la ingeniería química, la ingeniería de alimentos, y la zootecnia, unidas con la finalidad de darle la mayor utilidad posible a estos residuos. En este sentido, se han realizado investigaciones para la obtención de diversos insumos en la parte de alimentación, como aplicaciones gastronómicas, aditivos nutricionales, ácidos grasos volátiles, bebidas alcohólicas, fermentación de café y kefirán; dado que la industria química está orientada al uso de biogás, biometanización, alcoholes y creación de polímeros, medios de cultivo, geles antibacteriales; también para la alimentación animal por medio de ensilaje líquido y ensilaje de pasto. Aunque los usos biotecnológicos son diversos estos solo abarcan el 16 % de las investigaciones realizadas en Ecuador para el uso y la aplicación del lactosuero (Arias, 2019; Robalino, 2017; Rodríguez-Basantes et al., 2020).

El uso de lactosuero para la **alimentación animal**, especialmente en cerdos, es una práctica habitual en Ecuador (Astudillo & Sánchez, 2019). El costo de la alimentación en la actividad pecuaria representa más del 80 % de la inversión, por lo tanto, una reducción de los costos de producción implica una disminución de los costos del producto y, en consecuencia, mayor rentabilidad y más accesibilidad a la proteína animal para los consumidores. El lactosuero se ha usado como una alternativa viable en Ecuador, en el que se ha evidenciado una reducción del alimento balanceado en casi un 45 %, reportando una mejora en la rentabilidad por animal y menor índice de conversión alimenticia de 2,45:1(Ferrín, 2019).

Los países en vía de desarrollo donde existe una gran producción de lácteos no siempre poseen la tecnología necesaria para el tratamiento adecuado del lactosuero, ni para su procesamiento, tampoco servicios públicos como el gas por tubería. Es por esto que las investigaciones y el uso del lactosuero como bioinsumo para la producción de gas cobra gran relevancia. Estudios realizados en Ecuador para incrementar la producción de biogás emplearon una combinación de material vegetal enriquecido con lactosuero, observando que la mayor producción de biogás se obtuvo al combinar la fibra vegetal con un 25 % de lactosuero. Esto se debe a los aportes

nutricionales que el lactosuero puede brindar al metabolismo celular durante la descomposición y emisión de los gases (Moreno, 2020).

Entre las aplicaciones gastronómicas en las que puede usarse el lactosuero está la **elaboración de pan**, el que es uno de los productos alimenticios más consumidos en Ecuador, por lo que es una vía excepcional para la incorporación de ingredientes funcionales que mejoren la salud pública. De acuerdo con esto, el pan debería tener un índice glucémico bajo, ser fuente de proteína, antioxidantes, vitaminas y minerales, y como se ha discutido en secciones anteriores, el lactosuero cumple con estas características. Por esta razón, se han realizado estudios para incorporar al pan las propiedades de la quinua y el lactosuero, consiguiendo que este podría reemplazar el agua por completo, además de darle un sabor más satisfactorio al enmascarar sabores no deseados como el de la quinua, sin llegar a afectar el pH, la altura y la textura del pan (Salazar et al., 2017).

Las **fórmulas infantiles** a base de lactosuero son un nuevo producto que se encuentran en desarrollo en Ecuador. Esta necesidad surge por los altos niveles de desnutrición crónica debido al bajo nivel socioeconómico y por la alta tasa de importación de suplementos alimenticios costosos para niños. Estas investigaciones abren la posibilidad de reducir en un 68 % los gastos en insumos, ya que se elaboraría a partir del WPC suministrado por las empresas nacionales. Esto indica la necesidad social que tiene Ecuador de elaboración de suplementos alimenticios infantiles y que sean accesibles a la población de bajos recursos (Álvarez & Paredes, 2016).

Es evidente que la sociedad ecuatoriana necesita mayor conocimiento sobre los múltiples beneficios del lactosuero desde el punto de vista nutricional, de sus propiedades funcionales y oportunidad de negocios. De igual manera, es necesario mejorar la calidad de la producción de quesos ya que en muchos casos se realiza de forma empírica y con las mínimas condiciones para su procesamiento, afectando las propiedades del lactosuero. En este sentido, también se hace necesario dar valor agregado al lactosuero producido en las queserías, distintas a la elaboración de alimentos para cerdos o bebidas artesanales de baja calidad. Por todo ello, se deben incentivar alternativas para el desarrollo de nuevos productos que satisfagan las necesidades proteicas y nutricionales de la población con productos de primera calidad (Cortez Latorre, 2018).

En el trabajo realizado por Guevara y León, (2019) se propuso elaborar una bebida reemplazando el agua empleada en este tipo de preparaciones por lactosuero para aprovechar este remanente de la industria quesera. Esta alternativa promueve el uso de ingredientes que fortifican la preparación, permitiendo además mejorar el ingreso de los pequeños y medianos productores de

la industria quesera mediante el empleo de economía circular, contribuyendo además a mitigar la desnutrición crónica infantil (DCI) que en el Ecuador es alarmante toda vez que afecta al 27,2 % de los niños menores de 2 años, por lo que es considerada "uno de los principales problemas de salud pública del país" (Unicef, 2021). La puesta en práctica de este tipo de alternativas además de dar valor agregado a este subproducto mediante el aprovechamiento de su valor nutricional supone además la reducción del impacto ambiental que produce el desecho del lactosuero cuando es vertido al medio sin tratamiento alguno.

2.12. La *Colada* como bebida de la cultura gastronómica ecuatoriana

La *Colada* es una bebida tradicional andina consumida en Ecuador, Perú y Bolivia. En la actualidad existen algunas diferencias entre las tradiciones de los países, pero el origen de esta bebida es el mismo, la cual se elaboraba a partir de maíz negro/morado molido. Antropólogos ecuatorianos mencionan que la bebida tiene un origen prehispánico y se elaboraba a partir del maíz negro y sangre de llama o plantas (para acentuar el color) la cual se llamaba sanco, sin embargo, esta es una de las tres versiones, en las otras el color se le daba con achiote, conociéndose como *uchucuta* y la tercera con frutos rojos y morados como las fresas y moras. En los procesos de transculturización y la modificación de algunos ingredientes, como eliminar la sangre de llama e incorporar azúcar, surge lo que actualmente se conoce como "colada morada". Esta bebida es la más cercana a la bebida originaria y tradicional de los indígenas de la sierra de Ecuador utilizada en rituales (Villareal, 2014).

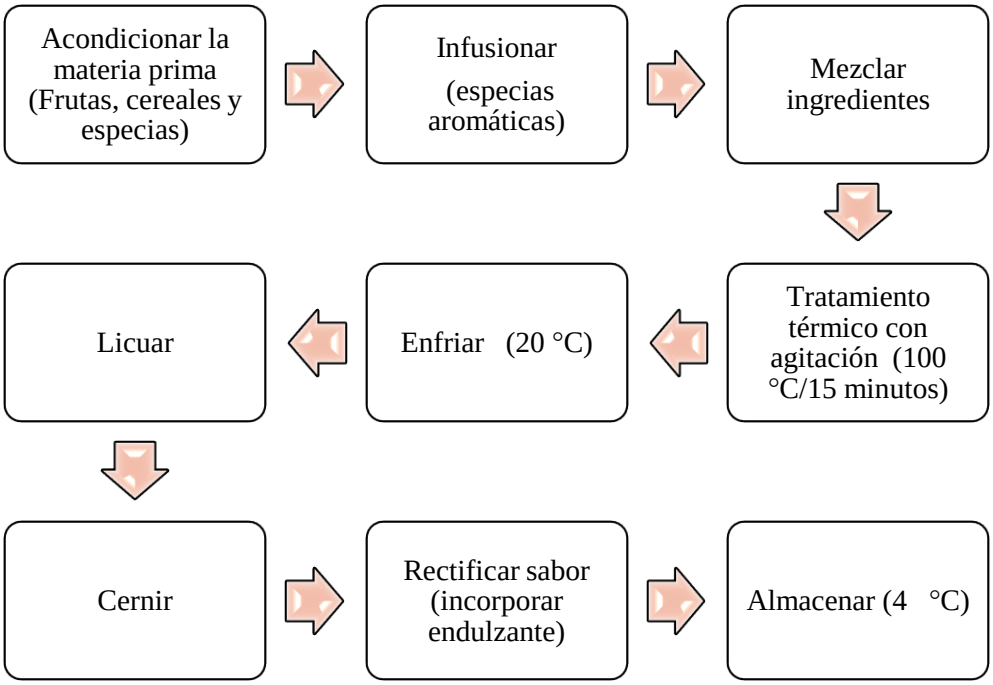
La *Colada* morada (*yana api*), conocida originalmente como Sanco (Figura 9), es una mazamorra de maíz morado/negro. Esta bebida forma parte de un banquete ritual elaborado a partir de frutas, y especias aromáticas que le confieren su sabor característico. Los ingredientes con los que se hacen las coladas forman parte de la medicina ancestral del Ecuador (Machado et al., 2020). Esta bebida se acostumbra a utilizar en cultos, basada en ritos indígenas ancestrales; su función es calmar la sed de los difuntos al ser derramada en la tierra. En estos ritos también se ha encontrado la existencia de otros tipos de coladas, como la colada de las almas (*Runauchu*) la cual se elabora a partir del maíz blanco (Trujillo, 2019). La celebración ocurría en época de lluvia en un periodo llamado *Aya Marcay Quilla*, hoy en día se realiza cada 2 de noviembre, en el día de los difuntos, donde las personas, principalmente los indígenas, acuden a los campos santos o cementerios en las regiones andinas de Ecuador, donde ofrendan alimentos (Bastidas, 2010).

Figura 9. *Colada morada*

Nota: Tomado de https://www.turismo.gob.ec/colada-morada-una-bebida-con-sabor-a-memoria/

En la actualidad existen diversos tipos de *coladas* y diferentes combinaciones posibles, hasta existen ingredientes de origen animal (Bustos, 2018). La colada pasó a ser la denominación de una bebida, no a base de sus ingredientes originarios sino del producto o líquido espeso, producido de la cocción de una determinada harina proveniente de un cereal, y que pasa por un proceso de colado (o tamizado) de donde adquiere su nombre (Figura 10). Es importante señalar que las coladas son bebidas a base de harinas, principalmente de cereales a los que se le añade frutas y especias a la preparación para adquirir sabor. La modificación paulatina de los ingredientes tradicionales de la colada morada ha permitido elaborar diversas bebidas culturalmente aceptadas y con mayor aporte de nutrientes. En este sentido, investigaciones realizadas arrojan que el 50 % de los padres que no adicionan suplementos alimenticios en la dieta de los niños consideran que la colada es capaz de brindar los nutrientes adicionales que los niños necesitan (Álvarez & Paredes, 2016).

Figura 10. *Flujo del proceso de elaboración de las Coladas*



Las *Coladas* que se elaboran en la actualidad no se preparan a base de harinas de cereales estrictamente, también se han incorporado en su elaboración granos, tubérculos, hortalizas o frutas, con un aditivo dulce que lo proporciona la panela, que es un azúcar no refinado, compacto (en forma de bloques) que se obtiene de la caña de azúcar. De forma ocasional se preparan con leche. En esta diversidad también se encuentra la colada de avena que localmente se conoce como "Quaker", denominación concedida por la marca de la avena, así como otras variantes como la *colada* de cebada, colada de frutas, *colada* de machika, *colada* de zambo, *colada* de harina de plátano, *colada* de oca, *colada* de pulcre, *colada* de mote y la *colad*a de maicena y leche.

Dado el arraigo popular que esta bebida tiene entre la población del Ecuador, en esta Tesis Doctoral se ha desarrollado una modificación de esta, introduciendo como ingrediente el lactosuero, con la finalidad de aprovechar sus ventajas nutricionales, reforzar la economía circular y estimular la salud de la población, especialmente la de niños y adolescentes.

Capítulo III

Material y métodos

Capítulo III. Material y métodos

3.1. Muestras

3.1.1. Lactosuero procedente del Ecuador

Las muestras de lactosuero fresco de origen ecuatoriano fueran recolectadas durante dos épocas del año 2019; las primeras muestras se colectaron durante el **invierno** (mes de enero, clima cálido y lluvioso), mientras que las segundas muestras fueron colectadas durante el **verano** (mes de julio, temperaturas más frescas y precipitaciones escasas). Estas muestras se denominarán en adelante **LEc-I** y **LEc-V**, respectivamente. La leche utilizada para el proceso productivo del queso fresco fue leche entera y cruda procedente de vacas de la raza Brahman. La recolección de las muestras se realizó en el centro de acopio Diprolac ubicado en el cantón Balzar de la Provincia del Guayas (Ecuador), región en la que se concentra la mayor producción quesera en esta provincia.

El lactosuero dulce se obtuvo una vez precipitada la caseína, tras la acción enzimática del cuajo, a una temperatura de 37°C. Una vez obtenidas las muestras fueron enfriadas a 4°C, acondicionadas y sometidas al proceso de liofilización (liofilizador Virtis Genesis, SQ25EL) hasta su posterior uso.

3.1.2. Lactosuero procedente de España (Granada)

Las muestras de lactosuero fresco de origen español (que denominaremos **LEs**) se colectaron durante la época de otoño del mismo periodo. La recolección de las muestras se realizó en la granja lechera “Las Maravillas” ubicada en la ciudad de Granada (España). La leche utilizada para el proceso productivo del queso fresco fue leche entera de vacas de la raza Holstein, cruda e inoculada con bacterias acido lácticas, responsables de las características organolépticas de los quesos que se expenden en la granja. La toma de muestras del lactosuero se realizó bajo las mismas condiciones consideradas para el lactosuero ecuatoriano y se les realizó el mismo tratamiento, esto es liofilización y almacenamiento en cámaras de refrigeración.

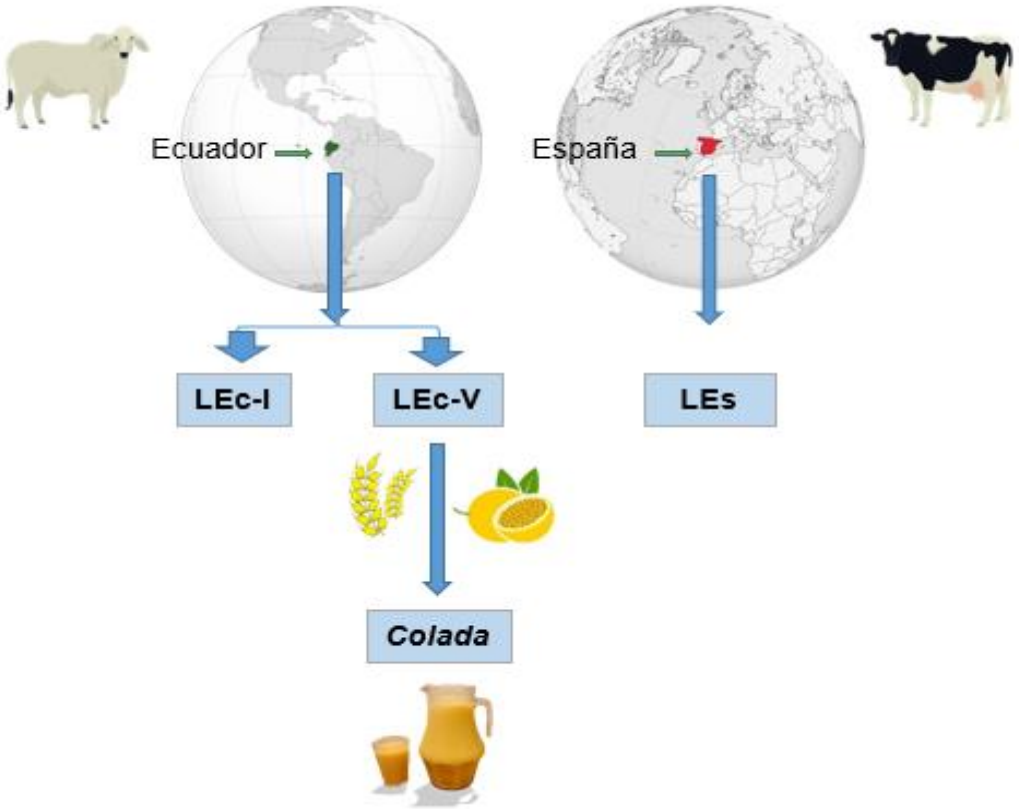
3.1.3. Bebida a partir de lactosuero (*Colada*)

La *Colada* se elaboró a partir de lactosuero dulce procedente del Ecuador obtenido durante la época de verano (LEc-V); los demás ingredientes de la fórmula: el maracuyá, la cebada y las especias utilizadas en la preparación de la *Colada* se adquirieron en los mercados locales de la

ciudad de Guayaquil (Ecuador). Para la elaboración de la bebida se siguió el protocolo tradicional para la preparación de *Coladas* elaboradas en el país a partir de la mezcla de cereales y frutas utilizado de manera regular en la cultura gastronómica ecuatoriana, con la excepción de que el agua fue reemplazada por lactosuero.

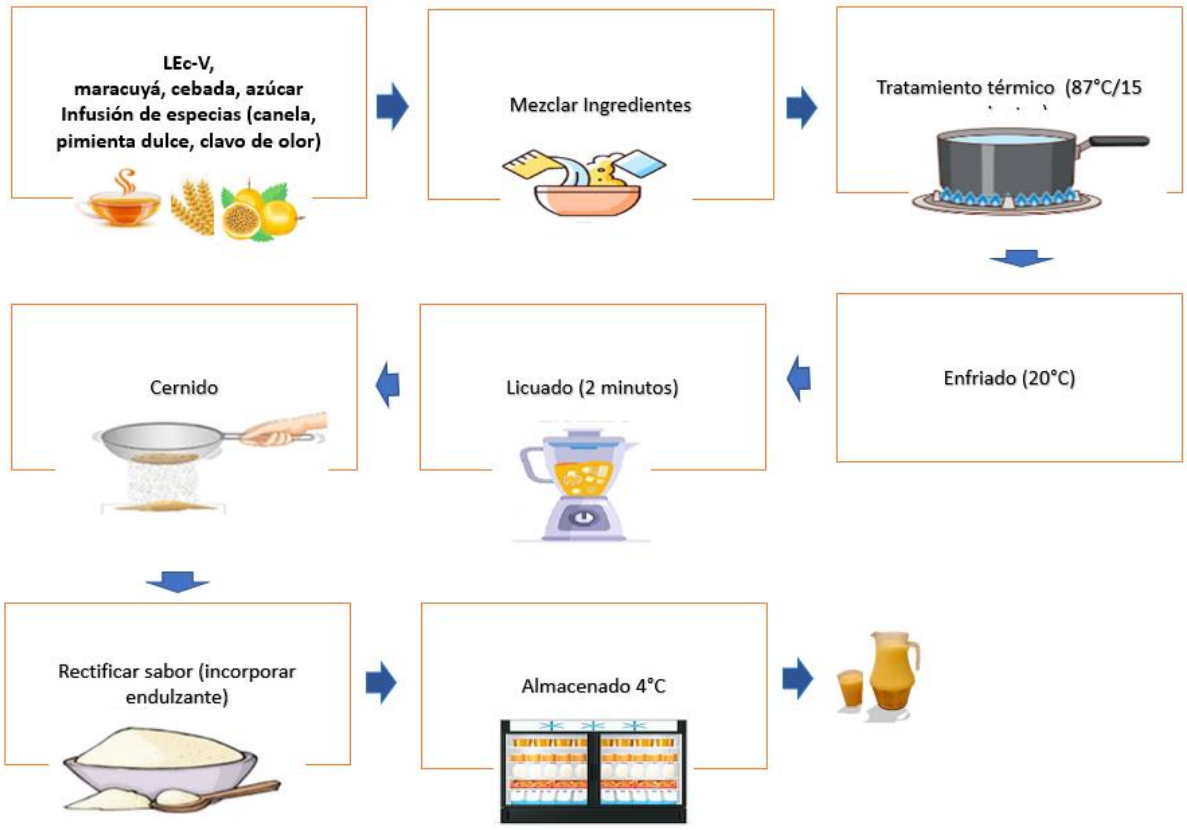
La Figura 11 ofrece un esquema de las muestras objeto del estudio y su procedencia, mientras que la Figura 12 muestra el proceso de elaboración de la *Colada.*

Figura 11. *Muestras objeto de estudio y su procedencia*



Nota: LEc-I, lactosuero de Ecuador de invierno; LEc-V, lactosuero de Ecuador de verano; LEs, lactosuero de España.

Figura 12. *Proceso de elaboración de la Colada*



Se realizó una evaluación sensorial previa a la *Colada* con diferentes formulaciones para seleccionar las proporciones de los ingredientes, de manera que la bebida fuera aceptada por los consumidores (ver "Evaluación sensorial" descrita posteriormente). Finalmente, se hizo la formulación considerando 70 % de lactosuero dulce (pH 6,55), 10 % de cebada, 4 % de sacarosa, 15 % de zumo de maracuyá y 1 % de especias aromáticas (pimienta dulce, clavo de olor y canela) (Tabla 13). Al lactosuero pasteurizado se adicionaron los demás ingredientes de la fórmula y se mezclaron homogéneamente, la mezcla se trató térmicamente a 87°C durante 15 minutos con agitación constante, se enfrió a temperatura ambiente, se filtró, se liofilizó y fue vertida en recipientes herméticos, protegida de la luz y conservada bajo condiciones de refrigeración en los laboratorios del Departamento de Nutrición y Producción Animal Sostenible de la Estación Experimental del Zaidín del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Armilla (Granada-España), centro de investigación donde se realizó la fase experimental de esta investigación.

Tabla 13. Formulación de la *Colada*

Ingredientes	%
Lactosuero	70
Cebada	10
Maracuyá	15
Azúcar	4
Especias aromáticas	1

3.2. Determinaciones analíticas

A continuación, se describen de forma detallada las determinaciones analíticas realizadas en la presente memoria de tesis.

Los productos químicos utilizados para realizar las determinaciones fueron todos de alta pureza o grado de reactivo analítico. Se utilizó agua desionizada bidestilada (sistema de purificación Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA). El metanol fue proporcionado por VWR (Barcelona, España), el bicarbonato de sodio, el acetato de sodio, el ácido gálico y el ácido clorhídrico fueron adquiridos a Merck (Darmstad, Alemania). Reactivo folin-Ciocalteau, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico (Trolox), ácido 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), amilasa (A1031), pepsina (P7012), pancreatina (P7545), sales biliares, dodecil sulfato de sodio (SDS), o-ftaldialdehído (OPA), DL-ditiotreito (TDT), L-serina, (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinee ácido thanesulfónico) (HEPES), terc-butilhidroperóxido (t-BOOH), los medios de cultivo celular, productos químicos de grado de cultivo celular y estándares de ácidos grasos (C15: 0 y CRM47885 Supelco 37 Component FAME Mix) se compraron a Sigma (Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, EE. UU.). El ABTS se obtuvo de Amresco (Solon, USA). El cloruro de 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) y hierro (III) para el ensayo de potencia reductora férrica (FRAP) se adquirieron a Fluka Chemicals (Fluka Chemicals, Madrid, España).

3.2.1. Composición nutricional

Las determinaciones analíticas se realizaron en materia liofilizada. Se llevaron a cabo en los laboratorios del Departamento de Nutrición y Producción Animal Sostenible de la Estación Experimental del Zaidín del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Armilla

(Granada-España); los análisis se realizaron por triplicado utilizando métodos oficiales (AOAC, 2000).

La materia seca y el contenido total de cenizas se realizaron mediante métodos gravimétricos, en estufa a 105 °C durante 24 horas para la determinación de la humedad (método 934.01) y posteriormente en horno mufla a 555 °C durante 5,5 horas hasta la obtención de cenizas blancas (método 942.05).

3.2.1.1. Determinación de proteína

Se determinó el contenido de proteína de las muestras con un analizador TruSpec CN (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA), que permite analizar el Nitrógeno (N) total mediante el método Dumas (990.03 de AOAC, 2005). En este método se lleva a cabo la combustión completa de la muestra a 950 °C con alta presión de oxígeno, reducción química de los óxidos de nitrógeno a nitrógeno molecular y la detección de éste por conductividad térmica; la cuantificación se realizó mediante el uso de patrones de referencia que tenían distinta concentración de nitrógeno. La proteína bruta se calculó multiplicando el nitrógeno total obtenido por el factor 6,38.

3.2.1.2. Determinación de grasa

La determinación del contenido de grasa de las muestras se realizó a partir de la extracción sólido-líquido mediante el método Soxhlet (ISO 1443) con un equipo Soxhlet (PRECIS-BAT S-148 · 200). Se utilizó como solvente la mezcla de cloroformo-metanol en proporciones 2:1 (AOAC, 2000). Para el proceso se pesaron en una balanza de precisión 2 g de las muestras liofilizadas y homogeneizadas dispuestas en un cartucho de papel filtrante que se introdujo en la cámara de extracción que estaba conectada por una parte a los matraces de destilación y en la otra parte al refrigerante; tras este proceso se dejaron las muestras en maceración durante 24 horas, después del tiempo de reposo se procedió a la extracción mediante el calentamiento del solvente a temperatura controlada de 80 °C durante 7 horas, tiempo durante el cual el solvente caliente provocó la extracción de la grasa contenida en las muestras. El proceso de vaporización, condensación, extracción y evacuación se repitió varias veces, finalmente el extracto se concentró en los matraces, que se llevaron posteriormente a la estufa durante 24 horas a una temperatura de 60 °C, terminado este proceso de secado se dispusieron los matraces en el desecador y se pesaron para calcular el porcentaje de grasa de la muestra.

3.2.1.3. Determinación de minerales

El contenido mineral de las muestras se analizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Haro et al., (2020). Inicialmente, se realizó la mineralización húmeda de las muestras mediante tratamiento ácido a elevadas temperaturas (180-200 °C) en un baño de arena (J.R. Selecta, S.A., COMBIPLAC, nº serie 0373930), inicialmente con HNO_3 durante aproximadamente 1 hora, y posteriormente con una de mezcla HNO_3:$HClO_4$ 1:4 hasta conseguir la total eliminación de la materia orgánica. Los minerales analizados fueron calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na), potasio (K), hierro (Fe) y zinc (Zn) mediante espectrofotometría de absorción atómica de llama (FAAS) en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Analyst 700 (Norwalk, CT, USA). El fósforo total (P) se determinó colorimétricamente a 820 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1700, Modelo TCC-240A, Columbia, EE.UU.) mediante el procedimiento de vanadomolibdato (AOAC, 2000).

Se prepararon soluciones estándar de todos los minerales de concentración 1 g/L utilizando ampollas Tritisol (Merck, Darmstadt, Alemania), a partir de las cuales se obtuvieron las correspondientes curvas patrón. Para la realización de la curva patrón de fósforo se utilizó KH_2PO_4 (fosfato monopotásico). Para las determinaciones de calcio y magnesio se adicionó lantano al 0,3 % ($LaCl_3$, Merck) tanto en las muestras como en los estándares para evitar posibles interacciones. Se utilizaron patrones externos de referencia certificados (European Commission, Reference Materials Unit, Geel, Belgium) para evaluar la exactitud de las determinaciones (leche en polvo, ERM-BD150 y harina de centeno, ERM-BC381). El material utilizado para el análisis mineral se lavó con ácido nítrico de 10 mM y agua Milli-Q.

3.2.1.4. Determinación de energía

La determinación de energía se llevó a cabo en una bomba calorimétrica isoperibólica (Modelo 1356 Parr Instrument Company Moline, IL EE. UU).

La energía bruta (EB) de la muestra, o su calor de combustión (expresada en cal/g), se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$EB = \frac{(k(TF - Ti) - a)}{p}$$

Donde k es la capacidad de calor efectiva del sistema, una constante que indica el número de calorías necesarias en el equipo para aumentar 1°C la temperatura del agua del vaso calorimétrico (se determina por combustión de un comprimido de ácido benzoico puro, de capacidad calorífica

conocida); a es la suma de los contenidos energéticos del hilo metálico y de la bolsa de polietileno utilizados en el procedimiento; p es el peso de la muestra en gramos, Tf es la temperatura final y Ti la temperatura inicial.

3.2.2. Digestión *in vitro*

La digestión *in vitro* de las muestras de lactosuero y de la colada se realizó al menos por triplicado para cada uno de los parámetros estudiados (hidrólisis de proteínas, determinación de minerales, estudios de absorción en células, determinación de péptidos liberados) tratando de simular las condiciones fisiológicas de pH y temperatura con el empleo de enzimas específicas, de acuerdo con el método de INFOGEST (Brodkorb et al., 2019; Minekus et al., 2014), (Figura 13). El volumen y la composición de los fluidos de digestión simulada: fluido salival simulado (SSF), fluido gástrico simulado (SGF) y fluido intestinal simulado (SIF) se muestran de forma detallada en la Tabla 14, y las enzimas utilizadas en la Tabla 15.

Tabla 14. *Fluidos de digestión simulada*

	Concentraciones stock		**SSF[1] (pH 7)**		**SGF[2] (pH 3)**		**SIF[3] (pH 7)**	
			solución Stock para 0.4 L (1.25×)	**Concentración final**	**solución Stock para 0.4 L (1.25×)**	**Concentración final**	**solución Stock para 0.4 L (1.25×)**	**Concentración final**
	g/L	**M**	**mL**	**mM**	**mL**	**mM**	**mL**	**mM**
KCl	37.3	0.5	15.1	15.1	6.9	6.9	6.8	6.8
KH_2PO_4	68	0.5	3.7	3.7	0.9	0.9	0.8	0.8
$NaHCO_3$	84	1	6.8	13.6	12.5	25	42.5	85
NaCl	117	2	-	-	11.8	47.2	9.6	38.4
$MgCl_2(H_2O)_6$	30.5	0.15	0.5	0.15	0.4	0.12	1.1	0.33
$(NH_4)_2CO_3$	48	0.5	0.06	0.06	0.5	0.5	-	-
HCl		6	0.09	1.1	1.3	15.6	0.7	8.4
Incorporar antes de su uso								
$CaCl_2(H_2O)_2$	44.1	0.3	0.025	1.5	0.005	0.15	0.04	0.6

[1]SSF: Fluido salival simulado, [2]SGF: Fluido gástrico simulado, [3]SIF: Fluido intestinal simulado.

Tabla 15. *Enzimas empleadas en la digestión simulada*

Enzima	Proveedor	Referencia	Lote No.	Actividad (unidades/mL)
Amilasa	Sigma Aldrich	A1031	SLBZ9474	75 IU
Pepsina	Sigma Aldrich	P7012	101M7001V	3.560 U
Pancreatina	Sigma Aldrich	P7545	SLBD0640V	100U
Sales biliares	Fluka	B8756-50G	SLBF8811B	2.40 mmol

La actividad de las enzimas empleadas en el ensayo se determinó según Brodkorb et al., (2019). Para la digestión *in vitro*, las muestras liofilizadas se resuspendieron en un volumen final de 5 ml con agua Milli Q, teniendo en cuenta el porcentaje de materia liofilizada respecto a la materia fresca en cada una de ellas. Las digestiones se realizaron por triplicado.

3.2.2.1. Fase oral

Se tomaron 5 ml de muestra resuspendida y se añadieron 4 ml de fluido salival simulado, 25 µL de 0.3M $CaCl_2$, y 0,475 ml de agua Milli-Q. En la digestión de la *Colada* se adicionaron 8 mg de amilasa (actividad 75 IU/ml) disuelta en 0,51 ml de agua Milli-Q. Las mezclas se incubaron durante 2 min a 37 °C con agitación orbital.

3.2.2.2. Fase gástrica

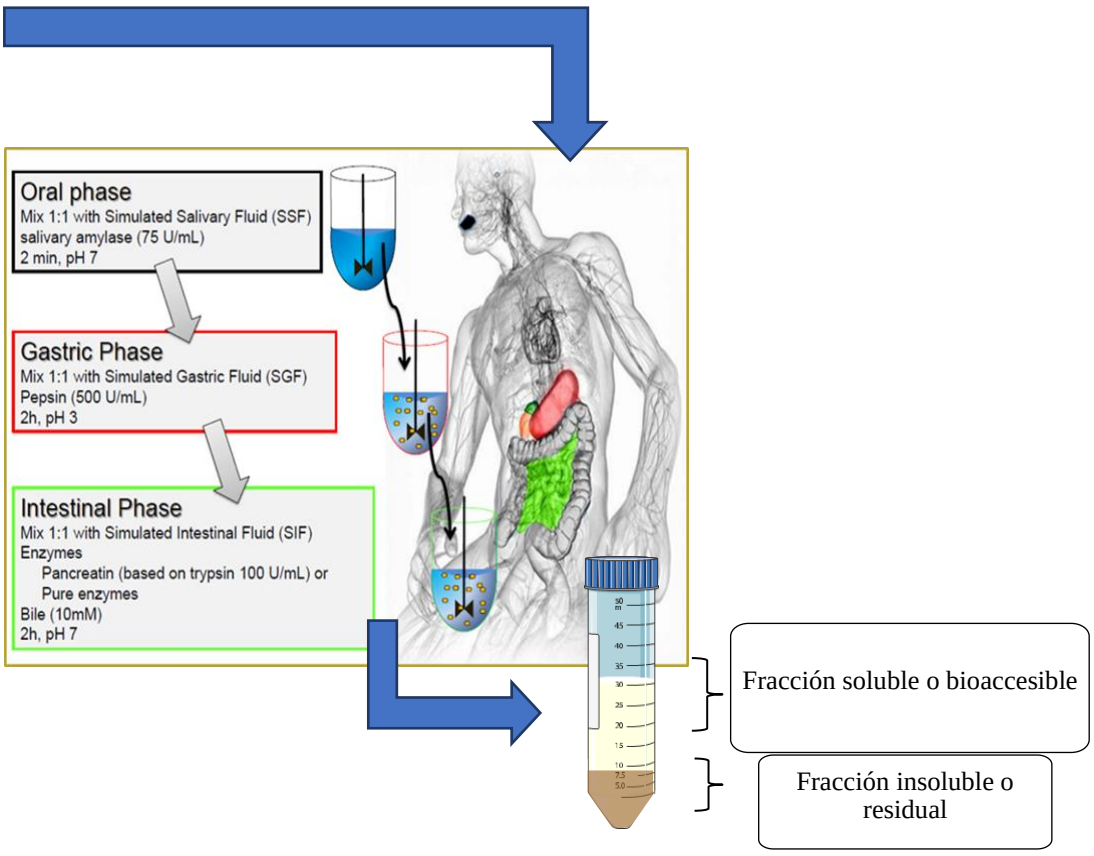
Se incorporaron 8 ml de fluido gástrico simulado, 5µl de 0.3M $CaCl_2$, 1,46 ml de agua Milli-Q, 0,5 ml de pepsina (actividad 3560 U/mg) disuelta en agua Milli-Q, 0,038 ml de HCl 8N, se ajustó el pH a 3 y las muestras se incubaron durante 2 horas a 37 °C con agitación orbital.

3.2.2.3 Fase intestinal

Se añadieron 8,5 ml de fluido intestinal simulado, 5 ml de pancreatina (actividad 100U/ml), 2,5 ml de sales biliares, 40 µL de 0.3M $CaCl_2$, 3,9 ml H_2O Milli-Q, 21 µL de NaOH. El pH se ajustó a 7, se dejó incubar durante 2 horas con agitación orbital.

Tras la digestión *in vitro* las muestras fueron sumergidas inmediatamente en nitrógeno líquido para frenar la actividad enzimática. A continuación, se descongelaron y se centrifugaron a 12,000 × *g* en ambiente refrigerado (4°C) durante 20 min, para separar la fracción soluble o bioaccesible (FB) de la fracción residual (FR). Se realizaron controles de digestión en las mismas condiciones de fluidos digestivos y adición de enzimas, pero sustituyendo las muestras por agua Milli-Q. Las fracciones obtenidas tras la digestión se conservaron protegidas de la luz a -80 °C en atmósfera de nitrógeno hasta su posterior análisis. Para los experimentos en cultivos celulares y el análisis de péptidos, se utilizaron alícuotas de la FB que se filtraron previamente con filtros de corte de 30 kDa (Amicon ultra-15 15mL, Millipore) con la finalidad de eliminar las enzimas intestinales residuales.

Figura 13. *Digestión in vitro de las muestras*



Nota: Tomado y adaptado de Brodkorb et al., (2019)

3.2.3. Actividad antioxidante y polifenoles totales

La capacidad antioxidante y el contenido total de polifenoles (PFT) se determinaron en las muestras de lactosuero y *Colada* antes de la digestión y en las fracciones bioaccesible y residual obtenidas tras la digestión *in vitro*. Para el efecto, se utilizaron los métodos ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) para determinar su capacidad de neutralizar radicales libres y el método FRAP (del inglés *ferric reducing antioxidant power*) para evaluar el poder reductor de las muestras. El contenido de polifenoles totales se valoró por el método Folin-Ciocalteu. Estas determinaciones se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito por Seiquer et al., (2015), utilizando para las correspondientes lecturas un lector de placas (Victor X3, Waltham, MA, USA).

3.2.3.1. Extracto químico

Previo al análisis de actividad antioxidante y el PFT, se realizó una extracción química en las muestras no digeridas y en la FR obtenida tras la digestión simulada. Para ello se mezclaron 250 mg de la muestra, o la FR completa, con 2,5 mL de metanol/agua (50:50 v/v, pH 2), se agitó durante 60 min a 220 rpm (agitador circulante OVAN, Barcelona, España) y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min a 4 °C. Tras retirar el sobrenadante, se realizó una segunda extracción, agregando al residuo 2,5 mL de acetona/agua (70:30, v/v). Los sobrenadantes se combinaron y se usaron para las determinaciones. La FB se utilizó directamente.

3.2.3.2. Ensayo ABTS

El radical $ABTS^{+}$ se obtuvo haciendo reaccionar una solución madre de ABTS 7 mM con persulfato de potasio 2,45 mM y dejando que la mezcla reposara en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12-16 horas. La solución de ABTS se diluyó con metanol hasta una absorbancia de 0,70 ± 0,02 a 750 nm. En placas multipocillo, se mezclaron 280 µl de la solución de ABTS con 20 µl de los extractos químicos o la FB, y se incubó durante 20 minutos en oscuridad. La absorbancia se midió a 750 nm. Para la curva de calibración se utilizaron soluciones metanólicas de concentraciones conocidas de Trolox (rango de concentración de 0.01-0.4 mg/mL) Los resultados se expresaron en mM de equivalentes de Trolox por Kg de muestra.

3.2.3.3. Ensayo DPPH

Se mezclaron alícuotas de 50 µL de las muestras con 250 µL de solución metanólica de DPPH (74 mg/L). La mezcla se incubó durante 60 minutos protegida de la luz y la absorbancia se midió a 520 nm. La curva de calibración se determinó con una concentración de 0.01-0.1 mg/mL de Trolox; los resultados se expresaron en mM de equivalentes de Trolox por Kg de muestra.

3.2.3.4. Ensayo FRAP

Para determinar la capacidad reductora de hierro de las muestras, se preparó el reactivo FRAP con 2,5 ml de una solución de TPTZ (complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina)10 mM en HCl 40 mM, más 2,5 ml de $FeCl_3 \cdot H_2O$ 20 mM y 25 ml de tampón acetato 0,3 M, pH 3,6. Se tomaron 280 µl de reactivo FRAP y se mezclaron con 20 µL de la muestra, se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. La absorbancia se midió a 595 nm. La capacidad reductora de las muestras se determinó frente a una curva de calibración de Trolox (0,01-0,2 mg/ mL; los resultados se expresaron en mM de equivalentes de Trolox por Kg de muestra.

3.2.3.5. Contenido total de polifenoles (PFT)

En el análisis de los polifenoles totales, se tomaron alícuotas de 10 µL de las muestras y se mezclaron son 10 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu, se dejaron reposar durante 3 minutos; se agregaron a la mezcla 200 µL de carbonato de sodio (75 g/ L) y 30 µL de agua Milli-Q, se dejó reposar durante 60 minutos protegida de la luz. Se midió la reacción a 750 nm frente a una curva de calibración de ácido gálico (0-200 mg/L). Los resultados se expresaron en mM de equivalentes de ácido gálico por Kg de muestra.

3.2.4. Ensayos en cultivos celulares

Las células Caco-2 fueron compradas a la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) a través del Banco de Células de la Universidad de Granada (Granada, España), en el pase número 48, y fueron utilizadas para los ensayos que se describen en los pases 53-60. Las células se mantuvieron en frascos de poliestireno de 75 cm^2 (Costar, Cambridge, MA, USA) mediante pases sucesivos, alojadas a 37 °C en un incubador (modelo 5510E, NuAire, Plymouth, MN), en atmósfera 95:5 aire/CO_2, con una humedad del 90 %. Se utilizó como medio de cultivo el medio esencial

mínimo modificado de Dulbecco (DMEM) rico en glucosa (Sigma D-5648), con suero bovino fetal inactivado por calor (SBF) (10 %), $NaHCO_3$ (3,7 g/L), aminoácidos no esenciales (1 %), HEPES (15 mM), insulina bovina (0,1 UI/mL) y solución antibiótico-antimicótico al 1 %. Todas las manipulaciones de los cultivos celulares se llevaron a cabo en condiciones de asepsia y bajo campana de flujo laminar (modelo AV-100 Telstar, España) con el fin de mantener en lo posible las condiciones estériles.

Los cultivos celulares se utilizaron, por una parte, para evaluar el potencial antioxidante de las muestras digeridas a nivel celular y por otra, para realizar los ensayos de absorción de minerales a través de la monocapa de células. El marcador antioxidante estudiado fue el efecto sobre la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en las células Caco-2, según el procedimiento descrito por Borges at al., (2019).

Ambos experimentos se llevaron a cabo con la fracción bioaccesible obtenida tras la digestión *in vitro* de las muestras de lactosuero y *Colada*, que se utilizó con DMEM libre de SBF en proporción 1: 1 (*v / v*), ya que el ensayo previo utilizando el método colorimétrico MTT (bromuro de 3-(4,5-dime thylthiazol-2-yl)-2.5-diphenyltetrazolium, Roche, Mannheim, Alemania) mostró que la viabilidad celular fue la idónea (> 90%) en tales condiciones.

3.2.4.1. Medida de la generación de ROS

La determinación de la generación de ROS se realizó mediante el ensayo de diclorofluorescina (DCFH), y se estudió tanto la respuesta celular en condiciones basales como el posible efecto protector frente a un estrés oxidativo inducido. En presencia de ROS, la diclorofluorescina es oxidada a fluoresceína, un compuesto altamente fluorescente pudiéndose utilizar la fluorescencia intracelular como un índice para cuantificar el total de estrés oxidativo en las células.

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos 10×10^4 células/ml (400 µL/pocillo) y se dejaron crecer durante 48 horas. A continuación, se retiró el medio gastado y las células se preincubaron con la FB de las muestras durante 2 h. Luego, las células se trataron con DCFH 20µM y se incubaron durante 1 h. Se eliminó la DCFH y se agregó a los pocillos medio de cultivo (para mediciones basales) o terbutil-hidroperóxido (*t-BOOH*) 10 mM (para inducir la oxidación). La absorbancia se midió a una longitud de onda de excitación de 485 nm y emisión de 535 nm, a 37 °C durante 0-90 min (Victor X3 (Waltham, Massachusetts, EE. UU.). La DFCH en presencia

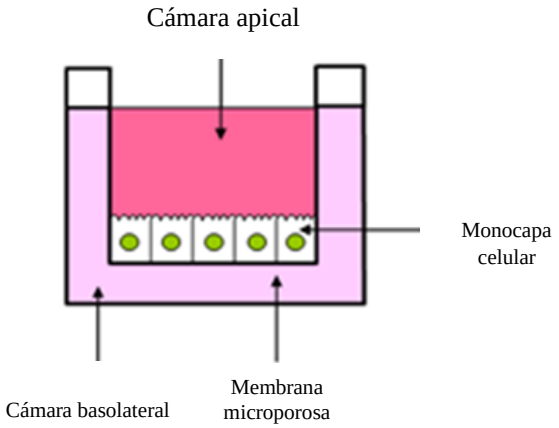
de ROS se convierte en diclorofluoresceína (DCH), que emite fluorescencia. Los resultados de la generación de ROS se expresaron como unidades de fluorescencia.

3.2.4.2. Ensayos de absorción intestinal

Las células se sembraron en placas bicamerales (Transwell, 24-mm diámetro, 4.7-cm^2 área, 3 µm tamaño poro, Costar) a una densidad de 3×10^5 células/pocillo, con 2.5 ml de medio de cultivo en el compartimento basolateral y 1.5 ml en el compartimento apical, tal y como se describe en Seiquer at al., (2015), Figura 14. El medio se cambió cada 2 días y los experimentos se realizaron tras 21 días desde la siembra. Durante este período, se controló periódicamente la integridad y confluencia de la monocapa mediante el transporte del colorante rojo fenol. Para ello, se aspiró el medio de las placas bicamerales lavando ambas cámaras con buffer de transporte (130 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, 5 mM glucosa y 50 mM HEPES pH 7), exento de rojo fenol, se añadieron 2.5 ml de buffer en la cámara basolateral y 1.5 ml de medio de cultivo, que contiene rojo fenol, en la apical, manteniendo las células en el incubador a 37 °C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se midió la permeabilidad del colorante mediante lectura de la absorbancia a 558 nm, utilizando aquellos pocillos que presentaban datos inferiores al 5 %.

Para los ensayos de absorción, se retiró el medio gastado de ambas cámaras y se lavó con solución de Hank (HBSS, del inglés Han´ks Balanced Salt Solution). En las cámaras basolaterales se adicionaron 2.5 ml de buffer de captación y en las apicales 1.5 ml de la FB de las muestras, incubándose durante 2 horas a 37 °C. Tras este período, se recogió el contenido de la cámara basolateral y se reservó para el posterior análisis mineral. Además, tras el experimento se retiraron los filtros con las monocapas de células y fueron utilizados para la determinación del contenido mineral, previa digestión húmeda según lo descrito en el apartado 3.2.1.3. La absorción y la captación mineral se expresaron en µg/pocillo y en porcentaje respecto a las cantidades iniciales adicionadas en las cámaras apicales.

Figura 14. *Esquema del ensayo de transporte*



Nota: Tomado de Seiquer et al., (2015)

3.2.5. Perfil de ácidos grasos (AG)

El análisis de los AG se realizó mediante cromatografía de gases, antes y después de la digestión *in vitro* de las muestras. Antes del análisis, se liofilizaron alícuotas de 10 mL de la FB (por triplicado) utilizando un liofilizador LyoQuest -85 (Telstar, Terrasa, España).

La grasa se extrajo con mezcla de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) según el método de (Folch et al., 1957), y los AG se metilaron según lo descrito en Kramer & Zhou, (2001), con ligeras modificaciones. La fracción lipídica extraída se metiló inicialmente utilizando NaOH/metanol (50 °C, 15 min) seguido de HCl/metanol (50 °C, 1 h) para la obtención de los ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG). El ácido pentadecanoico (C15:0) se utilizó como estándar interno. El perfil de ácidos grasos se determinó con un cromatógrafo de gases (Focus GC, Thermo Scientific, Milán, Italia) equipado con un inyector tipo split, un detector de ionización de llama y una columna capilar de silica gel de 100 m × 0, 25 mm × 0, 2 μm (SP 2560 Supelco, Bellefonte, PA, USA). La temperatura del programa fue desde 70 hasta 240 °C y el inyector y el detector se mantuvieron a 250 °C. El helio se utilizó como gas portador a un caudal de 1 ml/min. Los picos de los EMAG individuales se identificaron comparando sus tiempos de retención con los de los estándares (Supelco 37 Component FAME Mix) y los resultados se expresaron como el porcentaje relativo de cada ácido graso respecto al total de los identificados, calculado por normalización interna del área de pico cromatográfico.

3.2.6. Perfil de proteínas

El perfil de las proteínas de las muestras se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para analizar el perfil de proteínas de las muestras objeto de estudio, se resuspendieron 100 mg de cada una de las muestras liofilizadas en 1 mL de agua Milli Q; se prepararon diluciones 1:10 de las muestras de lactosuero, en cuanto a la bebida elaborada a partir de lactosuero la dilución fue 1:20. El perfil de proteínas tras la digestión se realizó a partir de 20 µl de la fracción soluble. Se realizó la electroforesis a las proteínas en condiciones desnaturalizantes. Las proteínas se redujeron con 2 µL de ditrioteitol (DTT), se añadieron 0,5 mL de antioxidante NuPAGE (Invitrogen NP0005) al tampón de la cámara interna para inhibir la reoxidación de las proteínas reducidas. Para la electroforesis se tomaron 20 µL de las muestras y se cargaron en geles prefabricados NuPAGE® Novex® 4-12 % Bis-Tris (Invitrogen NP0335BOX), se usaron 10 µL de ácido NuPAGE 2-N-morfolina-etano sulfónico (MES) como tampón de recorrido (Invitrogen NP0335). Las proteínas fueron teñidas con Colloidal Blue (Expedeon, Harston, Reino Unido). Para una estimación precisa del peso molecular, se incluyó en el gel con proteínas no teñidas el estándar Mark12TM (Invitrogen, LC5677, España) con proteínas en el rango de 2,5 a 200 kDa.

3.2.7. Perfil de aminoácidos

El análisis de aminoácidos (aa) se llevó a cabo cuantitativamente mediante el uso de un analizador de aminoácidos Biochrom 30 basado en cromatografía líquida de intercambio iónico y reacción continua post-columna con ninhidrina. El derivado de la ninhidrina eluido de la columna se monitoreó a 570 y 440 nm (prolina). El cromatograma resultante permitió determinar la identidad y la cantidad de aa presente en las muestras. El contenido total de aa de las muestras iniciales se analizó después de hidrolizar 50 mg con 5 ml de 6 N HCl. Las soluciones se sellaron en tubos bajo nitrógeno y se incubaron a 110 °C durante 24 h. Para analizar los aa azufrados se llevó a cabo la oxidación perfórmica de las muestras. Para determinar los aminoácidos liberados tras la digestión se precipitaron las proteínas no hidrolizadas del sobrenadante (fracción soluble) con TCA 20 % en proporción 1:1.

3.2.8. Grado de hidrólisis de las proteínas (GH)

La hidrólisis proteica en cada una de las fases de digestión se midió utilizando la metodología OPA (o-ftaldialdehído) con medida de la absorbancia a 340 nm según el método de Nielsen et al. (2001). El reactivo OPA se preparó disolviendo 7,62 g de di-Na-tetraborato decahidratado y 200 mg de Na-dodecil-sulfato (SDS) en 150 ml de agua desionizada. 160 mg de OPA se disolvieron en 4 ml de etanol; la solución OPA se transfirió a la solución mencionada anteriormente. Finalmente, se agregaron 176 mg de DTT a la solución, que se enrasó a 200 ml con agua desionizada. La concentración del grupo amino libre se determinó respecto a una curva de calibración utilizando l-serina (12,5-100 mg/L), ya que en las reacciones OPA la serina muestra una respuesta cercana a la respuesta media de los aminoácidos. El grado de hidrólisis proteica (GH %) se estimó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$GH\ \% = \frac{NH_2(final) - NH_2(inicial)}{NH_2(acida) - NH_2(inicial)} \times 100$$

Donde:

$NH_2(final)$: concentración de grupos amino libres en la muestra digerida después de cada fase.

$NH_2(inicial)$: concentración de aminoácidos libres antes de la digestión.

$NH_2(acida)$: contenido total de la muestra completamente hidrolizada en 6 N HCl a 110°C durante 24 h.

3.2.9. Peso molecular

El peso molecular de las fracciones solubles después de cada fase de digestión se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Las muestras se cargaron en una columna HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR (caudal de 0,3 mL/min) en 50 mM de fosfato buffer que contenía 150 mM de NaCl, pH 7,5. Se analizaron tres réplicas por muestra. La columna se calibró mediante estándares de peso molecular, cada uno en tampón de 2 ml de albúmina sérica bovina (63,5 kDa), ovoalbúmina (48,1 kDa), quimotripsinógeno A (20,4 kDa), ribonucleasa A (15,6 kDa), aprotinina (6,5 kDa), conalbúmina (1,3 KDa).

3.2.10. Identificación de péptidos

Los péptidos liberados después de la digestión *in vitro* se identificaron en la FB mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas (nanoLC-MS/MS). El análisis se realizó en un nanoLC (easy nanoLC II, Proxeon) conectado directamente a un espectrómetro de masas de trampa de iones (Amazon Speed ETD, Bruker) con una fuente de pulverización cautiva. La separación de péptidos se realizó en una columna C18 de 75 µm × 15 cm, 3 um, 100A (Acclaim PepMap100, Thermo Scientific) sobre un gradiente de acetonitrilo de 180 min de 5 a 30 % B (disolvente A: 0,1 % de ácido fórmico en agua; disolvente B: 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo) con un caudal de 300 nl/min. La trampa de iones se configuró para analizar los escaneos de reconocimiento en el rango de masa m / z 250 a 2500 en modo MS de resolución mejorada (velocidad 8,100 m / z / seg) y los 10 iones más intensos en cada ciclo de trabajo seleccionados para MS / MS en modo UltraScan (32,500 m / z / seg). Parámetros de fragmentación: Exclusión activa después de 2 espectros y liberación activa de 0,4 min, rango de escaneo: 50 m/z – 2 × precursor.

La identificación de las proteínas parentales para las secuencias peptídicas se realizó utilizando el software ProteinScape (Bruker) y el motor de búsqueda MASCOT v 2.7 (Matrix Science). Sólo se analizaron secuencias peptídicas con alta confianza (>95 %). Las secuencias de los péptidos identificados se analizaron a través de la base de datos de péptidos bioactivos de la leche (MBPDB), en línea https://mbpdb.nws.oregonstate.edu/about_us/, actualizada al 1 de agosto de 2023; esta base contempla todos los péptidos bioactivos conocidos de las proteínas de la leche (Nielsen et al., 2017). El acceso se realizó entre el 1 y el 30 de noviembre de 2023. De forma paralela las secuencias fueron analizadas en BIOPEP-UWM, base de datos de secuencias de péptidos biológicamente activos, disponible en línea https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/. El acceso se realizó durante el mismo periodo, fecha en la cual BIOPEP reportó un total de 4746 péptidos bioactivos (Minkiewicz et al., 2019). Los péptidos no reportados en estas bases de datos fueron evaluados por Peptide Ranker, una herramienta en línea que permite predecir la probabilidad de que un péptido tenga una actividad biológica, disponible en http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/. La bioactividad teórica se expresó como valores de puntuación calculados (de 0 a 1, siendo 1 el más probable que sea bioactivo). Se considera que los péptidos con una puntuación superior a 0,5 tienen una actividad biológica potencial y se analizaron para determinar la actividad antioxidante utilizando la herramienta en línea AnOxPepre-1.0 https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?AnOxPePred-1.0, incluidas las puntuaciones de

eliminación de radicales libres (FRS) y actividad quelante de metales (MCA), con sus predicciones de 0 (no antioxidante) a 1 (antioxidante) (Olsen et al., 2020).

3.3. Evaluación sensorial de la *Colada*

Al ser la *Colada* un nuevo producto destinado al consumo fue necesario realizar una evaluación sensorial previo con la finalidad de conocer sus características sensoriales y su grado de aceptación entre la población.

El análisis para su valoración se desarrolló en tres etapas, la primera fue el **Análisis Descriptivo** que proporcionó las cualidades organolépticas del producto y la segunda la constituyó el **Análisis Discriminante,** con el cual se escogió una formulación de entre cinco mezclas de lactosuero desarrolladas con distintas proporciones de maracuyá (20 %, 15 %, 10 %, 7 % y 5 %). Ambos análisis se llevaron a cabo por un jurado semi entrenado diferente (5 evaluadores o jueces en cada caso). La escala de medición para la valoración fue de cinco puntos (1: No se percibe, 2: Se percibe poco, 3: Se percibe regular, 4: Se percibe bien y 5: Se percibe excelente), criterios que también fueron considerados en otras investigaciones (Chavan et al., 2018; Molero et al., 2017). Al querer considerar esta bebida como un alimento para toda la población no se consideraron grupos etarios ni de género. Los atributos sensoriales analizados fueron sabor (amargo, salado, ácido, dulce, umami, picante y astringente), color (brillo, transparencia, opacidad y palidez), textura (pastosa, tierna, gomosa, fluida, densa, viscosa, elástica, pegajosa, adherente, fina y líquida) y por último apariencia general (poco densa, densa y muy densa).

En la Tabla 16 se ofrecen los resultados del análisis discriminante, según el cual la *Colada* con maracuyá al 15 % obtuvo los mejores resultados (resaltados en gris), con valores de coeficiente de validez de concordancia (CVC) de 0.92-0.96.

Tabla 16. *Análisis sensorial discriminante de diferentes formulaciones de Colada (25-5 % jugo de maracuyá) por jueces entrenados (n=5)*[1].

Categoría	Atributos	25%		15%[3]		10%		7%		5%	
		Media	CVC[1]	Media	CVC	Media	CVC	Media	CVC	Media	CVC
Sabor	Amargo	3	0.56032	2	0.48032	3	0.64032	2	0.36032	2	0.32032
	Salado	2	0.48032	2	0.36032	3	0.60032	2	0.48032	2	0.40032
	Ácido	**4**	**0.76032**	**5**	**0.92032**	**3**	**0.68032**	**3**	**0.60032**	**3**	**0.56032**
	Dulce	**4**	**0.76032**	**5**	**0.96032**	**3**	**0.68032**	**3**	**0.64032**	**3**	**0.64032**
	Umami	2	0.40032	2	0.32032	3	0.64032	2	0.40032	2	0.36032
	Picante	3	0.56032	3	0.68032	2	0.48032	2	0.40032	2	0.36032
	Astringente	2	0.36032	2	0.48032	2	0.40032	2	0.32032	2	0.36032
Color	Brillo	2	0.40032	3	0.56032	2	0.32032	2	0.40032	2	0.40032
	Transparencia	3	0.56032	2	0.44032	2	0.48032	2	0.48032	2	0.36032
	Opacidad	**4**	**0.80032**	**5**	**0.92032**	**4**	**0.88032**	**4**	**0.80032**	**4**	**0.80032**
	Palidez	**4**	**0.88032**	**5**	**0.96032**	**5**	**0.92032**	**4**	**0.84032**	**4**	**0.88032**
Textura	Pastoso	3	0.60032	3	0.64032	3	0.60032	2	0.36032	2	0.40032
	Tierno	**4**	**0.84032**	**5**	**0.96032**	**4**	**0.88032**	**4**	**0.88032**	**4**	**0.80032**
	Gomoso	3	0.68032	2	0.32032	3	0.60032	1	0.28032	2	0.32032
	Fluido	3	0.64032	2	0.48032	2	0.44032	2	0.44032	1	0.28032
	Denso	**4**	**0.84032**	**5**	**0.96032**	**5**	**0.92032**	**4**	**0.88032**	**4**	**0.88032**
	Viscoso	**4**	**0.80032**	**5**	**0.92032**	**4**	**0.88032**	**4**	**0.88032**	**4**	**0.80032**
	Elástico	2	0.48032	3	0.64032	3	0.60032	2	0.44032	3	0.52032
	Pegajoso	2	0.40032	1	0.28032	3	0.60032	2	0.44032	2	0.36032
	Adherente	3	0.52032	3	0.52032	2	0.48032	2	0.44032	2	0.36032
	Fino	**4**	**0.72032**	**5**	**0.92032**	**4**	**0.80032**	**4**	**0.88032**	**4**	**0.80032**
	Líquido	3	0.56032	3	0.64032	3	0.60032	3	0.56032	2	0.36032
Apariencia General	**Poco denso**	**4**	**0.88032**	**5**	**0.96032**	**4**	**0.80032**	**4**	**0.84032**	**4**	**0.84032**
	Denso	2	0.48032	3	0.56032	3	0.60032	2	0.32032	2	0.40032
	Muy denso	3	0.52032	2	0.44032	3	0.56032	2	0.40032	2	0.44032

[1] CVC: Coeficiente de validez de concordancia (de < 0.60, muy deficiente, a > 0.90, excelente)

La última etapa fue el **Análisis Sensorial de Consumidores, conocido comúnmente como prueba hedónica**, para la valoración del nivel de aceptación de la bebida seleccionada por parte de los consumidores. Este análisis se realizó durante dos semanas en grupos de 5 personas por grupo. En total la bebida se dio a probar a 80 consumidores de rango de edad entre 35 y 55 años. Los resultados se ofrecen en la Tabla 17.

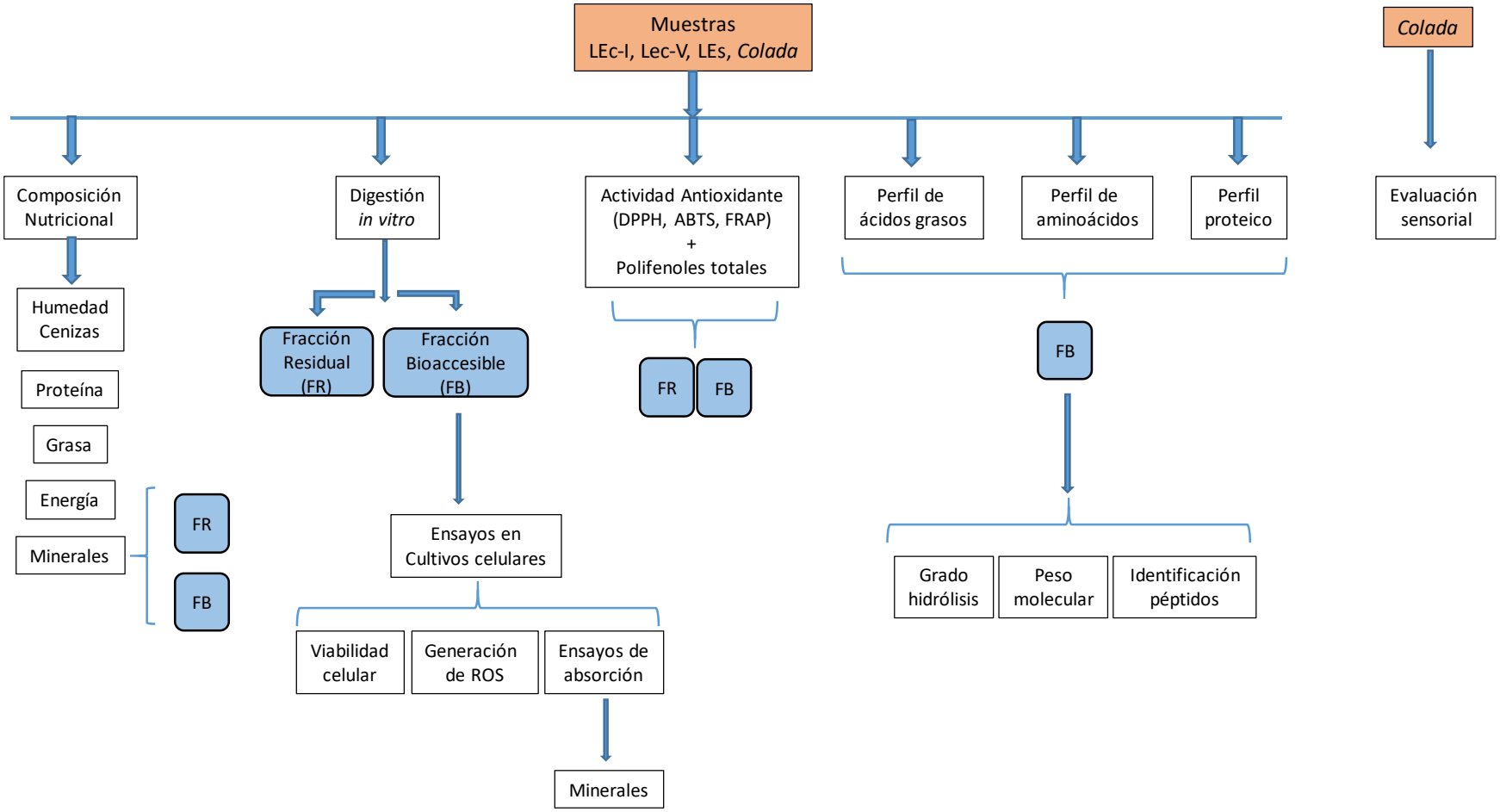
Tabla 17. *Evaluación hedónica de la Colada (15 % de jugo de maracuyá) (n=80).*

Categorías	Atributos	Media	CVC[1]
Sabor	Amargo	1	0.29
	Salado	3	0.58
	Ácido	**4**	**0.85**
	Dulce	**4**	**0.87**
	Umami	2	0.48
	Picante	3	0.50
	Astringente	2	0.50
Color	Brillo	3	0.52
	Transparencia	2	0.44
	Opacidad	**4**	**0.80**
	Palidez	**4**	**0.82**
Textura	Pastoso	1	0.30
	Tierno	**4**	**0.90**
	Gomoso	1	0.30
	Fluido	3	0.65
	Denso	**4**	**0.80**
	Viscoso	**4**	**0.85**
	Elástico	1	0.30
	Pegajoso	3	0.65
	Adherente	1	0.30
	Fino	**4**	**0.80**
	Líquido	1	0.30
Apariencia General	**Poco denso**	**4**	**0.83**
	Denso	1	0.30
	Muy denso	1	0.30

1 CVC: Coeficiente de validez de concordancia (de < 0.60, muy deficiente, a > 0.90, excelente)

La bebida con el 15 % de maracuyá tuvo una aceptación muy buena entre los consumidores, por lo que fue utilizada para las determinaciones de esta Tesis doctoral. En la Figura 15 se muestra de forma compendiada mediante el esquema experimental el flujo de las determinaciones analíticas realizadas en la presente memoria y descritas anteriormente.

Figura 15. *Esquema del diseño experimental*



3.4. Análisis estadístico

Los resultados experimentales se expresaron como la media ± error estándar (SE) de al menos tres réplicas. Los datos correspondientes a las muestras de lactosuero fueron analizados aplicando un análisis de varianza (ANOVA unidireccional) para estudiar el efecto del tipo de suero. Además, se realizó otro ANOVA simple incluyendo los resultados de la Colada, para analizar el efecto de la matriz alimentaria. Se utilizó la prueba de LSD para comparar los valores medios y se establecieron diferencias significativas en $P < 0.05$). Cuando fue necesario, las relaciones entre variables se evaluaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Los cálculos estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software StatGraphics Centurion XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies Inc. Warrenton. Para la validación del criterio de concordancia (CVC) entre los jueces de ambos jurados y los evaluadores de la prueba hedónica se empleó el método de Hernández-Nieto, (2002); así mismo, se corroboró con el análisis de varianza de un factor con el fin de valorar diferencias significativas en las evaluaciones de los jueces (para el análisis descriptivo) y de dos factores en el discriminativo para ver diferencias entre las mezclas y los atributos.

Capítulo IV

Resultados y discusión

Capítulo IV. Resultados y discusión

Como se comentó en el capítulo de "Análisis estadístico", en primer lugar, se han comparado las tres muestras de lactosuero, con la finalidad de estudiar las diferencias debidas a la época de obtención de la muestra y a la localización geográfica. En segundo lugar, se han estudiado las diferencias de las muestras del lactosuero con la bebida *Colada*, para establecer el efecto de la matriz alimentaria y los componentes del alimento.

4.1. Composición nutricional

Está ampliamente estudiado que la composición nutricional del lactosuero dependerá de la composición de la leche empleada durante la elaboración del queso, la que a su vez está en correspondencia con la raza del animal, la edad y la alimentación que este tenga, la época de recolección de la leche, el tipo de queso elaborado y el proceso tecnológico empleado durante el proceso productivo (Alais, 1985; Grimley et al., 2009; Heck et al., 2009; Kaur et al., 2022; Li et al., 2019; Minj & Anand, 2020; Prazeres et al., 2012). En la Tabla 18 se muestra la composición nutricional de las muestras LEc-I, LEc-V, LEs y *Colada* acorde a las determinaciones analíticas descritas en el capítulo de Material y Métodos de la presente memoria de tesis doctoral.

El lactosuero es una buena fuente de **proteína,** ya que retiene aproximadamente el 20 % de la proteína láctea (Zandona et al., 2021). Las muestras de lactosuero dulce del presente estudio ofrecieron un contenido proteico en torno al 1 %, valor que está entre las cifras más altas encontradas en la bibliografía (Hernández-Rojas & Vélez-Ruiz, 2014), que normalmente muestran valores medios de 0.5-0.6 % (Figueroa Pires et al., 2021), los cuales pueden verse afectados, entre otras cosas, por el tipo de queso del que se obtuvo (Rocha-Mendoza et al., 2021). Además, el contenido proteico de las muestras analizadas las ubica por encima del mínimo señalado en la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2594:2011, que establece el valor proteico en 0,8 %. El contenido de proteína de LEs recolectado durante el otoño en España fue superior al lactosuero ecuatoriano con una variación de entre 0,11 y 0,13 mg/100g de materia fresca, sin que haya diferencias entre las muestras de invierno y de verano. Por tanto, aunque otros autores han observado que la época del año tiene un impacto significativo en la composición nutricional de la leche (Li et al., 2019), nuestros resultados sugieren que la diferencia del valor proteico del lactosuero español con respecto a las muestras ecuatorianas no se debe fundamentalmente a la

estacionalidad, sino más bien a otros factores, como la raza, la alimentación del ganado y la zona geográfica, que también han sido descritos como decisivos (Priyashantha et al., 2021). De hecho, trabajos realizados con vacas Holstein han mostrado que la raza afecta de manera significativa a la fracción proteica de la leche (Grandison et al., 1984; Grimley et al., 2009; Larsen et al., 2010; Li et al., 2019; Maurmayr et al., 2018; Priyashantha et al., 2021). El valor proteico de la bebida *Colada* fue significativamente mayor que el de las muestras de lactosuero, debido a los ingredientes añadidos para su elaboración, especialmente la cebada. El resultado está en el rango de los descritos para otras bebidas elaboradas a base de lactosuero, que oscilan entre 0,94 % y 1,61 %, siendo los valores superiores los que corresponden a bebidas que contienen también frutas (Keba et al., 2018; León-López et al., 2020).

Tabla 18. *Composición nutricional de las muestras de lactosuero y Colada*

	LEc-I	**LEc-V**	**LEs**	***P***	***Colada***
Humedad (%)	93.8 ± 0.001 c*	93.0 ± 0.003 a*	93.3 ± 0.001 b*	0.0000	81.6 ± 0.001
Grasa (%)	0.39 ± 0.001 a*	1.08 ± 0.03 c*	0.48 ± 0.001 b*	0.0000	0.87 ± 0.79
Proteína (%)	0.98 ± 0.02 a*	0.96 ± 0.01 a*	1.09 ± 0.01 b*	0.0025	1.29 ± 0.06
Cenizas (%)	0.45 ± 0.001 b*	0.43 ± 0.001 a*	0.51 ± 0.001 c*	0.0000	0.48 ± 0.001
Energía (Kcal/100 g)	26.7 ± 0.08 a*	34.1 ± 0.08 c*	29.2 ± 0.05 b*	0.0000	82.0 ± 0.11
P (mg/100 g)	31.7 ± 0.14 b*	30.7 ± 0.15 a*	34.1 ± 0.12 c*	0.0000	39.6 ± 0.23
Ca (mg/100 g)	32.0 ± 0.02 c*	29.9 ± 0.01 a	31.5 ± 0.04 b*	0.0000	29.9 ± 0.10
Mg (mg/100 g)	6.87 ± 0.02 b*	6.36 ± 0.03 a*	6.91 ± 0.06 b*	0.0002	8.82 ± 0.07
Na (mg/100 g)	35.6 ± 0.06 c*	35.3 ± 0.14 ab*	35.1 ± 0.09 a*	0.0270	34.2 ± 020
K (mg/100 g)	73.2 ± 0.22 a*	82.9 ± 0.07 b*	83.9 ± 0.16 c*	0.0000	156 ± 0.21
Fe (µg/100 g)	73.4 ± 0.81 a*	79.2 ± 0.60 b*	78.7 ± 0.92 b*	0.0037	258 ± 0.53
Zn (µg/100 g)	18.3 ± 0.14 a*	20.1 ± 0.11 b*	26.2 ± 0.32 c*	0.0000	104 ± 0.73

Los resultados se expresan en materia fresca. LEc-I, lactosuero ecuatoriano de invierno; LEc-V, lactosuero ecuatoriano de verano; LEs, lactosuero español.
Los valores son la media ± SE (n=3). Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre las muestras de lactosuero; el símbolo * indica diferencias significativas con respecto a la *Colada* (ANOVA + test LSD, $P < 0.05$).

Respecto al **contenido graso** se notó una marcada diferencia en cuanto al máximo permitido en la norma, que es de 0,3 %, especialmente en LEc-V y *Colada*. En este caso, el lactosuero ecuatoriano de verano fue mucho más rico en grasa que las muestras obtenidas en invierno y otoño, lo que sugiere un efecto estacional en este nutriente. En este sentido, se ha informado que en verano

aumenta el contenido graso de la leche (Larsen et al., 2010), lo que justificaría el alto valor de la grasa de LEc-V. Aunque no existen datos sobre el lactosuero, se han descrito variaciones estacionales en la composición de la grasa de la leche de vaca (Grimley et al., 2009; Heck et al., 2009; Li et al., 2019), que afectarían directamente a la composición del lactosuero (Abd El-Salam et al., 2009). Estos cambios se atribuyen fundamentalmente a las diferencias en la alimentación del ganado, que en invierno consumen principalmente piensos y en primavera y verano pasto fresco (Heck et al., 2009; Li et al., 2019). Ahora bien, las variaciones composicionales de la leche pueden cambiar considerablemente en los distintos países en función del clima (Grimley et al., 2009; Heck et al., 2009; Li et al., 2019) y, en este sentido, hay que tener en cuenta la especial climatología de Ecuador debida a su situación geográfica.

Respecto al **valor energético** se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre LEc-V, LEc-I y LEs, siendo superior el valor del lactosuero de verano, debido fundamentalmente a su mayor contenido en grasa. La *Colada* por su parte, que fue la muestra de mayor contenido proteico, superó ampliamente en casi 3 veces a las muestras de lactosuero evaluadas. En nuestro caso, se encontró una correlación altamente positiva entre los valores de energía y el contenido de proteína de las muestras ($r= 0.8571$, $P= 0.0004$), lo que muestra que, en los alimentos en los que el contenido graso es minoritario, la fracción proteica es decisiva en la carga energética.

El contenido de **cenizas** medio de las muestras fue del 0,46 %, muy parecido al valor medio mostrado para el suero de leche (0.5-0.6 %) (Pires et al., 2021). En el caso de LEs fue de 0,51 %, superior a LEc-I (en un 12 %) y LEc-V (en un 14 %).

Se ha informado que en el suero lácteo queda retenido aproximadamente el 90 % de los **minerales** de la leche (Poveda, 2013), la mayoría de ellos de gran valía nutricional como Ca, Zn, Fe, Cu, Mn, P, Na y K cuyos contenidos pueden variar según el tipo de suero (Mazorra-Manzano & Moreno-Hernández, 2019; Smith et al., 2015). Según nuestros resultados, el contenido medio de los minerales predominantes en las muestras de lactosuero fue por orden de abundancia: K, Na, P, Ca y Mg, seguidos de los elementos traza Fe y Zn. Se observó una estrecha correlación entre el contenido en cenizas y la concentración de P en las muestras ($r=0.8560$, $P= 0.0004$).

Tras el análisis de las muestras objeto de estudio se hallaron diferencias estadísticamente significativas en el lactosuero español respecto a los lactosueros de Ecuador, siendo superior el contenido de P, Mg, K y Zn, pero también hubo diferencias entre las muestras de lactosuero

ecuatoriano. Estas diferencias pudieron deberse a la distinta alimentación del ganado según la época del año en la que fueron colectadas las muestras, por lo que estos resultados estarían en correspondencia con lo reportado por otros autores respecto a las variaciones en la composición nutricional de la leche producto del cambio en la alimentación durante las diferentes épocas del año (Grimley et al., 2009; Heck et al., 2009; Li et al., 2019). Aunque el contenido mineral de la leche es un tema bien estudiado por diferentes autores, la información sobre el perfil mineral en el lactosuero es bastante escasa en la bibliografía, y los niveles descritos dependen en gran medida del proceso empleado para la fabricación de los quesos. Datos tempranos describen contenidos medios en el lactosuero dulce de (mg/100g) Ca 36.5 y Mg 6.5, datos muy similares a los observados en nuestras muestras, y valores de Na 45.5, K 123 y P 43, superiores a las obtenidas en nuestro ensayo, especialmente para el K (Wong et al. 1978). Además, se han descrito concentraciones de Zn y Fe de 11 y 89 µg/100g, respectivamente (Wong et al. 1978). El contenido de Mg medio del lactosuero en el presente ensayo fue de 0,67g/L, 4 veces mayor al valor observado por algunos autores para el lactosuero dulce de 0,17g/L; respecto al K, el contenido medio de las muestras fue de 1g/L, resultado similar al reportado mientras que el Na fue 2 veces menor al valor medio descrito (Mazorra-Manzano & Moreno-Hernández, 2019).

Los estudios existentes muestran la composición mineral promedio del lactosuero, pero no se encontraron datos para bebidas con similares características a la *Colada* objeto de estudio. En nuestro caso el aporte mineral de la *Colada* para Mg, K, Fe y Zn supera notablemente la composición media de LEc-I, LEc-V y LEs con diferencias estadísticamente significativas (2 veces superior en K, 3 veces en Fe y 5 veces en Zn). Estos resultados pudieron deberse a los ingredientes incorporados durante la formulación; en este caso la cebada supone un gran aporte sobre todo de P y K (Geng et al., 2022) y el maracuyá es una buena fuente de K, Fe y Zn (Taborda et al., 2020), todos ellos esenciales para el cuerpo humano. Por tanto, la *Colada* podría ser considerada como un alimento rico en minerales, ideal para fortalecer la contribución mineral de la dieta.

4.2. Perfil de ácidos grasos antes y después de la digestión in vitro: efecto del proceso digestivo

Los ácidos grasos (AG) presentes en la alimentación tienen múltiples efectos en el organismo, debido a su aporte energético y sus diferentes acciones fisiológicas. La cantidad de grasa ingerida en la dieta y el tipo de ácidos grasos que la conforman, saturados e insaturados, es una condición determinante para que estos sean más o menos saludables para la salud del consumidor. Los ácidos

grasos poliinsaturados (AGPI) y especialmente los omega 3 y 6 (ω-3 y ω-6, también llamados n3 y n6) se consideran de gran importancia porque, además de su aporte energético, pueden biotransformarse dando lugar a la generación de compuestos bioactivos (Sanhueza, 2015).

El perfil de AG y los índices relacionados de las muestras de lactosuero y la bebida *Colada* **antes de la digestión *in vitro*** se muestran en la Tabla 19 y en la Figura 16, respectivamente.

Antes de la digestión, el principal AG presente en todas las muestras fue el ácido palmítico (C16:0) notándose cifras estadísticamente superiores en LEs con respecto a LEc-I, LEc-V y *Colada.* El segundo AG más representativo en los lactosueros fue el ácido oleico (C18:1n9), seguido del ácido esteárico (C18:0), ambos con valores estadísticamente inferiores en el lactosuero de España con respecto a los de Ecuador y a la *Colada.* El perfil de AG observado en las muestras está de acuerdo con los principales AG reportados en el suero y en la grasa de la leche (Brożek et al., 2022; González-Torres et al., 2020). Se estima que las diferencias estadísticas reportadas están relacionadas con las distintas épocas del año en que fueron recolectadas las muestras, por lo que nuestros resultados estarían de acuerdo con los descritos por otros autores en cuanto a que el contenido y el perfil de ácidos grasos lácteos depende entre otros factores de la alimentación y la época de recolección (Anankanbil et al., 2018; Hall, 1970), pero difieren con los observados por Hall, (1970) en cuanto a que la concentración de los ácidos esteárico (C18:0) y oleico (C18:1n9) es más baja en verano que en invierno.

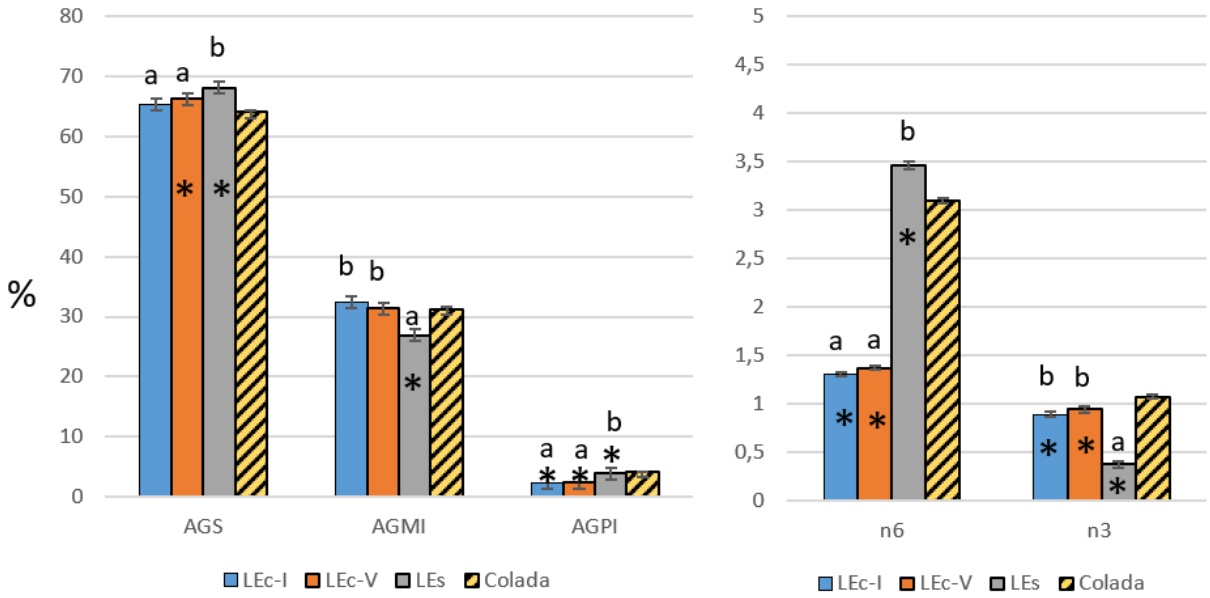
Tabla 19. *Perfil de ácidos grasos antes de la digestión in vitro*

Ácido graso	LEc-I	LEc-V	LEs	*P*	*Colada*
C8:0	0.02 ± 0.001	0.02 ± 0.001	0.02 ± 0.001	0.4582	0.02 ± 0.001
C10:0	0.66 ± 0.02 a	0.89 ± 0.11 b*	0.49 ± 0.04 a*	0.0083	0.68 ± 0.007
C12:0	2.04 ± 0.04 a*	2.10 ± 0.04 a*	2.73 ± 0.02 b*	0.0000	1.81 ± 0.03
C14:0	10.4 ± 0.06 a	10.3 ± 0.05 a	12.4 ± 0.28 b*	0.0000	9.82 ± 0.11
C14:1	0.88 ± 0.01 a*	0.85 ± 0.01 a*	0.94 ± 0.01 b*	0.0004	0.78 ± 0.004
C16:0	31.6 ± 0.22 a	31.9 ± 0.35 a	38.1 ± 0.14 b*	0.0000	31.6 ± 0.12
C16:1	1.93 ± 0.02 b	1.79 ± 0.08 ab	1.65 ± 0.05 a*	0.0184	1.83 ± 0.03
C17:0	1.01 ± 0.01 b	1.13 ± 0.03 b*	0.73 ± 0.007 a*	0.0000	1.04 ± 0.004
C17:1	0.64 ± 0.07 b	0.28 ± 0.02 a*	0.56 ± 0.05 b	0.0021	0.59 ± 0.05
C18:0	17.5 ± 0.14 b	17.9 ± 0.21 b	13.1 ± 0.16 a*	0.0000	17.3 ± 0.05
C18:1 n9	28.6 ± 0.22 b	28.1 ± 0.67 b	23.2 ± 0.20 a*	0.0000	27.6 ± 0.24
C18:1 n7	0.40 ± 0.01 a*	0.42 ± 0.03 a*	0.58 ± 0.009 b*	0.0001	0.50 ± 0.003
C18:2 n6	1.15 ± 0.006 a*	1.21 ± 0.02 a*	3.00 ± 0.04 b	0.0000	2.97 ± 0.04
C18:3 n6	0.02 ± 0.001 a	0.02 ± 0.001 a	0.04 ± 0.001 b*	0.0007	0.02± 0.003
C18:3 n3	0.62 ± 0.003 b*	0.65 ± 0.01 b*	0.26 ± 0.01 a*	0.0000	0.84 ± 0.003
C20:0	0.27 ± 0.02 b	0.29 ± 0.01 b	0.15 ± 0.007 a*	0.0001	0.30 ± 0.004
C20:3 n6	0.04 ± 0.006 a	0.04 ± 0.004 a	0.17 ± 0.002 b*	0.0000	0.04 ± 0.001
C20:3 n3	0.07 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.03 ± 0.008	0.3299	0.08 ± 0.02
C20:4 n6	0.09 ± 0.006 a*	0.07 ± 0.001 a*	0.21 ± 0.003 b*	0.0000	0.06 ± 0.001
C20:5 n3	0.06 ± 0.006 b	0.06 ± 0.001 b	0.03 ± 0.004 a*	0.0002	0.05 ± 0.005
C21:0	1.82 ± 0.01 c*	1.70 ± 0.02 b*	0.40 ± 0.03 a*	0.0000	1.51 ± 0.007
C22:4 n6	0.01± 0.003 a	0.02 ± 0.006 a	0.04 ± 0.001 b*	0.0005	0.008 ± 0.002
C22:5 n3	0.11 ± 0.001 b	0.10 ± 0.01 b	0.04 ± 0.002 a*	0.0002	0.09 ± 0.001
C22:6 n3	0.02 ± 0.003	0.06 ± 0.03*	0.006 ± 0.002	0.0735	0.01 ± 0.001

LEc-I, lactosuero ecuatoriano de invierno; LEc-V, lactosuero ecuatoriano de verano; LEs, lactosuero español. AGS, ácidos grasos saturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados; n6, ácidos grasos de la serie n6; n3, ácidos grasos de la serie n3.
Los valores son la media ± SE (n=3). Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre las muestras de lactosuero; el símbolo * indica diferencias significativas con respecto a la bebida *Colada* (ANOVA + test LSD, $P< 0.05$).

Los ácidos grasos saturados (AGS) totales representaron la fracción principal de todas las muestras (con un 66 % de valor medio), mientras que los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y los AGPI contribuyeron de media con el 30,21 % y el 3,44 %, respectivamente (Figura 16). Estos valores se corresponden con los valores medios reportados para la grasa láctea (Ortega-Pérez et al., 2013). Los índices de AG según su grado de insaturación, tanto los AGS como los AGMI y los AGPI, fueron similares en las muestras procedentes de Ecuador, pero ambas fueron diferentes a los valores del lactosuero español, en el que se observó un mayor contenido de AG saturados y poliinsaturados, y un menor valor de AG monoinsaturados. Estos resultados sugieren que la época del año no es un factor decisivo en el perfil de AG del lactosuero, y que existen otros factores, como la raza y la alimentación de los animales, que influyen en mayor medida. El valor superior de AGPI en el lactosuero español se debió a mayores contenidos de los AG n6, especialmente del ácido linoleico, ya que las cifras de AG n3 fueron inferiores respecto al lactosuero de Ecuador. La *Colada* por su parte, antes de la digestión mostró valores de los índices de AG en general similares a las muestras de lactosuero, aunque con proporciones de AGPI ligeramente superiores a estos. En la bebida se detectaron altas cantidades de AGPI n6 y n3, significativamente más elevadas respecto al lactosuero ecuatoriano en el primer caso y respecto a todas las muestras de lactosuero en el segundo. Los valores de AGPI de la *Colada* son un hallazgo valioso; se conoce que los ácidos grasos insaturados, incluidos el ácido linoleico y el ácido linolénico, desempeñan un papel importante en la regulación del metabolismo cardiovascular, las funciones de la membrana celular y el sistema inmunológico (Wojtas et al., 2020), por lo que la ingesta regular de esta bebida podría aportar mejoras sustanciales en la salud de la población ecuatoriana.

Figura 16. *Índices de los AG de las muestras antes de la digestión in vitro*



LEc-I, lactosuero ecuatoriano de invierno; LEc-V, lactosuero ecuatoriano de verano; LEs, lactosuero español. AGS, ácidos grasos saturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados; n6, ácidos grasos de la serie n6; n3, ácidos grasos de la serie n3. Los valores son la media ± SE (n=3). Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre las muestras de lactosuero; el símbolo * indica diferencias significativas con respecto a la bebida *Colada* (ANOVA + test LSD, $P< 0.05$).

El perfil de AG obtenido en la fracción bioaccesible tras la digestión *in vitro* de las muestras se recoge en la Tabla 20, y los índices correspondientes se muestran en la Figura 17. Además, en la Tabla 21 y la Figura 18 se exponen el efecto del proceso digestivo en el perfil de AG de las muestras, expresado en veces de aumento (< 1, reducción; > 1, aumento).

La digestión es un proceso complejo que contempla la extracción de nutrientes de la matriz alimentaria mediante transformaciones químicas, enzimáticas y mecánicas (Borges et al., 2019), para así poder ser absorbidos por el organismo; durante este proceso tiene lugar la interacción entre los componentes de la dieta, afectando su digestibilidad y bioaccesibilidad (Tamargo et al., 2022).

En el presente trabajo, después de la digestión, se observaron cambios significativos en el perfil de AG de las muestras de los lactosueros: los AGS se redujeron drásticamente alrededor del

55 %, mientras que los AGMI aumentaron aproximadamente 2 veces y los AGPI tuvieron un aumento de entre 3 y 4 veces, en comparación con los valores previos a la digestión. La *Colada* por su parte, mantuvo este mismo patrón. La información bibliográfica sobre las modificaciones digestivas de la fracción lipídica en el lactosuero o las bebidas a base de lactosuero es prácticamente inexistente, quizás en parte porque los estudios previos se han centrado en la fracción proteica, que es la mayoritaria y la más conocida.

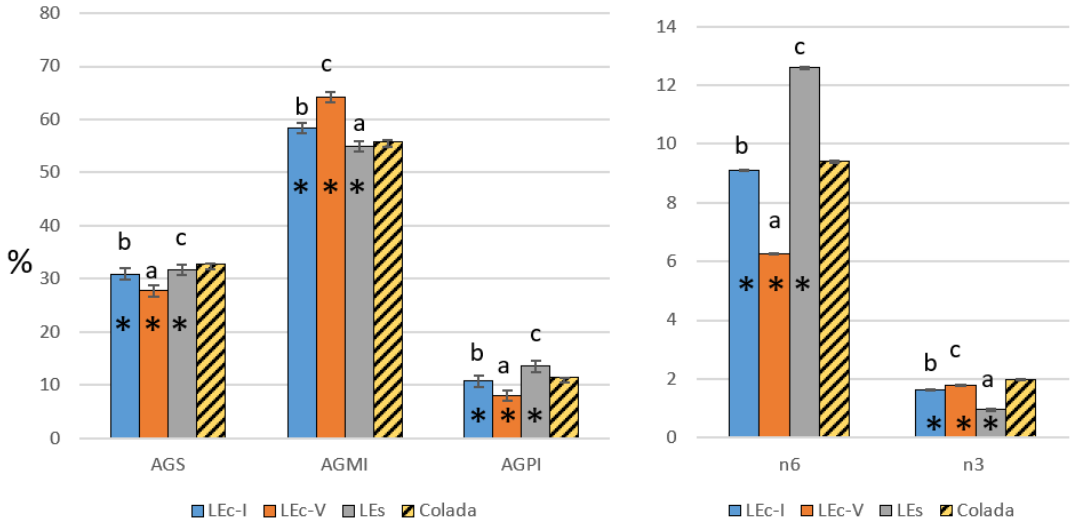
Las modificaciones sufridas en el perfil de AG durante la digestión podrían estar relacionadas con diversos mecanismos de acción. Por una parte, el alto contenido en Ca de las muestras pudo influir en la reducción de los AGS, ya que en el proceso digestivo el Ca forma jabones insolubles con los AG de cadena larga (> 14C), lo cual reduce significativamente la bioaccesibilidad de estos (Ayala-Bribiesca et al., 2017). Por otra parte, se ha descrito que durante la digestión se puede producir la oxidación de los AG por la acidez propia del estómago, sumada a la acción enzimática (Lamothe et al., 2019; Maestre et al., 2013), lo cual produciría teóricamente una reducción de los AGPI. El hecho de que en nuestras muestras no se observe este efecto, sino un aumento en los porcentajes relativos de los AGPI, se puede atribuir a las propiedades antioxidantes del lactosuero empleado durante la formulación, que ejercen así un efecto protector frente a la oxidación de los AG (y que serán mostradas y discutidas posteriormente). Concretamente, las propiedades antioxidantes de las proteínas séricas han sido ampliamente estudiadas (Chanput et al., 2010; Corrochano et al., 2018; Kamau et al., 2010; Lands et al., 1999; Nabuco et al., 2019). La *Colada* contiene también otros compuestos antioxidantes como los polifenoles, proporcionados por la cebada y la fruta Maracuyá, que limitan la oxidación lipídica durante la digestión y estimulan la disponibilidad de los AGPI (Maestre et al., 2013). Además, la cebada añadida en la *Colada* pudo influir en las modificaciones digestivas observadas en el perfil lipídico, ya que estudios previos han reportado que tras la incorporación de cebada en una preparación alimentaria se potencia la liberación de AGPI tras la digestión (Aarak et al., 2013). No podemos descartar que el aumento significativo de AG insaturados de la serie n3 y n6 durante la digestión pueda deberse a la conversión de AGPI de cadena larga, producto de la hidrólisis de lípidos y la liberación de ácidos grasos de los fosfolípidos y otros lípidos complejos presentes en el suero de quesería.

Tabla 20. *Perfil de ácidos grasos después de la digestión in vitro (FB).*

Ácido graso	LEc-I	LEc-V	LEs	*P*	*Colada*
C8:0	0.08 ± 0.003	0.09 ± 0.005	0.08 ± 0.01	0.5193	0.07 ± 0.02
C10:0	3.72 ± 0.14 b*	2.08 ± 0.05 a	2.41 ± 0.08 a	0.0000	2.14 ± 0.05
C12:0	1.83 ± 0.007 a*	1.79 ± 0.02 a*	2.37 ± 0.06 b*	0.0000	1.95 ± 0.02
C14:0	4.68 ± 0.10 a*	5.36 ± 0.05 b*	5.24 ± 0.04 b*	0.0010	5.64 ± 0.11
C14:1	1.16 ± 0.05 a	1.41 ± 0.01 b*	1.20 ± 0.06 a	0.0229	1.22 ± 0.003
C16:0	11.8 ± 0.06 a*	12.5 ± 0.02 b*	13.7 ± 0.08 c*	0.0000	15.3 ± 0.03
C16:1	3.50 ± 0.01 b*	4.12 ± 0.01 c*	3.17 ± 0.005 a*	0.0000	3.39 ± 0.06
C17:0	0.14 ± 0.006 a*	0.25 ± 0.001 b*	0.13 ± 0.01 a*	0.0002	0.28 ± 0.008
C17:1	4.08 ± 0.02 b*	2.41 ± 0.08 a	4.77 ± 0.06 c*	0.0000	2.50 ± 0.03
C18:0	8.85 ± 0.04 c*	5.56 ± 0.02 a*	7.48 ± 0.03 b*	0.0000	7.23 ± 0.03
C18:1 n9	46.3 ± 0.11 b*	52.3 ± 0.08 c*	43.9 ± 0.14 a*	0.0000	45.4 ± 0.40
C18:1 n7	1.11 ± 0.03 b*	0.91 ± 0.03 a*	1.25 ± 0.02 c*	0.0004	0.96 ± 0.01
C18:2 n6	8.11 ± 0.02 b*	5.56 ± 0.02 a*	11.0 ± 0.07 c*	0.0000	8.91 ± 0.009
C18:3 n6	0.06 ± 0.01 a	0.05 ± 0.01 a	0.10 ± 0.001 b*	0.0199	0.04 ± 0.009
C18:3 n3	0.97 ± 0.01 b*	1.26 ± 0.008 c*	0.57 ± 0.01 a*	0.0000	1.57 ± 0.005
C20:0	0.11 ± 0.001 c	0.007 ± 0.001 a*	0.09 ± 0.001 b*	0.0000	0.10 ± 0.001
C20:3 n6	0.15 ± 0.002 a*	0.14 ± 0.002 a*	0.37 ± 0.004 b*	0.0000	0.08 ± 0.023
C20:3 n3	0.29 ± 0.01 c*	0.11 ± 0.001 a	0.18 ± 0.007 b*	0.0000	0.11 ± 0.004
C20:4 n6	0.72 ± 0.01 b*	0.47 ± 0.01 a*	0.97 ± 0.04 c*	0.0000	0.33 ± 0.02
C20:5 n3	0.14 ± 0.07	0.12 ± 0.008	0.09 ± 0.03	0.6484	0.08 ± 0.006
C21:0	2.17 ± 0.03 b*	3.04 ± 0.02 c*	0.63 ± 0.02 a*	0.0000	2.42 ± 0.01
C22:4 n6	0.07 ± 0.01 a*	0.05 ± 0.002 a	0.13 ± 0.005 b*	0.0006	0.04 ± 0.005
C22:5 n3	0.18 ± 0.002 b	0.26 ± 0.005 c*	0.10 ± 0.005 a*	0.0000	0.17 ± 0.005
C22:6 n3	0.03 ± 0.004	0.03 ± 0.004	0.02 ± 0.007	0.0997	0.02 ± 0.001

LEc-I, lactosuero ecuatoriano de invierno; LEc-V, lactosuero ecuatoriano de verano; LEs, lactosuero español. Los valores son la media ± SE (n=3). Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre las muestras de lactosuero; el símbolo * indica diferencias significativas con respecto a la bebida *Colada* (ANOVA + test LSD, $P< 0.05$).

Figura 17. *Índices de los AG de las muestras después de la digestión in vitro*



LEc-I, lactosuero ecuatoriano de invierno; LEc-V, lactosuero ecuatoriano de verano; LEs, lactosuero español. AGS, ácidos grasos saturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados; n6, ácidos grasos de la serie n6; n3, ácidos grasos de la serie n3. Los valores son la media ± SE (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas entre las muestras de lactosuero; el símbolo * indica diferencias significativas con respecto a la bebida Colada (ANOVA + test LSD, P< 0.05).

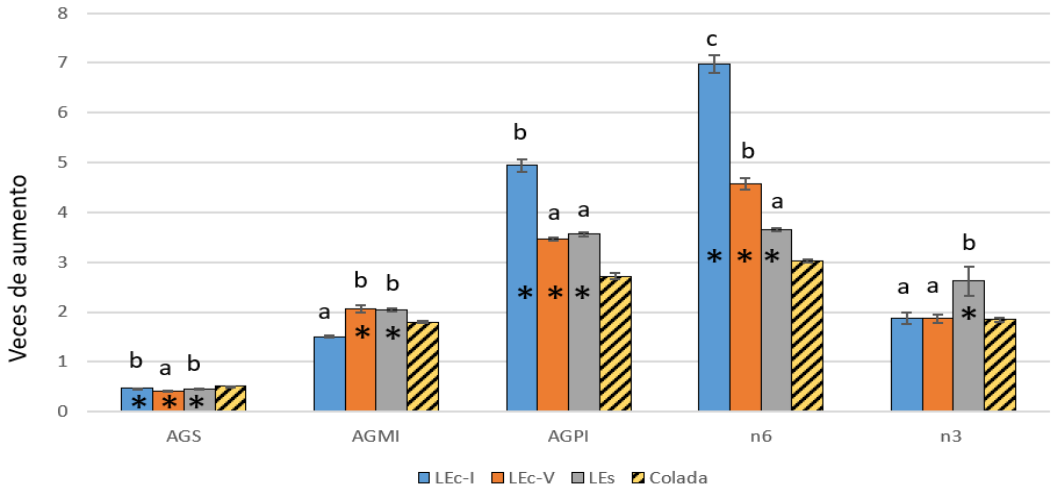
Tabla 21. *Efecto del proceso digestivo en el perfil de AG expresado en veces de aumento.*

Ácido graso	LEc-I	LEc-V	LEs	*P*	*Colada*
C8:0	4.00 ± 0.07	4.85 ± 0.70	4.50 ± 0.47	0.5106	3.59 ± 0.94
C10:0	5.77 ± 0.22 b*	2.16 ± 0.21 a*	5.37 ± 0.08 b*	0.0000	3.14 ± 0.10
C12:0	0.89 ± 0.02 *	0.84 ± 0.03 *	0.87 ± 0.02 *	0.4610	1.06 ± 0.02
C14:0	0.45 ± 0.007 a*	0.52 ± 0.007 b*	0.043 ± 0.02 a*	0.0022	0.57 ± 0.003
C14:1	1.31 ± 0.05 a*	1.65 ± 0.03 b	1.29 ± 0.09 a*	0.0107	1.56 ± 0.009
C16:0	0.37 ± 0.005 a*	0.39 ± 0.006 b*	0.36 ± 0.002 a*	0.0098	0.48 ± 0.003
C16:1	1.52 ± 0.02 a	2.35 ± 0.14 b*	1.95 ± 0.08 a	0.0171	1.87 ± 0.07
C17:0	0.14 ± 0.005 a*	0.22 ± 0.008 b*	0.18 ± 0.02 a*	0.0115	0.27 ± 0.01
C17:1	6.80 ± 1.22	9.08 ± 1.14*	9.29 ±1.15 *	0.3756	4.48 ± 0.50
C18:0	0.49 ± 0.003 b*	0.31 ± 0.006 a*	0.57 ± 0.007 c*	0.0000	0.42 ± 0.002
C18:1 n9	1.63 ± 0.015 a	1.88 ± 0.06 b*	1.89 ± 0.02 b*	0.0054	1.66 ± 0.02
C18:1 n7	2.79 ± 0.12 *	2.24 ± 0.29	2.13 ± 0.06	0.0906	1.92 ± 0.02

C18:2 n6	7.06 ± 0.06 c*	4.55 ± 0.06 b*	3.70 ± 0.03 a*	0.0000	2.97 ± 0.03
C18:3 n6	3.18 ± 0.92	3.11 ± 0.90	2.73 ± 0.26	0.9031	3.27 ± 0.43
C18:3 n3	1.56 ± 0.02 a*	1.93 ± 0.04 b	2.14 ± 0.08 c*	0.0008	1.87 ± 0.01
C20:0	0.42 ± 0.04 b	0.26 ± 0.004 a	0.56 ± 0.04 c*	0.0019	0.33 ± 0.004
C20:3 n6	4.27 ± 1.24	3.56 ± 0.59	2.19 ± 0.02	0.2493	2.34 ± 0.74
C20:3 n3	10.9 ± 5.22	3.37 ± 2.17	10.2 ± 5.37	0.4737	4.20 ± 3.03
C20:4 n6	8.32 ± 0.71 c*	6.40 ± 0.14 b	4.58 ± 0.24 a	0.0029	5.58 ± 0.38
C20:5 n3	2.30 ± 1.14	1.89 ± 0.10	3.92 ± 1.69	0.4812	1.49 ± 0.02
C21:0	1.19 ± 0.03 a*	1.78 ± 0.04 c*	1.51 ± 0.07 b	0.0006	1.61 ± 0.01
C22:4 n6	6.94 ± 2.00	4.30 ± 2.56	3.02 ± 0.17	0.3824	3.86 ± 0.36
C22:5 n3	1.66 ± 0.04	2.50 ± 0.58	2.45 ± 0.19	0.1398	1.98 ± 0.04
C22:6 n3	2.09 ± 0.60	0.87 ± 0.52	4.39 ±2.09	0.2282	1.64 ± 0.42

LEc-I, lactosuero ecuatoriano de invierno; LEc-V, lactosuero ecuatoriano de verano; LEs, lactosuero español. Los valores son la media ± SE (n=3). Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre las muestras de lactosuero; el símbolo * indica diferencias significativas con respecto a la bebida *Colada* (ANOVA + test LSD, $P< 0.05$).

Figura 18. *Efecto del proceso digestivo en los índices de los AG*



LEc-I, lactosuero ecuatoriano de invierno; LEc-V, lactosuero ecuatoriano de verano; LEs, lactosuero español. AGS, ácidos grasos saturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados; n6, ácidos grasos de la serie n6; n3, ácidos grasos de la serie n3. Los valores son la media ± SE (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas entre las muestras de lactosuero; el símbolo * indica diferencias significativas con respecto a la bebida Colada (ANOVA + test LSD, P< 0.05).

Las diferencias observadas entre las distintas muestras analizadas pudieron haberse generado probablemente por el origen del suero y se estima que se debe entre otras cosas a la época de

recolección, a la alimentación y a las razas del ganado de las que se obtuvo la leche para la elaboración del queso. Estos resultados estarían en correspondencia con lo reportado por otros autores respecto a que la composición nutricional de la leche varía en función de la especie, la raza, la edad del animal, la alimentación de este, la época de recolección y la tecnología empleada durante el proceso productivo (Alais, 1985; Alothman et al., 2019; Gantner, 2015). Además, se ha observado que el perfil de AG analizado en los productos lácteos, como el queso y el lactosuero, no siempre se corresponde con el de la propia grasa de la leche. En este sentido, Çetinkaya (2021) reportó un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados (AGI) en la grasa del suero del queso Kashar que en la grasa de la leche; reporte que coincide con el estudio realizado por Brożek et al., (2022), quienes evaluaron el perfil de ácidos grasos de la mantequilla elaborada a partir del lactosuero de queso Gouda; sus resultados mostraron mayor concentración de AGMI, AGPI y de cadena larga en el lactosuero que en la grasa de la mantequilla de la leche, perfil que además afectó las propiedades fisicoquímicas y los atributos sensoriales de la grasa. Por su parte, Kasapcopur et al., (2021) no encontraron diferencias en la grasa de los quesos Kashar y Lor.

Como se ha mencionado anteriormente, el proceso digestivo modificó significativamente el perfil de AG de las muestras, resultando en una disminución de los AGS y en un aumento de los AGMI y AGPI. Estos resultados son de gran valía, toda vez que a los AGPI se les ha atribuido capacidad anticancerígena y antiinflamatoria, así como efectos favorables contra la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (Tunick & Van Hekken, 2017). Además, el incremento en el nivel de los ácidos grasos C18:1n9 y C18:2n6 observado en todas las muestras es de gran interés en la dieta humana, al tener beneficios para la salud, como la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares y la mejora de la sensibilidad a la insulina por su aporte en la disminución de los lípidos en sangre (López-Huertas, 2010).

4.3. Actividad antioxidante antes y después de la digestión *in vitro*: efecto del proceso digestivo y marcadores celulares de estrés oxidativo (generación de ROS en células Caco-2)

En el organismo, el desequilibrio entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes puede dar lugar a una situación de estrés oxidativo, que se relaciona con multitud de patologías degenerativas y con el proceso de envejecimiento. Por la importancia de la excesiva generación de radicales libres, los antioxidantes de la dieta, como ya se ha comentado, son un refuerzo esencial para combatir el estrés oxidativo y prevenir sus temidos efectos. La importancia

de la actividad biológica ejercida por los antioxidantes es de sobra conocida, razón por la que se han destinado muchos esfuerzos a evaluar el efecto que los antioxidantes alimentarios ejercen en el ser humano frente a patologías relacionadas con el estrés oxidativo, como las cardiovasculares e inflamatorias (Avello & Suwalsky, 2006; Coronado et al., 2015; Harasym & Oledzki, 2014; Kotha et al., 2022; Martín-del-Campo et al., 2019; Pires et al., 2021; Poljsak et al., 2021).

Durante los últimos años se ha prestado gran atención a las propiedades antioxidantes de las proteínas del lactosuero (Brandelli et al., 2015; Corrochano et al., 2019; Kerasioti et al., 2016; Ling et al., 2022; Nabuco et al., 2019; Olvera-Rosales et al., 2022; Pires et al., 2021; Zang et al., 2021). Se ha aceptado también que la biodisponibilidad de un nutriente contempla la fracción de este que está disponible para la función biológica y que para que esto ocurra debe estar previamente bioaccesible, es decir liberada de la matriz alimentaria durante el proceso digestivo y disponible para la bioconversión (Alonso, 2014; Saura-Calixto et al., 2007). Por lo tanto, la determinación de las propiedades de un compuesto bioactivo en la fracción bioaccesible obtenida tras la digestión *in vitro* de un alimento, es una buena indicación de su biodisponibilidad *in vivo*. La actividad antioxidante de las muestras de este estudio antes y después de la digestión *in vitro* se resume en la Tabla 22.

Los resultados obtenidos antes del proceso de digestión *in vitro* mostraron diferencias pequeñas pero significativas en las propiedades antioxidantes entre las muestras de lactosuero, que a su vez fueron distintas respecto a la bebida *Colada*. La muestra de LEc-I mostró la mayor capacidad para neutralizar radicales libres según el ensayo ABTS, aunque no se observaron diferencias en los valores de DPPH. El poder reductor, medido por el método FRAP, fue distinto entre las muestras de lactosuero ecuatoriano, pero ambas ofrecieron valores similares respecto al lactosuero español. El contenido en polifenoles (PFT) fue marcadamente superior en el LEc-V. Los valores de actividad antioxidante en la *Colada* fueron en todos los casos significativamente más elevados que en todas las muestras de lactosuero, lo cual puede ser atribuido, no sólo a las proteínas séricas, sino al contenido de otros compuestos antioxidantes, como los polifenoles, proporcionados por la cebada y el Maracuyá (He et al., 2020; Mohamed et al., 2019). De hecho, el valor de PFT fue casi 3 veces superior en la Colada que en las muestras de lactosuero. El análisis de las correlaciones de Pearson confirmó la estrecha relación entre el contenido en polifenoles y los

valores de ABTS (r=0.9739, P=0.0000), DPPH (r=0.9735, P=0.0000) y FRAP (r=0.9880, P=0.0000) en los extractos de las muestras antes de ser digeridas.

Tabla 22. *Actividad antioxidante (mM Eq. trolox /kg) y contenido en polifenoles totales (PFT, mM ácido gálico/kg) de las muestras antes y después de la digestión in vitro (fracciones bioaccesible y residual)*

	LEc-I	LEc-V	LEs	*P*	*Colada*
Antes de la digestión					
ABTS	0.22 ± 0.001 c*	0.19 ± 0.001 b*	0.17 ± 0.002 a*	0.0000	0.76 ± 0.002
DPPH	0.11 ± 0.001*	0.11 ± 0.001*	0.11 ± 0.001*	0.7814	0.51 ± 0.01
FRAP	0.21 ± 0.004 a*	0.23 ± 0.004 b*	0.22 ± 0.005 ab*	0.0412	0.74 ± 0.01
PFT	0.14 ± 0.005 a*	0.20 ± 0.005 b*	0.15 ± 0.004 a*	0.0000	0.46 ± 0.02
Después de la digestión					
Fracción bioaccesible					
ABTS	1.28 ± 0.02	1.17 ± 0.05	1.32 ± 0.04	0.0650	1.21 ± 0.04
DPPH	0.53 ± 0.006 c*	0.30 ± 0.007 a*	0.49 ± 0.01 b*	0.0000	0.41 ± 0.006
FRAP	0.76 ± 0.03 a*	1.18 ± 0.07 b*	1.11 ± 0.06 b*	0.0013	1.17 ± 0.07
PFT	0.63 ± 0.06 a*	1.42 ± 0.08 b*	1.73 ± 0.10 c*	0.0000	2.43 ± 0.12
Fracción residual					
ABTS	0.18 ± 0.002 b*	0.16 ± 0.004 a*	0.19 ± 0.002 b*	0.0001	0.15 ± 0.001
DPPH	0.032 ± 0.003*	0.035 ± 0.002*	0.024 ± 0.003*	0.0504	0.046 ± 0.004
FRAP	0.035 ± 0.006	0.042 ± 0.009	0.037 ± 0.011	0.8783	0.052 ± 0.014
PFT	0.41 ± 0.02	0.52 ± 0.06	0.54 ± 0.05	0.1644	0.58 ± 0.04

LEc-I, lactosuero ecuatoriano de invierno; LEc-V, lactosuero ecuatoriano de verano; LEs, lactosuero español. ABTS, 2,2′-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); DPPH, 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl; FRAP, ferric reducing antioxidant power.
Los valores son la media ± SE (n=4). Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre las muestras de lactosuero; el símbolo * indica diferencias significativas con respecto a la Colada (ANOVA + test LSD, $P< 0.05$).

Tras la digestión *in vitro* se observó un efecto estimulante en las propiedades antioxidantes de las muestras, con aumentos significativos de alrededor de 7 veces en los ensayos ABTS (Figura 19) en LEc-I y LEc-V, mientras que en LEs fue de 9 veces y en la *Colada* de 2 veces. Para FRAP en las muestras del Ecuador el aumento fue de 4 veces para LEc-I y de 5 veces para LEc-V; este

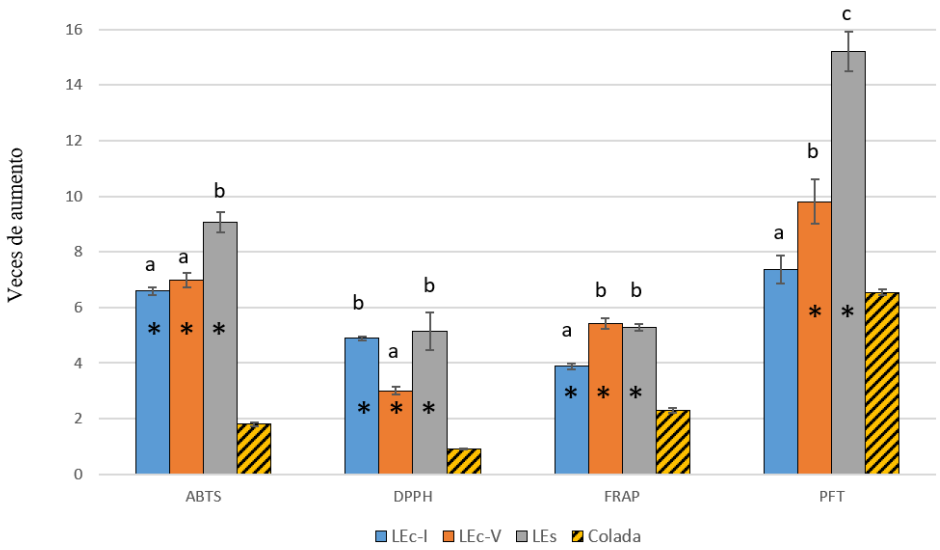
mismo aumento se encontró en LEs, mientras que para la *Colada* fue de 2 veces. Para DPPH los valores para LEc-I y LEs fue de 5 veces, para LEc-V de 3 veces y en la *Colada* se observó una reducción de 1 vez. En cuanto al contenido en PFT, LEc-I aumentó 7 veces y LEc-V 10 veces, mientras que LEs superó considerablemente a los lactosueros ecuatorianos con un aumento de 15 veces. La *Colada* por su parte aumentó 7 veces. De estos resultados se deduce que el efecto positivo de la digestión sobre las propiedades antioxidantes fue mucho menor en la *Colada* que en las muestras de lactosuero. Otros autores también han observado el efecto positivo de la digestión en las propiedades antioxidantes de los alimentos (Borges et al., 2019; Pastoriza et al., 2011; Seiquer et al., 2015). Nuestros resultados están en correspondencia con lo reportado por otros autores en cuanto al aumento del poder antioxidante del lactosuero tras la hidrólisis (Bagheri et al.,2014), el que se atribuye a su contenido en aminoácidos hidrófobos y aromáticos que actúan como donantes de protones para estabilizar radicales libres (Arranz et al., 2019; Corrochano et al., 2019; Mann et al., 2015). Los trabajos de Corrochano et al., (2018; 2019) muestran que la fracción proteica del lactosuero aumenta su potencial antioxidante tras la digestión, y que en ese momento las proteínas séricas β-LG y α-LA, especialmente esta última, son las responsables mayoritarias de las propiedades antioxidantes en el tracto digestivo. Además, se conoce que la mezcla de lactosuero con alimentos ricos en antioxidantes mejora su bioactividad y que la interacción de PFT con otros compuestos de la propia matriz alimentaria contribuye a que esto ocurra (Zang et al., 2021). De igual forma, en las bebidas formuladas con suero de leche mezclado con frutas se ha visto potenciado el contenido en polifenoles (Jalao, 2020). Se ha observado también que durante la digestión, algunos antioxidantes presentes en los alimentos al ser combinados con proteínas del lactosuero pueden aumentar su bioaccesibilidad (Yin et al., 2020) y que la combinación de lactosuero con vegetales fortalece la actividad antioxidante de preparaciones alimentarias (Alam et al., 2020). Por tanto, parece ser que, mientras que antes de la digestión los polifenoles son los responsables mayoritarios de las propiedades antioxidantes, después de la digestión se generan otros compuestos que también colaboran en dicha actividad. De hecho, en la fracción bioaccesible se observó que los ensayos ABTS y DPPH (que indican el poder neutralizador de radicales libres) ya no estaban directamente relacionados con el contenido en polifenoles, que sólo mostró una correlación positiva con el ensayo FRAP (que indica la capacidad reductora, r=0.8940, P =0.0000).

Las modificaciones producidas durante el proceso digestivo de las muestras podrían ser también las responsables de la menor estimulación de las propiedades antioxidantes observada en la *Colada*,

respecto a las muestras de lactosuero aislado. Es un hecho aceptado que tras la digestión *in vitro* la actividad antioxidante en el lactosuero aumenta, pero este efecto puede verse alterado si se añaden otros compuestos que muestren actividad antioxidante (Arranz et al., 2019). En este sentido, los antioxidantes de la cebada y del maracuyá añadidos en la fórmula de la *Colada* (especialmente los carotenoides y polifenoles) pudieron haber afectado la digestibilidad de las proteínas séricas, reduciendo la liberación de los péptidos antioxidantes y aminoácidos y, por lo tanto, produciendo un menor aumento en la actividad antioxidante de la *Colada*; esto ha sido previamente mostrado por otros autores (Arranz et al., 2019) y explicaría las diferencias en las propiedades antioxidantes de los lactosueros y la *Colada* durante la digestión. Al respecto, la interacción de las proteínas lácteas con los polifenoles puede formar complejos proteína-polifenoles mediante enlaces no-covalentes que afectan la capacidad donadora de electrones y las propiedades antioxidantes de los polifenoles, pero también a la digestibilidad de las proteínas (He et al., 2015; Martínez- Valverde et al., 2000). En apoyo de esta hipótesis, se observó en nuestro estudio una correlación negativa entre el contenido inicial de polifenoles totales y la estimulación de las propiedades antioxidantes de las muestras durante la digestión, es decir, a mayor contenido en polifenoles, menor aumento de la actividad antioxidante (r=-0.9234, P=0.0000; r=-0.8602, P=0.0000; r=-0.7705, P=0.0005, para ABTS, DPPH y FRAP, respectivamente).

En este sentido, también se ha reportado que la leche añadida en el té o el café disminuye la actividad antioxidante de las preparaciones alimentarias en las que se produce la mezcla (Arts et al., 2001; Dubeau et al., 2010; Niseteo et al., 2012), debido a la interacción de los polifenoles del té con las proteínas de la leche β-caseínas (α-, β-CN) y β-lactoglobulina (β-LG) (He et al., 2015), efecto que ocurre también con los jugos de naranja y fresa mezclados con leche (Tadapaneni et al., 2012; Zulueta et al., 2009). Contrario a esto, algunos autores han mostrado que los complejos formados entre proteínas y polifenoles durante la digestión, potencian la actividad antioxidante, como en el caso de concentrados de proteína de linaza (Guimarães Drummond E Silva et al., 2017).

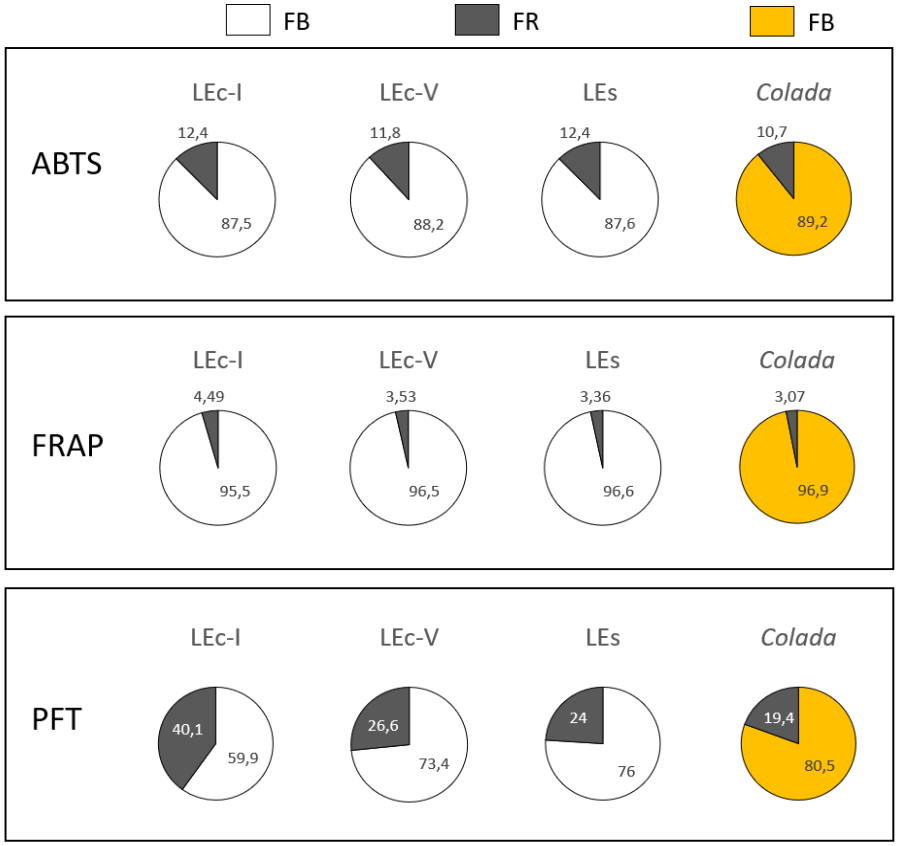
Figura 19. *Efecto del proceso digestivo en las propiedades antioxidantes y la cantidad de polifenoles totales de las muestras de lactosuero y Colada (expresado en veces de aumento)*



LEc-I, lactosuero ecuatoriano de invierno; LEc-V, lactosuero ecuatoriano de verano; LEs, lactosuero español.
ABTS, 2,2′-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); DPPH, 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl; FRAP, ferric reducing antioxidant power. PFT, polifenoles totales.
Los valores son la media ± SE (n=4). Letras distintas indican diferencias significativas entre las muestras de lactosuero; el símbolo * indica diferencias significativas con respecto a la *bebida Colada* (ANOVA + test LSD, P< 0.05).

La actividad antioxidante, al igual que los polifenoles totales resultantes de la digestión, se localizaron principalmente de la fracción bioaccesible (FB) (aproximadamente el 90 % de ABTS y FRAP; 60-80 % de polifenoles), aunque también se detectaron en la fracción residual (FR), normalmente descartada en este tipo de estudios (Figura 20). La FR reportó niveles importantes de actividad antioxidante (8 % de la capacidad media de eliminación de radicales y 28 % en los compuestos fenólicos) , por lo que debe ser tomada en cuenta por cuanto puede ejercer un efecto local a nivel digestivo y, además, ser metabolizada por la microbiota intestinal en complejos potencialmente absorbibles (Cardona et al., 2013).

Figura 20. *Contribución a las propiedades antioxidantes y la cantidad de polifenoles totales de las fracciones bioaccesible (FB) y residual (FR) obtenidas tras la digestión in vitro de las muestras de lactosuero y Colada (expresada en %).*



LEc-I, lactosuero ecuatoriano de invierno; LEc-V, lactosuero ecuatoriano de verano; LEs, lactosuero español. ABTS, 2,2′-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); DPPH, 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl; FRAP, ferric reducing antioxidant power; PFT, polifenoles totales
Los valores son la media ± SE (n=4).

Por lo general, las propiedades antioxidantes de los compuestos alimentarios se miden *in vitro* determinando la capacidad de transferir átomos de hidrógeno o electrones a un oxidante, y los métodos ABTS, DPPH y FRAP se usan comúnmente con este objetivo. Sin embargo, en estos métodos falta el componente *ex vivo*, es decir, la respuesta de la propia célula ante la exposición a los compuestos objeto de estudio.

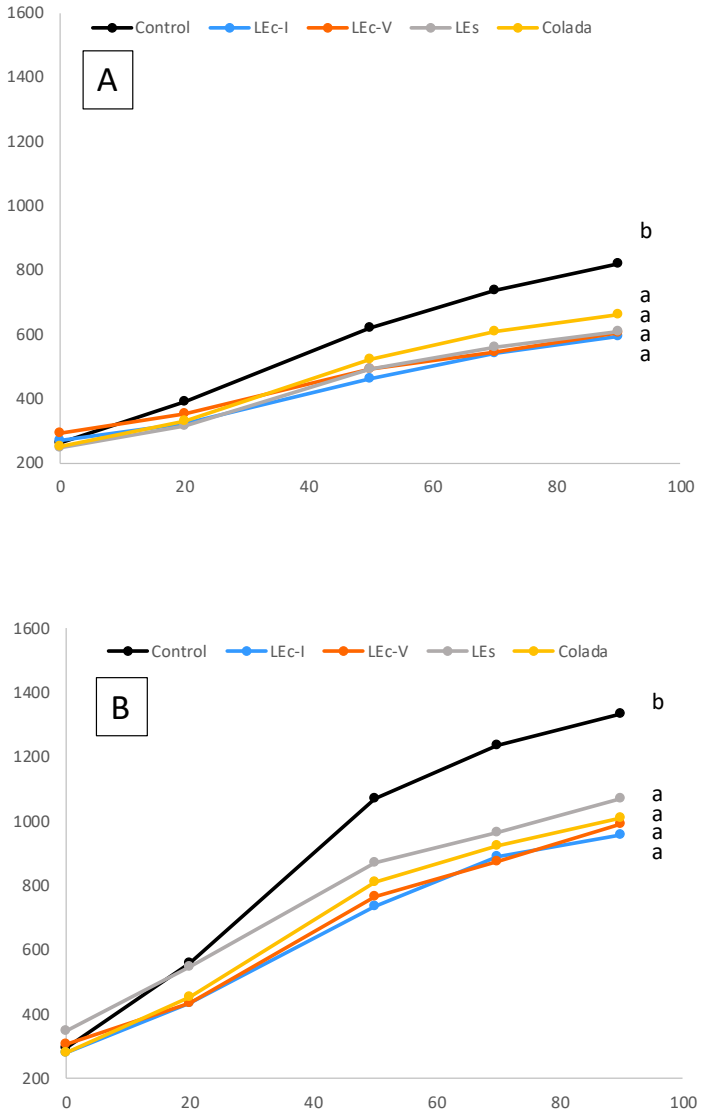
El uso de sistemas modelo celulares, sumados a los métodos de digestión *in vitro* constituyen una herramienta valiosa para evaluar **la bioactividad de los compuestos a nivel celular**, además de simular la absorción intestinal y posterior evaluación de la biodisponibilidad de los componentes de los alimentos. En nuestro caso, la actividad antioxidante de las muestras tras la digestión *in vitro* se estudió también **en células Caco 2**, línea celular intestinal que se ha venido utilizando con éxito para evaluar mejor el potencial antioxidante *in vivo* de los compuestos dietéticos (Brandelli et al., 2015; Seiquer et al., 2015).

Las células Caco-2 preincubadas durante 2 horas con la fracción bioaccesible de las muestras de lactosuero y *Colada* redujeron significativamente la generación de ROS en condiciones basales (**Figura 21 A**) y, aún más, se observó un efecto protector contra el estrés oxidativo inducido (25 % de disminución en la producción de ROS, **Figura 21 B**), confirmando así la actividad antioxidante de las muestras digeridas a nivel celular. Todas las muestras estudiadas, incluida la *Colada*, tuvieron un efecto antioxidante reduciendo la producción de radicales libres a nivel celular respecto a las células control, y no hubo diferencias significativas entre ellas, lo que sugiere que la capacidad de las muestras para reducir la generación celular de ROS podría ser mayoritariamente atribuidas a la fracción proteica del lactosuero, elemento común a todas ellas. De hecho, se ha observado en ciertos compuestos fenólicos que, aunque muestran habilidades antioxidantes *in vitro*, no son capaces de proteger a las células de un daño oxidativo inducido (Pasqualetti et al., 2021), lo que sugiere que los mecanismos de acción a nivel biológico son diferentes.

De acuerdo con nuestros resultados, en cultivos celulares se ha demostrado que las proteínas séricas protegen contra la oxidación, y se han propuesto diversos mecanismos de acción, como la estimulación las defensas antioxidantes celulares (glutatión y la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa) y el aumento en la expresión de genes vinculados a la capacidad antioxidante de las células, fundamentalmente HO-1, NQO1 y Nrf2 (O'Keeffe & FitzGerald, 2014; Xu et al., 2011).Curiosamente, en el ensayo de Corrochano et al., (2018) en las células Caco-2, las proteínas de suero de leche digeridas aisladas no pudieron reducir la formación inducida de ROS, aunque fueron efectivas en las células HT-29 y para estimular las enzimas antioxidantes. En el caso de la *Colada*, no se puede descartar que otros componentes alimentarios empleados en la formulación hayan contribuido a la capacidad de protección contra la generación de radicales libres observada en las células Caco-2, como los polifenoles aportados por la cebada y el Maracuyá, de reconocida actividad antioxidante. Recientemente, la búsqueda de bebidas

funcionales a base de lactosuero está también enfocada a las preparaciones que contienen concentrados de proteína sérica con probióticos, ya que las proteínas estimulan su crecimiento y los protegen del estrés oxidativo debido precisamente a sus notables propiedades antioxidantes (Ansari et al., 2020; Dinkçi et al., 2023).

Figura 21. *Generación de ROS en células Caco-2 preincubadas con los digeridos (FB) de las muestras de lactosuero y Colada (expresada en unidades de fluorescencia) y comparación con las células control incubadas con medio de cultivo.*



LEc-I, lactosuero ecuatoriano de invierno; LEc-V, lactosuero ecuatoriano de verano; LEs, lactosuero español. **A**, condiciones basales; **B**, condiciones de estrés inducido. Los valores son la media ± SE (n=4).

4.4. Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de minerales en las muestras de lactosuero y *Colada*

Los minerales son sustancias de gran valía en diferentes procesos biológicos entre los que se encuentran, el crecimiento y el desarrollo. Se ha establecido que la biodisponibilidad mineral está en correspondencia con la absorción en la dieta y que puede ser afectada por factores fisiológicos (dependientes del propio individuo) y factores dietéticos (aquellos relacionados con la composición de la dieta o alimento y con su procesado). Entre los factores dietéticos, algunos componentes de la matriz alimentaria como los fitatos y oxalatos son los principales inhibidores de la absorción de metales divalentes como Ca, Fe, y Zn, por la falta en el organismo de enzimas capaces de hidrolizarlos (Walters et al., 2018). También está bien establecida la capacidad de interacción de los minerales con otros componentes alimentarios como proteínas, carbohidratos y lípidos. En este sentido, la formación de complejos de iones metálicos divalentes con proteínas ha mostrado favorecer la solubilidad mineral y su absorción, restringiendo además la reactividad como en el caso de la oxidación lipídica originada por Fe y/o Cu) (Jones et al., 1985; Schuchardt & Hahn, 2017; Walters et al., 2018). Esta relación mineral-factores dietéticos puede afectar la biodisponibilidad mineral, es decir, la fracción del mineral total contenido en el alimento o dieta que es digerida, absorbida y metabolizada por las vías metabólicas normales (Lu et al., 2012; Martínez-Navarrete et al., 2002; Mehansho, 2006).

Los minerales en la leche están presentes como iones inorgánicos y sales, o formando complejos con proteínas o péptidos, carbohidratos, grasas y ligandos de bajo peso molecular (Vegarud et al., 2000). En la leche, la caseína es el principal quelante de minerales, especialmente de calcio, pero también las proteínas del suero son capaces de unirse de manera específica al calcio, magnesio, zinc, hierro, sodio y potasio. Además, los péptidos formados durante la digestión de las proteínas séricas actúan como "atrapadores" de minerales, y pueden funcionar como transportadores o quelantes, afectando así su biodisponibilidad.

Tras la hidrolisis proteica, las proteínas y los péptidos de bajo peso molecular poseen la capacidad de unión a los minerales divalentes mejorando su solubilidad y biodisponibilidad gracias a los residuos de aminoácidos de cadena lateral iónica (Yadav et al., 2015). Los aminoácidos His y Cys atrapan los iones metálicos, mientras que las interacciones hidrófobas y el apilamiento de

anillos aromáticos son los responsables de estabilizar la posición de los iones metálicos en el péptido (Eckert et al., 2014). Se ha reportado que α-LA tiene dos sitios de unión para Ca^{2+} y que los péptidos liberados tras la digestión son afines al hierro, además que en células Caco-2 los complejos péptido-hierro pueden ser precursores de la absorción de hierro (Wang et al., 2014).

4.4.1. Bioaccesibilidad mineral

Según los resultados, reportados en el apartado 4.1. el contenido medio de los minerales predominantes en las muestras objeto de estudio fue por orden de abundancia: K, Na, P, Ca y Mg, seguidos de los elementos traza Fe y Zn. Los minerales detectados en las fracciones bioaccesible y residual obtenidas tras la digestión *in vitro* se muestra en las Tablas 23 y 24. Los resultados se han expresado en contenido absoluto (µg/g de muestra digerida) y relativo (porcentaje de mineral -bioaccesible o residual- respecto al total contenido en la muestra inicial).

Tabla 23. *Bioaccesibilidad del calcio, fósforo y magnesio en las muestras de lactosuero y Colada después de la digestión in vitro (fracciones bioaccesible y residual)*

	LEc-I	LEc-V	LEs	*P*	*Colada*
Calcio					
Inicial (µg/g)	320 ± 0.1 c*	299 ± 0.3 a	314 ± 0.4 b*	0.0000	299 ± 1
F. Bioaccesible (µg/g)	168 ± 9 b*	123 ± 3 a*	152 ± 2 b*	0.0035	58.0 ± 1.06
(%)	52.4 ± 2.82 b*	41.1 ± 0.98 a*	48.2 ± 0.56 b*	0.0105	19.4 ± 0.37
F. Residual (µg/g)	79.8 ± 3.38 a*	111 ± 9 b*	118 ± 1 b*	0.0073	225 ± 3
(%)	24.9 ± 1.04 a*	37.3 ± 3.1 b*	37.4 ± 0.31b*	0.0053*	75.5 ± 0.98
Fósforo					
Inicial (µg/g)	317 ± 2 b*	307 ± 2 a*	371 ± 3 c*	0.0000	396 ± 2.33
F. Bioaccesible (µg/g)	197 ± 18	256 ± 31	275 ± 11	0.0980	280 ± 29
(%)	62.1 ± 5.77	83.2 ± 9.58	74.0 ± 3.27	0.1637	70.8 ± 7.64
F. Residual (µg/g)	99.5 ± 2.36 b*	45.0 ± 5.98 a*	102 ± 2.63 b*	0.0001	74.3 ± 0.56
(%)	31.3 ± 0.75 b*	14.6 ± 2.03 a*	27.4 ± 0.64 b*	0.0002	18.8 ± 0.12
Magnesio					
Inicial (µg/g)	68.7 ± 0.34 b*	63.7 ± 0.35 a*	69.0 ± 0.58 b*	0.0002	88.0 ± 0.58
F. Bioaccesible (µg/g)	59.6 ± 4.63*	53.0 ± 3.60*	56.3 ± 1.45*	0.4578	74.9 ± 2.94
(%)	86.8 ± 7.03	77.9 ± 1.69	81.4 ± 1.34	0.3911	84.9 ± 3.01
F. Residual (µg/g)	13.8 ± 0.20*	12.9 ± 0.14*	13.1 ± 0.29*	0.0562	10.2 ± 0.90

(%)	20.1 ± 0.30*	20.2 ± 0.29*	18.9 ± 0.50*	0.1035	11.6 ± 0.91

LEc-I, lactosuero ecuatoriano de invierno; LEc-V, lactosuero ecuatoriano de verano; LEs, lactosuero español.
Los valores son la media ± SE (n=3). Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre las muestras de lactosuero; el símbolo * indica diferencias significativas con respecto a la *Colada* (ANOVA + test LSD, $P< 0.05$).

4.4.1.2 Bioaccesibilidad del calcio

Se sabe que las proteínas del lactosuero son quelantes de minerales y que la β-LG y α-LA son capaces de ligar calcio, con lo cual los complejos formados podrían contribuir a mantener el calcio soluble y mejorar su absorción (Skibsted, 2016). α-LA presenta alta afinidad por iones metálicos como magnesio, potasio, sodio, hierro y especialmente calcio (Domínguez-Puerto et al., 2018).

Algunos autores han aislado péptidos del lactosuero quelantes de Ca (Huang et al., 2015; Zhao et al., 2014), y han identificado incluso las secuencias de aminoácidos de mayor capacidad para unir Ca. Los péptidos Glu-Gly y Gly-Tyr han sido propuestos como los de mayor afinidad para formar complejos con Ca, que, además, tienen una buena solubilidad a pH intestinal.

La bioaccesibilidad del Ca en los lactosueros varió desde 41 % en la muestra ecuatoriana de verano hasta cifras en torno al 50 % en las otras dos muestras, valores todos ellos superiores a la bioaccesibilidad promedio reportada en otras matrices alimentarias que es de aproximadamente el 30 % (Barboza et al., 2015; Saseta, 2007), y que está en correspondencia con la cantidad de calcio soluble tras la digestión intestinal. En la *Colada* la bioaccesibilidad fue del 19,4 %, significativamente inferior respecto a las muestras de lactosuero, valor que era de esperarse por la presencia de los ácidos fítico y oxálico presentes en los ingredientes de la fórmula, los que hacen que se formen complejos insolubles con el calcio, que por tanto se localiza en mayor medida en la fracción residual (75 % frente a un valor promedio de un 33 % en las muestras de lactosuero).

Nuestros resultados se corresponden con los reportados por Wang et al., (2023), quienes demostraron que la unión del calcio a los péptidos escindidos durante la digestión *in vitro* de α-LA y β-LG mejoran la bioaccesibilidad del calcio, y son similares a los de Guefai et al., (2022), que

reportaron una bioaccesibilidad promedio del calcio del 49,20 % en muestras de proteína de suero en polvo digeridas *in vitro*.

Estudios recientes han comparado la bioaccesibilidad del calcio en diversos alimentos, incluyendo la leche y productos de origen vegetal, utilizando el método INFOGEST (Muleya et al., 2024). Los autores observaron valores del 30 % de Ca bioaccesible en leche desnatada, superior a la mayoría de los productos con los que comparan, con algunas excepciones como los guisantes o el brócoli, que alcanzan cifras superiores al 40 %. Por tanto, los resultados de bioaccesibilidad de Ca en nuestras muestras de lactosuero fueron mucho más elevados que los observados en otros alimentos siguiendo la misma metodología. El Ca bioaccesible observado en la *Colada* (17 %) también es mayor que el mostrado en otras bebidas vegetales de almendra o soja (4-5 %), lo que sugiere que el lactosuero mejora significativamente la bioaccesibilidad de este mineral.

Los datos de nuestro estudio muestran que el consumo de lactosuero puede ser beneficioso para mejorar la utilización del Ca dietético y prevenir deficiencias; la importancia de este hecho radica en que la deficiencia de Ca está relacionada con la hipertensión, osteoporosis y cáncer de intestino y, además, la ingesta de Ca disponible favorece la formación de masa ósea en niños y adolescentes y, por tanto, la prevención de fracturas en la edad adulta (Mesías et al., 2011).

4.4.1.3. Bioaccesibilidad del fósforo

Las muestras estudiadas ofrecieron cifras elevadas de P bioaccesible, que variaron desde 62 % en el lactosuero ecuatoriano de invierno, hasta 83 % en el lactosuero de verano, mientras que la *Colada* mostró valores intermedios en torno al 71 %. Las diferencias, sin embargo, no llegaron a ser significativas. En la fracción residual obtenida tras la digestión se localizaron cantidades de P que oscilaron entre un 14 % del total en la muestra de lactosuero ecuatoriano de verano, hasta cifras superiores al 30 % en el lactosuero de invierno, diferencias que fueron significativas y también con respecto a los valores de P residual en la *Colada* (19 %).

Péptidos de pequeño tamaño escindidos de las proteínas del suero pueden fijar el fósforo, además del calcio, y ser responsables de la absorción de estos minerales (Comar et al., 1956; Hall & Lehmann, 1944; Raven et al., 1960). El fósforo dietético reduce la formación de complejos insolubles de metal-fosfato en el intestino, especialmente con calcio y magnesio. La solubilidad y concentración en el intestino delgado de estos dos minerales tras la digestión podrían ser atribuidas

a la acción de las sales biliares; al parecer el grado de hidrólisis de α-LA influye en el proceso de transporte activo del calcio, así como en la absorción del fósforo (Pantako & Amiot, 2001). Por tanto, la reducción en la formación de complejos insolubles pudo haber favorecido la bioaccesibilidad del fósforo en los lactosueros y la *Colada*, mitigando además el efecto anti nutricional del ácido fítico y oxálico, y permitiendo una bioaccesibilidad promedio del 72 %. Nuestros resultados son similares a los datos de P bioaccesible observados tras la digestión *in vitro* de la leche, ya sea ecológica (56-91 %) o convencional (51-81 %) (Costa-Santos et al., 2024) y están en línea con el valor medio de 82 % observado para la solubilidad del P en leche entera, semidesnatada o desnatada (Lacerda-.Sanches et al. 2020). Por tanto, nuestros datos muestran que, tanto el lactosuero como la *Colada* son buenas fuentes de fósforo disponible, ya que alcanzan valores incluso superiores al 80 % de solubilidad post-digestión en algunas de las muestras, como el lactosuero ecuatoriano de verano.

4.4.1.4. Bioaccesibilidad del magnesio

La absorción del magnesio, como la del resto de los minerales, varía en función de la matriz alimentaria, la dosis ingerida y la presencia de sustancias que favorezcan o inhiban su biodisponibilidad. En dietas regulares se absorbe alrededor de un 50 %, e incluso puede superar el 70 % (Aranda et al., 2000), aunque tras la ingesta de alimentos ricos en fibra este porcentaje se puede ver disminuido (Institute of Medicine,1997; Siener & Hesse, 1995).

En nuestro ensayo, la fracción bioaccesible del magnesio se mantuvo en el orden del 82 % entre LEc-I, LEc-V y LEs, mostrando valores elevados de solubilidad en todas las muestras. Es de suponer que los complejos formados tras la digestión, principalmente con los péptidos liberados, favorecieron la solubilidad del Mg. En la *Colada* se mantuvo el mismo patrón con una bioaccesibilidad del 84.9 %, por lo que, se estima que, en el caso del Mg, no se formaron complejos insolubles con los componentes de la *Colada*, tal y como se observó con el calcio, de forma que la solubilidad de este mineral se mantuvo en valores altos. Nuestros resultados superan al promedio reportado para el magnesio bioaccesible de 56.35 % obtenido de muestras de proteína de suero en polvo sometidas a digestión *in vitro* por Guefai et al., (2022). Por otra parte, los datos de bioaccesibilidad de Mg tras la digestión *in vitro* de la leche por el protocolo de INFOGEST, muestran valores medios en torno al 85 % (Costa-Santos et al., 2024), comparables con nuestros

resultados obtenidos en las muestras de lactosuero y *Colada*, que no ofrecieron diferencias significativas entre las muestras.

El estudio de las correlaciones de Pearson entre los resultados de Ca, P y Mg muestra que existió una correlación positiva del Ca bioaccesible con el Ca total inicial de las muestras (r= 0.773, P= 0.0032). Sin embargo, se observaron correlaciones negativas de la bioaccesibilidad del Ca con el contenido de P (r= -0.638, P= 0.0255) y de Mg (r= -0.849, P= 0.0005) de las muestras estudiadas, es decir, a mayor contenido de P y Mg, menor fue el Ca bioaccesible, lo cual confirma la estrecha relación entre la disponibilidad de estos minerales (Cámara-Martos et al. 2002). Pese a ello, en nuestro estudio la solubilidad del P y Mg no se vio afectada por los niveles iniciales de Ca, P o Mg, ya que no se observaron relaciones significativas.

Tabla 24. *Bioaccesibilidad del sodio, potasio y hierro en las muestras de lactosuero y Colada después de la digestión in vitro (fracciones bioaccesible y residual)*

	LEc-I	LEc-V	LEs	*P*	*Colada*
Sodio					
Inicial (µg/g)	356 ± 1 b*	353 ± 2 ab*	351 ± 1 a*	0.0303	343 ± 2.03
F. Bioaccesible (µg/g)	297 ± 14 a*	279 ± 6 a*	333 ± 3 b*	0.0154	220 ± 6
(%)	83.3 ± 4.14 a*	78.9 ± 1.48 a*	95.1 ± 0.93 b*	0.0113	64.2 ± 1.90
F. Residual (µg/g)	37.1 ± 1.21 b*	64.6 ± 1.14 c*	8.67 ± 0.24 a*	0.0000	116 ± 9
(%)	10.4 ± 0.35 b*	18.3 ± 0.35 c*	2.47 ± 0.06 a*	0.0000	33.9 ± 2.71
Potasio					
Inicial (µg/g)	732 ± 2 a*	830 ± 1 b*	840 ± 1 c*	0.0000	1563 ± 3
F. Bioaccesible (µg/g)	645 ± 24*	693 ± 42*	694 ± 27*	0.5013	1524 ± 19
(%)	88.1 ± 3.41	83.6 ± 4.97*	82.6 ± 3.39*	0.6085	97.4 ± 2
F. Residual (µg/g)	27.1 ± 0.33 b*	37.5 ± 0.79 c	25.1 ± 0.57 a*	0.0000	39.0 ± 1
(%)	3.73 ± 0.05 b*	4.52 ± 0.09 c*	2.99 ± 0.06 a*	0.0000	2.50 ± 0.01
Hierro					
Inicial (ng/g)	734 ± 8 a*	792 ± 6 b*	787 ± 9 b*	0.0039	2580 ± 5
F. Bioaccesible (ng/g)	201 ± 28 a*	473 ± 52 b*	19 ± 21 a*	0.0011	1210 ± 55
(%)	27.2 ± 3.63 a*	59.7 ± 6.15 b	15.1 ± 2.60 a*	0.0009	46.9 ± 2.06
F. Residual (ng/g)	606 ± 2 b*	348 ± 33 a*	646 ± 59 b*	0.0034	899 ± 42
(%)	82.5 ± 1.09 b*	43.9 ± 4.54 a	82.2 ± 8.11 b*	0.0035	34.8 ± 1.61

LEc-I, lactosuero ecuatoriano de invierno; LEc-V, lactosuero ecuatoriano de verano; LEs, lactosuero español. Los valores son la media ± SE (n=3). Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre las muestras de lactosuero; el símbolo * indica diferencias significativas con respecto a la *Colada* (ANOVA + test LSD, $P< 0.05$).

4.4.1.5. Bioaccesibilidad del sodio

Además de su papel regulador en el balance hídrico, el sodio es un mineral indispensable en la transmisión nerviosa y en la contracción muscular (Crawford, 2011) y, además, la ingesta de sodio y potasio inadecuada está relacionada con la hipertensión (Barea-Álvarez et al., 2016). En este sentido, el consumo excesivo de sales de mesa, y específicamente de sodio, es uno de los principales factores de riesgo de las enfermedades coronarias (Kodjoe, 2022); por lo que, la ingesta baja de este micronutriente en la dieta puede reducir el riesgo de hipertensión.

La fracción bioaccesible del sodio se mantuvo en el rango del 81 % en LEc-V y LEc-I, mientras que en LEs fue del 95 %; esta diferencia porcentual entre las muestras de lactosuero pudo deberse como se ha indicado anteriormente, a la diferente composición de la leche de origen, debida a su vez, entre otras cosas, a la alimentación del ganado y la diferente raza de los animales. No se ha reportado en la literatura consultada la bioaccesibilidad del sodio tras digestión *in vitro* del lactosuero. Sin embargo, Guefai et al., (2022) evaluaron en muestras de proteína de suero en polvo sometidas a digestión *in vitro* la bioaccesibilidad de este mineral, reportando una media entre muestras del 49.60 %; estos autores señalan que la solubilidad del Na mejora sustancialmente en el intestino respecto a la observada en el estómago, alcanzando valores en torno al 68 %. Según nuestros resultados, tras la digestión del lactosuero completo se alcanzaron cifras de Na bioaccesible más elevadas que las reportadas para las proteínas séricas, lo que sugiere que el resto de los componentes del lactosuero (como los ácidos grasos) favoreció la solubilidad del sodio. Respecto a la *Colada*, la bioaccesibilidad del sodio fue del 64 %, valor significativamente inferior a la media de LEc-V, LEc-I y LEs, producto de las sustancias anti nutricionales antes descritas.

4.4.1.6. Bioaccesibilidad del potasio

El potasio está íntimamente relacionado con el sodio, que es el regulador principal del volumen del líquido extracelular que se mantiene mayormente por el ubicuo canal iónico, la bomba de sodio-potasio (Na^+-K^+) ATPasa (Stone et al., 2016). Tiene un rol protagónico en muchas funciones celulares, razón por la cual para mantener la homeostasis del ser humano debe mantenerse en perfecto balance entre el espacio intracelular y extracelular, por lo que este catión es indispensable para la vida y debe mantenerse en altas concentraciones para así evitar la

hipopotasemia (Tejada Cifuentes, 2008). Por lo tanto, los alimentos ricos en potasio deben ser ingeridos diariamente por cuanto el organismo no tiene reservas de este mineral (Crawford, 2011).

La fracción bioaccesible del potasio se mantuvo en promedio en un 85 % entre las muestras de lactosuero, mientras que en la *Colada* fue del 97 %. Estos resultados superan al promedio reportado para el potasio de 47.95 % obtenido de muestras de proteína de suero en polvo sometidas a digestión *in vitro* por Guefai et al., (2022). Hay que resaltar que la bioaccesibilidad del K fue la más elevada de los elementos estudiados en nuestro ensayo, especialmente en la bebida a base de lactosuero, que alcanzó cifras del 97 %. Se observó, por tanto, que los componentes de la bebida favorecieron la solubilidad del K, mientras que para el Na se mostró el efecto contrario, es decir, se redujo, respecto a las muestras de lactosuero. En este hecho pudo influir la diferente relación Na:K de las muestras, ya que en las de lactosuero el valor medio fue de 1:2,3 pero en la *Colada* fue de 1:4.6, es decir, el contenido de K era muy superior, debido a la adición de alimentos de origen vegetal.

4.4.1.7. Bioaccesibilidad del hierro

Se sabe que el hierro interviene en diversas funciones como el transporte de oxígeno, la síntesis de proteínas, la transducción de señales intercelulares, entre otras; por lo que, la deficiencia de este mineral en la dieta puede afectar la salud humana (Wang et al., 2022). La insuficiencia de hierro se genera, más que por su cantidad en la dieta, por su baja biodisponibilidad, producto de la alta reactividad que este mineral exhibe, la que es una limitante para su absorción (Scheers, 2013).

En el lactosuero se encuentran metaloproteínas (lactoferrina, transferrina y ceruloplasmina), proteínas que fijan específicamente el cobre y el hierro, con una constante de disociación elevada que proporciona gran estabilidad del enlace metal-proteína, por lo que tienen un papel esencial en el transporte de minerales en el organismo (Hill et al., 2019).

En cuanto a la bioaccesibilidad del hierro, LEc-V tuvo el porcentaje significativamente mayor (59.70 %), respecto a las otras muestras de lactosuero, seguida de la *Colada* con un 46.90 %; entre tanto entre LEc-I y LE-V, dos muestras de la misma región y país se observó una marcada diferencia, cercana al 50 %, que pudo originarse por la estacionalidad. En la bibliografía se ha reportado la bioaccesibilidad del hierro en muestras de proteína de suero en polvo digerida *in vitro*, con valores que van desde 40 % (Guefai et al. 2022) hasta 75 % (Shilpashree et al., 2020).

La solubilidad del hierro tras la digestión de las muestras puede atribuirse a la formación de complejos solubles Fe-proteína y a la capacidad de los aminoácidos sulfurados para reducir la forma férrica a ferrosa, lo que mejora la solubilidad intestinal (Shilpashree et al., 2020).

Aunque es conocido que la adición de cereales a la dieta puede limitar la bioaccesibilidad del hierro, en nuestro estudio no se observó tal efecto en la bebida *Colada*, probablemente porque el resto de los componentes compensaron el efecto negativo y favorecieron que el Fe se mantuviera soluble durante la digestión.

4.4.2. Biodisponibilidad mineral. Ensayos en células Caco-2

Como se ha mencionado anteriormente, para estimar el valor nutritivo y potencialmente saludable de un alimento, es necesario conocer la bioaccesibilidad de sus componentes, es decir, la fracción del total que se libera durante el proceso de digestión y que está disponible para ser absorbida por el epitelio intestinal (Seiquer et al., 2015). Dicha liberación es el primer requisito para la utilización de los nutrientes del alimento, y para que éstos puedan ejercer una actividad biológica. Ahora bien, aunque es requisito que los minerales estén en forma soluble para ser absorbidos por las células intestinales, no todo el mineral que queda soluble tras la digestión podrá atravesar la barrera intestinal. Para valorar este aspecto, se utilizan los cultivos celulares de células tipo-intestinal, como la línea celular Caco-2, que poseen todas las características de los enterocitos maduros. Este sistema, acoplado a la digestión *in vitro*, forman el modelo ideal para valorar la biodisponibilidad de nutrientes y especialmente la de los minerales (Mesías et al., 2009).

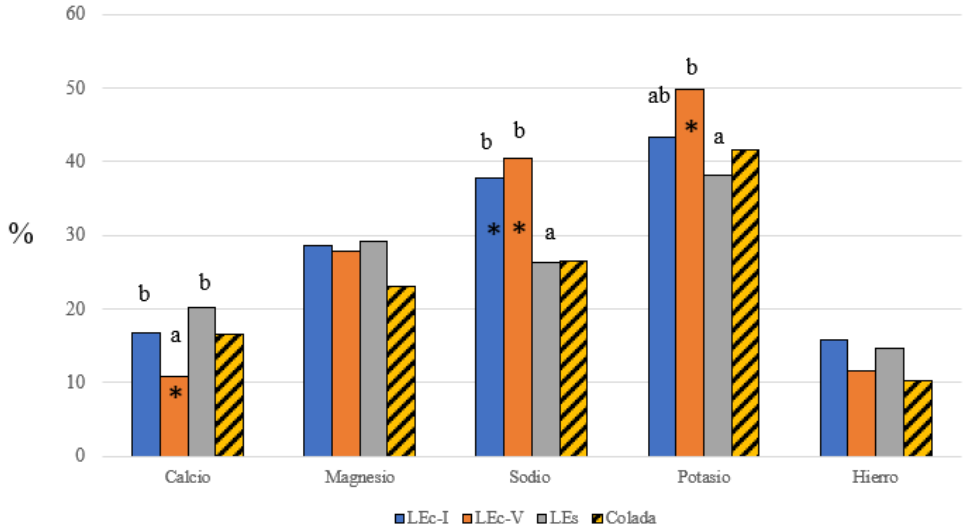
La Tabla 25 y la Figura 22 muestran los resultados obtenidos del transporte y captación en células Caco-2 de los minerales: calcio, magnesio, sodio, hierro y potasio tras la incubación durante 2h con las fracciones bioaccesibles procedentes de la digestión *in vitro* de las muestras de lactosuero y *Colada*. Los resultados de la Tabla 25 se expresan en cantidad absoluta (µg o ng/pocillo) y relativa (porcentaje respecto al contenido inicial en la cámara apical).

Tabla 25. *Transporte y captación de minerales en células Caco-2 tras 2h de exposición a la fracción bioaccesible de las muestras digeridas.*

	LEc-I	LEc-V	LEs	*P*	*Colada*
Calcio					
Cámara apical (µg/pocillo)	106	83.4	97.8		76.6
Transporte (µg/pocillo)	13.5 ± 1.20 b*	7.12 ± 0.85 a	13.4 ± 0.66 b*	0.0012	7.77 ± 0.70
(%)	12.7 ± 1.13 b	8.54 ± 1.01 a	13.7 ± 0.68 b*	0.0092	10.1 ± 0.92
Captac. celular (µg/pocillo)	4.35 ± 1.24 ab	1.94 ± 0.13 a*	6.37 ± 0.95 b	0.0219	4.88 ± 0.66
(%)	4.09 ± 1.16 ab	2.33 ± 0.16 a*	6.51 ± 0.97 b	0.0250	6.36 ± 0.86
Magnesio					
Cámara apical (µg/pocillo)	35.7	34.2	35.1		36.9
Transporte (µg/pocillo)	6.54 ± 0.16 b*	4.95 ± 0.51 a	5.87 ± 0.34 ab*	0.0389	4.42 ± 0.26
(%)	18.3 ± 0.44 b*	14.6 ± 1.34 a	16.7 ± 0.97 ab*	0.0773	12.0 ± 0.70
Captac. celular (µg/pocillo)	3.66 ± 0.57	4.56 ± 0.90	4.33 ± 0.64	0.6736	4.11 ± 0.49
(%)	10.3 ± 1.61	13.3 ± 2.64	12.3 ± 1.84	0.5875	11.1 ± 1.32
Sodio					
Cámara apical (µg/pocillo)	3846	3672	4464		4572
Transporte (µg/pocillo)	994 ± 67	1083 ± 101	875 ± 66	0.2370	950 ± 63
(%)	25.8 ± 1.76 ab	29.5 ± 2.76 b*	19.6 ± 1.48 a	0.0241	20.8 ± 1.37
Captac. celular (µg/pocillo)	458 ± 65*	401 ± 56	304 ± 41	0.1900	261 ± 11
(%)	11.9 ± 1.69*	10.9 ± 1.52*	6.81 ± 0.92	0.0690	5.7 ± 0.25
Potasio					
Cámara apical (µg/pocillo)	753	652	694		678
Transporte (µg/pocillo)	223 ± 13 b*	175 ± 6 a	171 ± 8 a	0.0074	192 ± 3
(%)	29.6 ± 1.77	26.9 ± 0.91	24.7 ± 1.13	0.0771	28.3 ± 0.48
Captac. celular (µg/pocillo)	103 ± 25	146 ± 13	93.0 ± 11.8	0.1405	90.6 ± 6.92
(%)	13.7 ± 3.39 a	22.4 ± 1.98 b*	13.4 ± 1.70 a	0.0508	13.3 ± 1.02
Hierro					
Cámara apical (ng/pocillo)	805	955	816		973
Transporte (ng/pocillo)	80.4 ± 13.8	62.1 ± 18.4	78.7 ± 12.9	0.6564	54.2 ± 14.9
(%)	9.98 ± 1.71	8.06 ± 1.13	9.65 ± 1.58	0.6381	5.57 ± 1.53
Captac. celular (ng/pocillo)	46.6 ± 7.58	34.8 ± 3.11	41.2 ± 2.17	0.2858	45.4 ± 8.14
(%)	5.78 ± 0.94	3.65 ± 0.33	5.05 ± 0.26	0.0826	4.67 ± 0.84

LEc-I, lactosuero ecuatoriano de invierno; LEc-V, lactosuero ecuatoriano de verano; LEs, lactosuero español. Los valores son la media ± SE (n=4). Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre las muestras de lactosuero; el símbolo * indica diferencias significativas con respecto a la *Colada* (ANOVA + test LSD, P< 0.05).

Figura 22. *Biodisponibilidad mineral (transporte + captación) en células Caco-2 tras 2h de exposición a la fracción bioaccesible de las muestras digeridas (expresado en % de la cantidad inicial presente en la cámara apical)*



LEc-I, lactosuero ecuatoriano de invierno; LEc-V, lactosuero ecuatoriano de verano;
LEs, lactosuero español.
Los valores son la media ± SE (n=4). Letras distintas indican diferencias significativas entre las muestras de lactosuero; el símbolo * indica diferencias significativas con respecto a la bebida Colada (ANOVA + test LSD, P< 0.05).

4.4.2.1. Biodisponibilidad del calcio

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de lactosuero en cuanto a la absorción del calcio a través de las monocapas de células Caco-2, con promedios similares para LEc-I y LEs con un transporte del 13 %, mientras que en LEc-V la absorción fue del 8.5 %. En cuanto a la *Colada*, se observó una absorción del calcio en torno al 10 % del total añadido a las cámaras apicales, es decir, una cifra muy similar a la obtenida con las muestras de lactosuero. Por tanto, nuestros resultados muestran que, aunque la bioaccesibilidad del calcio fue significativamente mayor en las muestras de lactosuero que en la *Colada* (Tabla 24), el mineral que queda soluble tras la digestión se absorbió a través de las células intestinales en proporciones

similares en las muestras de lactosuero y en las de *Colada;* es decir, la menor biodisponibilidad del calcio en la bebida se debe fundamentalmente a su menor solubilidad durante la digestión *in vitro* (Tabla 25 y Figura 22), pero no a la menor absorción del calcio soluble.

Por tanto, es de suponer que, tras la digestión de las muestras, el Ca se mantiene soluble formando complejos con los péptidos bioactivos resultantes de la digestión del lactosuero, y que estos complejos son transportados a través de la monocapa de células intestinales con similar eficacia en todas las muestras. Trabajos previos realizados en nuestro grupo sobre la absorción de Ca en células Caco-2 ya mostraron un patrón similar con otras matrices alimentarias (Seiquer et al., 2001).

4.4.2.2. Biodisponibilidad del magnesio

La mayor parte del magnesio biodisponible se absorbe en el intestino delgado, mientras que fracciones más pequeñas son absorbidas a través del colon. Existe poca información sobre la biodisponibilidad de este mineral, se conoce que es absorbido como ion pero no se sabe si se absorbe en forma de complejos o junto a otros nutrientes (Schuchardt & Hahn, 2017).

El magnesio soluble tras la digestión se absorbió a través de las células intestinales Caco-2 notándose diferencias estadísticamente significativas entre los lactosueros. Las muestras que tuvieron mayor absorción fueron LEc-I, 18.3 % y LEs 16.7 %, entre tanto LEc-V reportó menor transporte de este mineral, 14.6%; seguida de la *Colada* con un 12 %. Según nuestros resultados, aunque todas las muestran mostraron datos de Mg bioaccesible en torno al 80 %, el Mg soluble tras la digestión de la *Colada* se absorbió a través de las células intestinales con menor eficacia que en los lactosueros. Sin embargo, las cifras globales de biodisponibilidad (transporte + captación celular, Figura 22), no llegaron a alcanzar diferencias significativas entre las muestras.

4.4.2.3. Biodisponibilidad del Sodio

Aunque la absorción de todos los iones es importante para el equilibrio electroquímico del organismo, la del sodio destaca por su papel osmolar en el líquido extracelular. Además, en el intestino el movimiento de sodio facilita la absorción de otros iones y moléculas orgánicas y todo gracias a la presencia de las bombas de sodio/potasio electrogénicas de la membrana basolateral

que crean el vacío de sodio suficiente como para que se establezca un importante gradiente entre el lumen y el citoplasma del enterocito.

El sodio bioaccesible se absorbió a través de las células intestinales Caco-2 en proporciones parecidas entre las muestras de Ecuador LEc-I, 25.8 % y LEc-V, 29.5 %. La menor biodisponibilidad en los lactosueros se mostró en LEs con un 19.6 %. En la *Colada* la absorción reportada fue del 20.8 %. Tanto el transporte como la captación celular de Na fueron superiores en las muestras de lactosuero ecuatoriano respecto a las de lactosuero español y *Colada*, que ofrecieron resultados similares. Estas diferencias probablemente se debieron a la disparidad composicional de las muestras post-digestión, ya que es conocido que compuestos como algunos monosacáridos y aminoácidos estimulan el transporte de sodio, mediante un mecanismo acoplado a la bomba de Na+/K+ (Fordtran et al., 1968).

4.4.2.4. Biodisponibilidad del potasio

Entre las muestras el transporte de potasio a través de las células intestinales Caco-2 se llevó a cabo en proporciones parecidas y no hubo diferencias significativas entre las muestras de lactosuero, ni tampoco respecto a la *Colada*. La mayor biodisponibilidad entre los lactosueros se observó en la fracción de LEc-I con un transporte del 29.6 %, mientras que en la *Colada* la absorción fue del 28.3%.

Existe escaso conocimiento respecto a la biodisponibilidad del potasio de fuentes dietéticas (Stone et al., 2016; Pérez-Torres, 2022), por lo que, dilucidar la biodisponibilidad de este mineral permitiría conocer su rol en el bienestar humano. Normalmente, la permeabilidad para el potasio es alta en todas las células del organismo, de forma que este catión es captado fácilmente a nivel celular y únicamente una pequeña fracción del potasio ingerido queda en el espacio extracelular. De hecho, la biodisponibilidad total del K, calculada como la suma del mineral transportado y el captado por las células Caco-2, fue la más elevada de todos los minerales estudiados en el presente trabajo (Figura 22), ya que alcanzó cifras cercanas al 50 % de la cantidad presente en las cámaras apicales.

4.4.2.5. Biodisponibilidad del hierro

La anemia por deficiencia de hierro es la deficiencia nutricional más extendida en el mundo; se trata de un problema universal de salud pública que afecta en distinto grado a todos los países, especialmente aquellos en vías de desarrollo, y su prevalencia es más elevada entre la población infantil y en mujeres en edad fértil (Rincón-Pabón et al., 2019). La deficiencia de hierro suele ocurrir, más que por una ingesta inadecuada, por una absorción deficiente, ya que la biodisponibilidad del hierro es tremendamente sensible a diversos factores dietéticos por los que puede verse inhibida (Mesías et al., 2013). Por estos motivos, resulta de gran importancia el estudio de la biodisponibilidad del hierro en productos alimentarios y el análisis de las causas por las que pudiera verse afectada.

El transporte promedio de hierro entre las muestras de lactosuero se reportó en 9 %, LEc-I alcanzó la mayor absorción, seguido de LEs y LEc-V. La *Colada* por su parte mostró la menor absorción de este mineral con un 5.57 %, reducción que se atribuye al efecto negativo de los componentes de la fórmula, capaces de formar quelatos con el mineral que, aun siendo solubles, son difícilmente absorbidos por las células intestinales. Las proteínas del lactosuero hidrolizadas, sin embargo, forman complejos con hierro que favorecen su solubilidad intestinal y su absorción en las células Caco-2 comparando con las sales de hierro (Shilpashree et al., 2020), lo cual explicaría los mayores valores de biodisponibilidad férrica obtenidos en las muestras de lactosuero. En este sentido, Vegarud et al., (2000) reportaron que la biodisponibilidad del hierro del lactosuero es producto de la lactoferrina, la proteína sérica de unión al hierro más importante, en la que al parecer los cambios sufridos durante la hidrólisis promueven la formación de pequeños péptidos, que juegan un rol protagónico en la unión y liberación del hierro, disminuyendo el hierro libre y favoreciendo su biodisponibilidad, aspecto que ha sido estudiado en ensayos in vivo realizados en ratas (Lin et al., 2016). Otros autores han mostrado que los hidrolizados de α-LA y β-LG, proteínas mayoritarias del lactosuero, forman complejos solubles con el Fe que promueven su absorción en células Caco-2 y aumentan su almacenamiento en forma de ferritina, siendo el efecto más notable en el caso de β-LG (Wang et al., 2014).

Existe escasa información sobre la biodisponibilidad de minerales en células Caco-2 a partir del lactosuero, aunque se ha reportado como producto de la interacción de minerales con péptidos y proteínas de otras matrices alimentarias. Por ejemplo, Walters et al., (2018) mostraron que los grupos funcionales de los polipéptidos tienen capacidad queladora de metales divalentes

demostrado en resultados espectroscópicos. Además, estudios previos con células Caco-2 mostraron como el dipéptido PY obtenido de *Schizochytrium sp* potencia tres veces la absorción de calcio, inhibiendo además la acción de los inhibidores oxalato, fitato y ácido tánico (Cai et al., 2016). Por su parte el péptido GPAGPHGPPG del abadejo de Alaska mostró mayor absorción del hierro en un 28 % y en el calcio en un 113% (Chen et al., 2017); así mismo, el péptido DKLPGFGDS (PO 4) IEAQ de la clara de huevo permitió el doble de absorción del hierro estimulando además la síntesis de ferritina (Palika et al., 2015); entre tanto el péptido DHTKE potenció en más de siete veces la absorción de calcio en las monocapas de las células Caco-2, Sun et al., (2017), y, el péptido SVNVPLY de la cebada aumentó cuatro veces la absorción de hierro al igual que la síntesis de ferritina en células Caco-2 (Eckert et al., 2016).

Por tanto, algunos autores han demostrado la biodisponibilidad de minerales obtenidos de proteínas y péptidos de diverso origen (Chen et al., 2014; Hou et al., 2017; Lin et al., 2016; Perego et al., 2013), sin embargo, es escasa la información de la biodisponibilidad mineral del lactosuero y sus subproductos, que permita demostrar con más evidencia científica el potencial quelante de los péptidos liberados del lactosuero. En este sentido hace falta aún más investigación que permita conocer, tanto *in vitro* como in vivo la biodisponibilidad mineral real de este coproducto de la industria quesera.

4.5. Perfil de aminoácidos

Como se ha mencionado anteriormente, la composición de aminoácidos del lactosuero depende entre otros factores de la alimentación del ganado, la época de recolección y la etapa de lactancia, variables que influyen en la relación β-lactoglobulina/α-lactoalbúmina (Rako et al., 2018). El lactosuero ha sido reconocido como una excelente fuente de varios aminoácidos esenciales, lo que lo convierte en un componente valioso en la nutrición. Específicamente, se ha identificado que el lactosuero es rico en leucina, valina e isoleucina (Cintineo et al., 2018; Goulart et al., 2014), aminoácidos de cadena ramificada (BCAA, por sus siglas en inglés) que desempeñan un papel crucial en la síntesis de proteínas musculares y son fundamentales para el crecimiento y la reparación del tejido muscular (Magan et al., 2019; Smithers, 2008). Además de los BCAA, el lactosuero también contiene triptófano, otro aminoácido esencial , que actúa estimulando los genes de factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I) (Melnik et al., 2013; Thissen et al., 1994). En este sentido las muestras objeto de nuestro estudio, LEc-I, LEc-V, LEs y *Colada* mostraron el

mismo perfil de aminoácidos con altas concentraciones en aa esenciales a excepción de metionina e histidina (el triptófano no se determinó) como se expone en la Tabla 26.

Tabla 26. *Perfil de aminoácidos (mg/g muestra fresca)*

aa	LEc-V	LEc-I	LEs	Colada
Alanina	145 ± 0.15 ab	184 ± 8.42 b	168 ± 5.68 b	103 ± 3.63 a
Arginina	257 ± 2.8 ab	319 ± 3.74 b	292 ± 16.21 b	177 ± 10.36 a
Aspártico	93.1 ± 0.59 ab	125 ± 9.64 b	112 ± 1.78 ab	70.7 ± 2.49 a
Cisteína	124 ± 5.32 b	161 ± 4.09 b	126 ± 4.9 b	62.1 ± 5.4 a
Glutámico	222 ± 4.54 ab	283 ± 16.22 b	273 ± 1.35 b	142 ± 5.21 a
Glicina	77.5 ± 2.71 ab	103 ± 7.48 b	91.9 ± 2.98 ab	54.1 ± 2.5 a
Histidina	86.1 ± 2.13 ab	114 ± 0.21 b	101 ± 4.83 b	56.9 ± 3.36 a
Isoleucina	133 ± 2.04 ab	172 ± 1.87 b	151 ± 10.21 b	93.0 ± 4.06 a
Leucina	232 ± 4.63 ab	289 ± 9.35 b	254 ± 11.85 b	163 ± 4.01 a
Lisina	344 ± 8.47 b	420 ± 4.92 b	362 ± 13.82 b	209 ± 3.46 a
Metionina	54.3 ± 0.41 b	56.8 ± 1.9 b	60.7 ± 2.81b	31.1 ± 2.33 a
Fenilalanina	163 ± 11.3 b	209 ± 3.19 a	195 ± 8.16 a	140 ± 3.15 a
Prolina	47.1 ± 10.6 a	64.4 ± 1.64 a	53.6 ± 2.75 a	39.3 ± 0.62 a
Serina	226 ± 4.11 b	280 ± 8.46 b	247 ± 8.99 b	131 ± 11.36 a
Treonina	139 ± 1.74 b	188 ± 1.22 c	159 ± 6.52 ab	97.7 ± 3.56 a
Tirosina	141 ± 2.49 a	239 ± 18.11 a	205 ± 7.12 ab	148 ± 3.4 ab
Valina	213 ± 2.13 b	263 ± 5.25 b	215 ± 9.92 b	130 ± 4.84 a

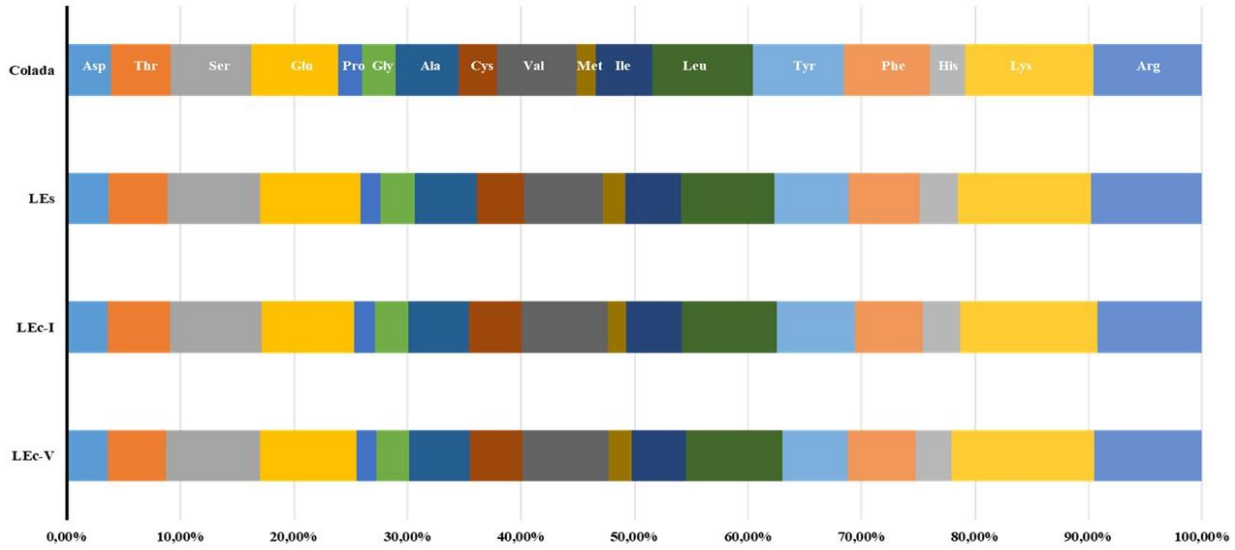
LEc-I, lactosuero ecuatoriano de invierno; LEc-V, lactosuero ecuatoriano de verano; LEs, lactosuero español. Los valores son la media ± SE (n=2). Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas en la prueba bilateral de igualdad para medias de columna. Las pruebas se ajustan para todas las comparaciones por parejas dentro de una fila de cada subtabla más interna utilizando la corrección HSD Tuckey. La cisteína se mide como ácido cisteico y la metionina como metilsulfona. La medida de aspártico incluye ácido aspártico y asparragina. La medida de Glutámico incluye ácido glutámico y glutamina. No se determinó triptófano debido a su degradación tras la hidrólisis ácida.

Los aa esenciales lisina, leucina y valina mostraron los valores más altos en todas las muestras con variabilidad en la concentración entre países, en este sentido LEc-I fue el lactosuero con mayor concentración de aminoácidos esenciales a excepción de metionina donde se ubicó ligeramente por

debajo de LEs, mientras que en lisina superó en un 18 % a LEc-V y en un 13 % a LEs, porcentajes similares se observaron para la leucina donde LEc-I superó en un 20 % a LEc-V y en un 12 % a LEs. La metionina y la histidina fueron los aminoácidos esenciales limitantes en todas las muestras, al respecto se ha informado que la histidina es un aminoácido limitante en la leche de vaca (Pineda, 2019), al igual que la metionina, considerado el primer aminoácido limitante en la leche (Gu et al., 2021; Maikanov & Auteleyeva, 2016; Vargas Villalobos et al., 2017), por lo que, tendrá el mismo efecto en el lactosuero. En cuanto a la *Colada*, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de aminoácidos $p< ,05$ con respecto a LEc-V, LEc-I y LEs, la que pudo generarse entre otros factores por la mezcla de ingredientes incorporados en la formulación, que pudieron interactuar con las proteínas, como los polifenoles presentes en el maracuyá, dando lugar a la formación de complejos proteína-polifenoles mediante enlaces no covalentes (He et al., 2015; Martínez- Valverde et al., 2000).

El perfil de aa analizado después de la digestión *in vitro* mostró pocas diferencias en los procentajes relativos de aminoácidos de las muestras, de hecho, los perfiles de los tres lactosueros fueron casi idénticos (Figura 23). La diferencia más significativa que observamos es en la *Colada* con porcentajes menores de Ser, Cys y Glu y mayores de Tyr, Phe y Pro. La Lys fue el aminoácido más abundante, seguido de Arg, Leu y Glu.

Figura 23. *Perfil de aminoácidos en la fracción soluble (% de cada aa respecto al total)*



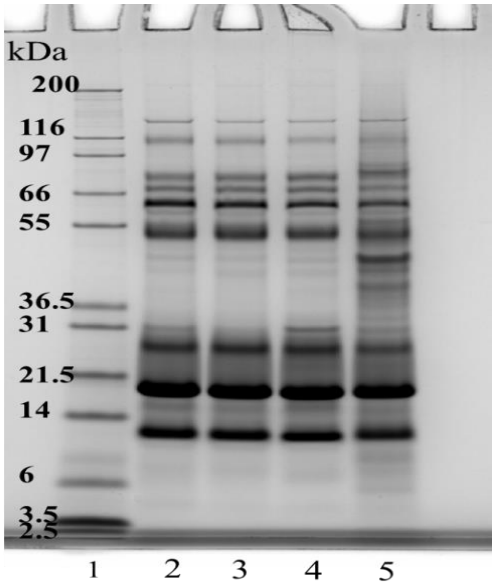
Los valores son la media ± SE (n=2).

4.6. Proteólisis y liberación de péptidos durante la digestión *in vitro*

La importancia de la digestión de las proteínas en el cuerpo es incuestionable, no solo desde una perspectiva nutricional, sino también debido al impacto que los péptidos liberados pueden tener en la salud. Estos péptidos pueden desencadenar tanto respuestas adversas, como algunas formas de reacciones alérgicas, como también pueden actuar de manera beneficiosa para el organismo. Con el fin de estudiar la hidrólisis proteica durante el proceso de digestión se analizó el perfil de proteínas al final de cada una de las fases de la digestión por SDS-PAGE y además se determinó el grado de hidrólisis siguiendo la metodología OPA (descrita en materiales y métodos).

El perfil proteico inicial, examinado por SDS-PAGE es idéntico para todos los lactosueros (Figura 24). En el caso de la *Colada*, a pesar de que las bandas más intensas corresponden a las proteínas mayoritarias en el suero, β-lactoglobulina y α-lactoalbúmina, también se observan bandas correspondientes a proteínas procedentes de los otros componentes de la matriz como cebada y maracuyá.

Figura 24. *Perfil proteico de las muestras después de la fase oral SDS-PAGE (4-12%)*

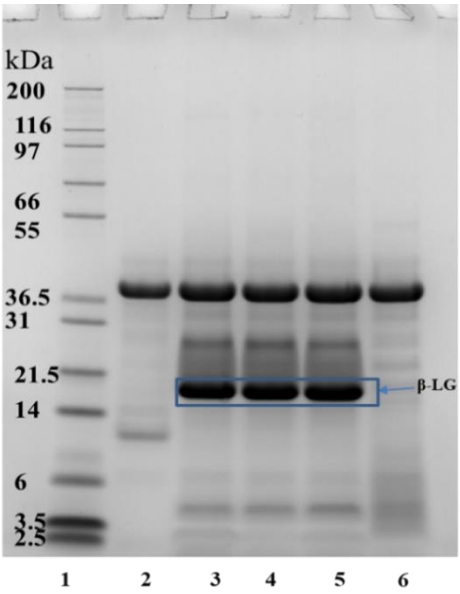


Carril 1: marcadores moleculares; Carril 2: LEc-V; Carril 3: LEc-I; Carril 4: LEs; Carril 5: *Colada*. Las bandas de proteínas significativas se indican de la siguiente manera: BSA: albúmina sérica (66 kDa); β-LG: β-lactoglobulina (18,3 kDa); α-LA: α-lactoalbúmina (14,2 kDa).

El perfil que se encontró tras la fase oral fue exactamente igual que el inicial puesto que en esta etapa no hay degradación de proteínas, hecho que ha sido descrito antes por Sabari et al., (2018); aunque sí que podría existir modificaciones en la estructura del alimento que afectaran a su posterior digestión (Figura 24).

Tal y como se observa en la Figura 25, la proteólisis comienza en la fase gástrica por la acción de la pepsina, que aparece como una banda de gran intensidad con un peso molecular aparente alrededor de 37 KDa. La mayoría de las proteínas de un peso molecular superior a 31 KDa se digirieron completamente después de 2 horas de digestión con pepsina. En esta fase, se observan dos bandas principales con un peso molecular aparente de alrededor de 21 y 14 KDa, correspondientes a β-lactoglobulina y α-lactoalbúmina. Estas proteínas han sido descritas como resistentes a la acción de la pepsina (Dönmez et al., 2020 ; Dupont et al., 2010 ; Halabi et al., 2022; Mandalari et al., 2009 ; Sanchón et al., 2018). La estructura globular de ambas impide el acceso de enzimas a posibles sitios de escisión (Halabi et al., 2020). Así por ejemplo Picariello et al. (2010) demostraron la alta resistencia del fragmento de β-lactoglobulina f125 –135 a la proteolisis.

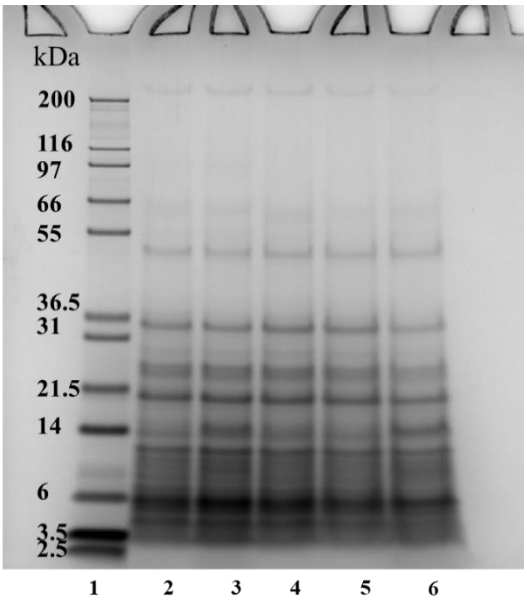
Figura 25. *Perfil proteico de las muestras después de la fase gástrica (SDS-PAGE (4-12%)***.**



Carril 1: marcadores moleculares; Carril 2: Control (digestión sin muestra); Carril 3: LEc-V; Carril 4: LEc-I; Carril 5: LEs; Carril 6: *Colada*. Las bandas de proteínas significativas se indican de la siguiente manera: β-LG: β-lactoglobulina (18,3 kDa).

Tras la digestión completa (fase intestinal) por acción de la pancreatina no somos capaces de observar diferencias en el perfil de proteínas en los geles de SDS-PAGE. Esto se debe al ruido de fondo de las proteínas presentes en la mezcla de enzimas digestivas (Figura 26). En esta fase la mayoría de las proteínas han sido digeridas en péptidos de bajo peso molecular imposible de visualizar en los geles bien por su pequeño tamaño o bien porque no se fijen al gel y no seamos capaces de verlos. Lo que si podemos afirmar es que las proteínas que no se digerían en la fase gástrica fueron digeridas en la fase intestinal.

Figura 26. *Perfil proteico de las muestras después de la fase intestinal (digestión completa) (SDS-PAGE (4-12%)*

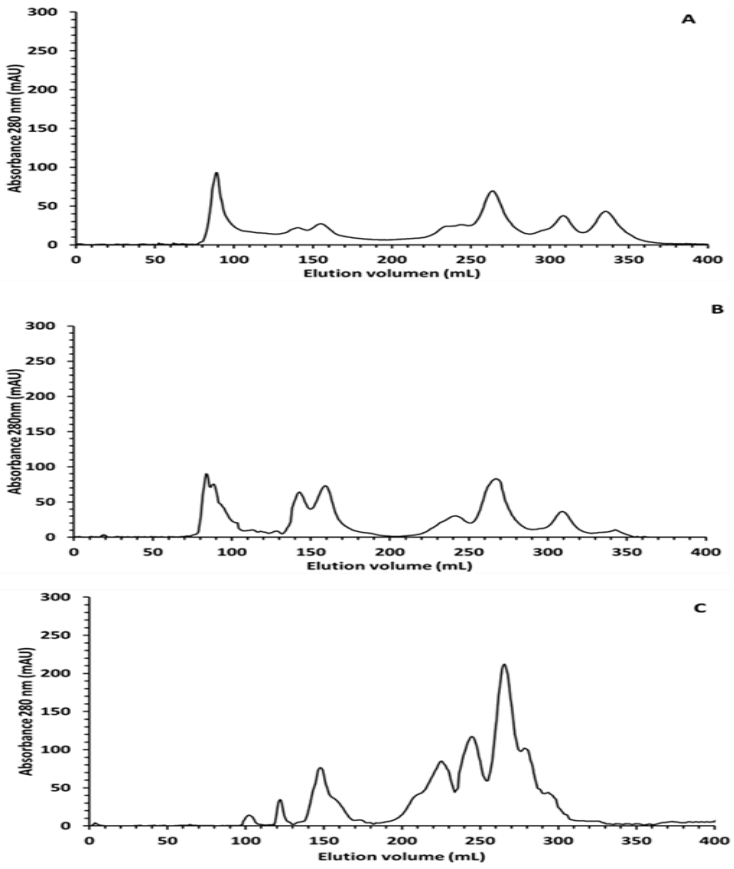


Carril 1: marcadores moleculares; Carril 2: Control (digestión sin muestra); Carril 3: LEc-V; Carril 4: LEc-I; Carril 5: LEs; Carril 6: *Colada*.

Con el fin de comprobar si podíamos observar el perfil de péptidos tras el proceso de digestión completo se llevaron a cabo análisis de la fracción bioaccesible mediante cromatografía molecular de exclusión (SEC) (Figura 27). Los cromatogramas SEC brindan información valiosa sobre distribuciones de tamaño de proteínas, péptidos grandes y productos de degradación de proteínas más pequeños. Para eliminar el ruido de fondo provocado por las enzimas presentes se sustrajo el perfil de la muestra control, compuesta únicamente por las enzimas digestivas, del cromatograma de la muestra completamente digerida. Dado el interés desde el punto de vista nutricional de la

Colada y puesto que en el caso de los lactosueros no se observaron diferencias reseñables, en este manuscrito solamente se muestran los resultados obtenidos a partir de la *Colada* (Figura 27). El perfil SEC de la *Colada* indicó que la principal diferencia en la fase oral (Figura 27, parte A) en comparación con la fase gástrica (Figura 27, parte B) estaba en el rango de 40 a 13 KDa (130 a 180 ml de volumen de elución). Los dos picos principales observados a 145 ml y 165 ml en la fase gástrica (Figura 27, parte B) probablemente correspondieron a las proteínas β-lactoglobulina y α-lactoalbúmina que aún estaban sin digerir, como se había observado en SDS-PAGE (Figura 25). De la misma forma se observa que, aunque el proceso de digestión comienza en la fase gástrica, la gran mayoría de las proteínas se digirieron en la fase intestinal (Figura 27, parte C). Tras la acción de las enzimas pancreáticas hubo un gran aumento en la intensidad en los picos correspondientes a péptidos ≤6 KDa (240 mL de volumen de elución) y todas las proteínas con un peso molecular aparente ≥40 KDa fueron hidrolizadas en péptidos/AA libres más pequeños.

Figura 27. *Perfil de proteínas y péptidos analizado por cromatografía de exclusión molecular(SEC).*



A) Fase oral, B) Fase gástrica, C) Fase intestinal (digestión completa)

Para profundizar en cómo ocurre el proceso de proteólisis durante la digestión *in vitro* se calculó el grado de hidrólisis por la metodología OPA descrito anteriormente en material y métodos (Tabla 27). Coincidiendo con las observaciones previas se observa como la proteólisis de los lactosueros comienza con la acción de la pepsina durante la fase gástrica, resultado descrito anteriormente por otros autores (Abrahamse et al., 2022; Chauvet et al., 2023). Sin embargo, es importante destacar que el grado de hidrólisis observado es relativamente bajo especialmente en el caso de los lactosueros, oscilando entre 2-6 %, siendo algo superior en el caso de la *Colada* (14 %). Este resultado se corresponde con el hecho de que las proteínas mayoritarias de los lactosueros (β-lactoglobulina y α-lactoalbúmina) son resistentes a la acción de la pepsina tal y como se ha mencionado anteriormente.

Tabla 27. *HD durante la fase gástrica e intestinal*

	% HD Fase gástrica	% HD Digestión completa
LEc-V	2	54
LEc-I	5	26
LEs	6	44
COLADA	14	58

LEc-I, lactosuero ecuatoriano de invierno; LEc-V, lactosuero ecuatoriano de verano; LEs, lactosuero español.

Tras el proceso de digestión completa (fase oral, gástrica e intestinal) el grado de hidrólisis de las proteínas (% HD) aumentó llegando hasta el 58 % en el caso de la *Colada*, superando notablemente a LEc-I y a LEs. Esta diferencia pudo deberse entre otras cosas a las condiciones de pH y temperatura a la que fue sometida la bebida durante su proceso de elaboración, los que, pudieron potenciar su hidrólisis; al respecto se ha informado que la desnaturalización por calor favorece la hidrólisis de las proteínas del lactosuero (Leeb et al., 2015). Por otro lado, la estacionalidad pudo afectar la composición de LEc-V favoreciendo la hidrólisis tanto de este como de la *Colada* que se formuló a partir de este lactosuero. Así podemos afirmar que tras la fase intestinal fueron digeridas la mayor cantidad de proteínas; tal como lo describió Ozorio et al., (2020). Sin embargo, nuestros resultados superan los % de HD descritos por Zhang et al., (2020), quienes mostaron un HD del 18 % en muestras de WPC hidrolizado durante tres horas con papaína

y del 14 % con alcalasa; valores que se potenciaron tras pretratar el WPC con ultrasonido-líquido iónico al 18,52 % y 23,67 %. Pero debemos tener en cuenta que estos estudios se realizaron con aislados de proteínas y en condiciones lejanas a lo que ocurre *in vivo* (Ozorio, et al., 2020).

4.7. Identificación de péptidos liberados después de la digestión *in vitro*

Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos encriptados inactivos en la proteína nativa que podrían liberarse a través de diferentes procesos, incluida la digestión gastrointestinal (Akbarian et al., 2022; Hernández-Ledesma et al., 2014). Estos péptidos pueden afectar de forma positiva en la salud humana, efecto que estará en correspondencia con la secuencia aminoacídica del fragmento, por lo que, se han descrito entre otras actividades biológicas péptidos con actividad antihipertensiva, antidiabética, osteoanabólica, anticancerígena, antitrombótica y antioxidante (Akbarian et al., 2022; Alvarado Carrasco & Guerra, 2010; Madureira et al., 2007, 2010; Martínez & Martínez, 2006). Durante los últimos años se han destinado varios estudios a evaluar la función biológica específica de los péptidos del lactosuero acorde a su secuencia de aminoácidos (Ashraf et al., 2021; Baba et al., 2021; Corrochano, Buckin, et al., 2018; Corrochano et al., 2019; Fang & Guo, 2019; Jacquot et al., 2010; Kitts & Weiler, 2003; Martin et al., 2018; Nongonierma et al., 2016; Nongonierma & FitzGerald, 2013; Olvera-Rosales et al., 2022; Oyama et al., 2017; Pandey et al., 2018; Xu et al., 2020; Xu et al., 2022; Xu et al., 2020; Zhao et al., 2016; Zhao et al., 2014; Zhao et al., 2018, 2019, 2021; Zong et al., 2019). Es importante destacar que la forma activa del péptido a veces se libera sólo después de la digestión y por ello se evaluaron las secuencias de los péptidos presentes en la fracción bioaccesible tras la digestión *in vitro* de nuestras muestras.

Los péptidos liberados fueron analizados por NanoLC-MS/MS (material y métodos 3.2.10). Se identificaron un total de 506 péptidos entre las muestras de lactosuero y *Colada*, con longitudes de entre 5 a 25 aminoácidos. La metodología empleada no permitió la identificación de secuencias de péptidos más pequeños, muy probablemente presente en los extractos. Se observaron diferencias en cuanto al número de péptidos identificados por lo que, en LEc-V se identificaron 157, en LEc-I 164, en LEs 138 y en la *Colada* 47, este hecho era de esperarse por la naturaleza de las muestras; al respecto Li et al., (2019) reportaron que la época del año impacta significativamente en la composición de la leche, lo que daría respuesta a las diferencias en el contenido de péptidos identificados entre las muestras de lactosuero de Ecuador. Además de la estacionalidad, las diferencias entre países podrían atribuirse a otros factores como la ubicación geográfica, la raza y

la alimentación del ganado. Estos elementos también contribuyen a la variabilidad en la composición de la leche que afectaría al proceso de digestión (Grandison et al., 1984; Grimley et al., 2009; Larsen et al., 2010; Maurmayr et al., 2018; Priyashantha et al., 2021). La mayoría de los péptidos identificados procedían como era de esperar de las proteínas mayoritarias α-LA y β-LG aunque también se identificaron muchos péptidos procedentes de caseínas (αS1-caseína, αS2-caseína, β-caseína y κ-caseína), proteína que normalmente no está presente en el suero dulce, lo que sugiere la fuga de caseína al lactosuero durante el proceso de elaboración del queso, hecho que se ha descrito anteriormente (Corrochano et al., 2018).

Respecto a la *Colada,* bebida elaborada con LEc-V los péptidos liberados después de la digestión no solo se originaron a partir de las proteínas del lactosuero, sino también de la cebada (*Hordeum Vulgare L.*) utilizada en la formulación. En esta muestra se identificaron un menor número de secuencias, esto pudo deberse a varios factores, por un lado, el mayor grado de hidrólisis daría lugar a un mayor número de péptidos de pequeño tamaño que no somos capaces de identificar y por otro lado a la interacción de las proteínas de la cebada y del lactosuero, fenómeno complejo que involucra múltiples factores bioquímicos y nutricionales. La cebada contiene diversas proteínas, como las hordeínas que pudieron interactuar con las proteínas del lactosuero α-LA y β-LG dando lugar a la formación de complejos proteicos estables o induciendo cambios conformacionales (Houde et al., 2018), esto explicaría la modificación de los péptidos de **α-LA** identificados en LEc-V EWVCTTFHTSGYDTQAIVQ y HTSGYDTQAIVQNNDSTEYGLFQIN, que en la *Colada* aparecen deplazados en la secuencia de origen CTTFHTSGYDTQAIVQNNDS y TTFHTSGYDTQAIVQNNDSTEYG. Los cambios en las condiciones de pH y temperatura durante la elaboración de la *Colada* también pudieron ser los responsables de estas interacciones. Además, como se ha indicado anteriormente, los componentes añadidos al lactosuero durante la formulación de la *Colada* (cebada y maracuyá) ricos en antioxidantes (carotenoides y polifenoles) pudieron haber afectado la digestibilidad de las proteínas por la interacción de las proteínas lácteas con los polifenoles, formando complejos proteína-polifenoles mediante enlaces no-covalentes (He et al., 2015; Martínez- Valverde et al., 2000). Los péptidos más largos se obtuvieron de α-lactoalbúmina (α-LA) y de la β-lactoglobulina (β-LG), proteínas menos digeribles del suero de leche.

Las secuencias de los péptidos identificados se analizaron a través de la base de datos de péptidos bioactivos de la leche (MBPDB), en línea https://mbpdb.nws.oregonstate.edu/about_us/,

actualizada al 1 de agosto de 2023; esta base contempla todos los péptidos bioactivos conocidos de las proteínas de la leche (Nielsen et al., 2017). El acceso se realizó entre el 1 y el 30 de noviembre de 2023. De forma paralela las secuencias fueron analizadas en BIOPEP-UWM, base de datos de secuencias de péptidos biológicamente activos, disponible en línea https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/, que nos indicaría la posibilidad de que un determinado péptido fuera bioactivo aunque aun no hubiera sido descrito como tal. El acceso se realizó durante el mismo periodo, fecha en la cual BIOPEP reportó un total de 4746 péptidos bioactivos (Minkiewicz et al., 2019) (Tablas suplementarias S1, S2, S3, S4). Según el análisis de las secuencias se encontraron entre otros, péptidos con posible actividad inhibitoria de la ACE, de la enzima dipeptidil peptidasa IV, antibacterianos, opioides, queladores de minerales, osteoanabólicos, anticancerígenos, inmunomoduladores, hipocolesterolémicos y antioxidantes, actividades que se resumen en la Tabla 28. Los péptidos identificados en LEc-I, LEc-V, LEs y *Colada* se muestran en las Tablas 29,30,31 y 32, respectivamente.

Tabla 28. *Actividad biológica de los péptidos identificados (MBPDB)**

	LEc-I					LEc-V					LEs					*Colada*				
Origen	α-LA	β-LG	α-Ca	β-Ca	κ-Ca	α-LA	β-LG	α-Ca	β-Ca	κ-Ca	α-LA	β-LG	α-Ca	β-Ca	κ-Ca	α-LA	β-LG	α-Ca	β-Ca	κ-Ca
Ansiolítica				8			1		8					7					7	
Anticancerígena				8					12					8			1		8	
Antienvejecimiento				3					1					1						
Antiinflamatoria				11					13					10					4	
Antimicrobiana	3	9	11	11	9		12	8	13	7		7	3	7	6		9		3	
Antioxidante	4		7	23	13	6	4	5	19	5	8	3	5	14	7	7	5		12	
Antitrombótica				1	2				1	2					1					
Cicatrizante				2																
Citomodulador				1					1											
Hipocolesterolémica		1					2					3					5			
Inhibidor de Ace	3	8	12	36	3	2	12	9	34	3	1	13	3	33	1	2	11		20	4
Inhibidor de bacteriocinas			1										1							
Inhibidor de la catepsina B				8					12					7					6	
Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	3	10		19		3	10		26		1	10		16			9		12	4
Inhibidor de la prolil endopeptidasa				8					9					6					5	
Inhibidor de la solubilidad del colesterol			1	6				1	3				1	3					1	
Inmunomoduladora	2	2		10			3	1	14			5	1	8			7		6	
Mejorador de la resistencia a la insulina					1										1					
Opioide				9					14	1				8					7	
Osteoanabólica				2					1					1						
Potenciador de la bradicina				2					7					5					2	
Potenciador de la expresión de MUC4				2					6										1	
Potenciador de la motilidad intestinal				7					8					5					3	
Potenciador de la secreción de moco yeyunal				7					8					4					3	

Potenciador del aprendizaje y la memoria		7		7		5		4
Precursor del crecimiento microbiano	4		7		3	1		
Promotor de la absorción del calcio	3	2	1		1	1		
Promotor de saciedad		7		8		4		6
Promotor del crecimiento de neuritas		7		8		6		5
Reductor del nivel de MDA en el páncreas		7		8		4		6
Restaurador de la homeostasis intestinal		1						

*La actividad biológica que se resume corresponde al resultado de los datos analizados en la base de datos de péptidos de la leche (MBPDB)

Se identificaron varios péptidos procedentes de **α-LA** que compartieron la misma secuencia entre muestras (Tablas 29, 30, 31 y 32), entre estos estan los péptidos DDDLTDDI, DDDLTDDIM, LDDDLTDD, LDDDLTDDIM, los que son fragmentos de los péptidos DKFLDDDLTDDIM y KFLDDDLTDDIM identificados como péptidos con actividad antioxidante por Báez et al., (2021). Otras secuencias identificadas como fragmentos de la κ-caseína en todas las muestras fueron VIESPPEI, VIESPPEIN, VIESPPEINT y ESPPEINT, las que hasta la fecha de la consulta no habían sido reportadas en la base de datos de (MBPDB) y que tienen en su secuencia fragmentos con posible actividad biológica según BIOPEP. Los péptidos identificados en BIOPEP fueron: VIESPPEIN fragmento (1-9), quelador de calcio, IE fragmento (2-3) y PPEIN fragmento (5-9) inhibidores de ACE, EI fragmento (7-8), SP fragmento (4-5) y PP fragmento (5-6) inhibidores de la enzima dipeptidil peptidasa IV.

El péptido LSFNPTQ procedente de la **β-LG** se ha descrito como inhibidor de ACE por Lacroix et al., (2016); otros péptidos identificados también, como ALKALPMH, DAQSAPLR, LAMAAS, LDIQKV, LSFNPTQL, MHIRL, SFNPTQLEEQ, TMKGLDIQKV e YSLAMAA contienen en su secuencia péptidos inhibidores de ACE como los péptidos GLDIQK, LDIQK ALPMHIR, ALPMHIR, ALPMH, ALPM, LKALPMH, PMHIR, LSFNPTQ, LAMA, WYSLAM, WYSLA, WYSLAMA (Hernández-Ledesma et al., 2006, 2007; Lacroix et al., 2016; Maes et al., 2004; Mullally et al., 1997; Murakami et al., 2004; Pihlanto-Leppälä et al., 1998, 2000).

Como era de esperarse, se identificaron también un número considerable de péptidos que mostraron similitud con fragmentos de péptidos con actividad inhibitoria de la enzima dipeptidil peptidasa IV, reportada anteriormente, Tablas 29,30,31 y 32. Los péptidos identificados ALKALPMH, DLEIL, EGDLE, EGDLEIL, ELKPTPE, EVDDE, EVDDEALE, LDIQKV, LVLDTDYK, PEGDLE, PEVDDE, PEVDDEA, TPEVD, TPEVDDE, TPEVDDEA, VEELKPTPE contienen en su secuencia fragmentos de péptidos descritos con esta actividad como los péptidos LKPTPEGDLEIL, LKPTPEGDLE, LKPTPEGDL reportados por Lacroix & Li-Chan, (2014), y, TPEVDDEALEK, LKPTPEGDLEIL, LKPTPEGDLE, LKPTPEGDLEIL (Lacroix & Li-Chan, 2014; Power et al., 2014; Silveira et al., 2013).

Tabla 29. *Péptidos identificados LEc-I (MBPDB)*

Origen	Secuencia identificada	Péptido reportado (MBPDB)	Actividad biológica	Referencia
α-LA	DDDLTDDI, LDDDLTDDI, DDDLTDDIM, LDDDLTDDIM	DKFLDDDLTDDIM	Antioxidante	(Báez et al., 2021)
		KFLDDDLTDDIM	Antioxidante	(Báez et al., 2021)
	GGVSLP	VSLPEW	Inhibidor de ACE	(Otte et al., 2007)
		GVSLPEW	Inhibidor de ACE	(Otte et al., 2007)
		KGYGGVSL	Inhibidor de ACE	(Tavares et al., 2011; Tavares & Xavier Malcata, 2012)
		YGGVSLPEW	Inhibidor de ACE	(Otte et al., 2007)
		GYGGVSLPEW	Inhibidor de ACE	(Lacroix et al., 2016)
		LKGYGGVSLPE	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix et al., 2016)
		KGYGGVSLPEW	Inhibidor de ACE	(Tavares et al., 2011; Tavares & Xavier Malcata, 2012)
		LKGYGGVSLPEW		
	ILDKVG	DKVGINY	Inhibidor de ACE	(Tavares et al., 2011; Tavares & Xavier Malcata, 2012)
		ILDKVGINY	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix & Li-Chan, 2014; (Nongonierma et al., 2018)
		DKVGINYW	Inhibidor de ACE	(Tavares et al., 2011; Tavares & Xavier Malcata, 2012; Tavares et al., 2012)

β-LG	TPEVD, EGDLE, PEGDLE, TPEVD, PEVDDE, PEVDDEA, TPEVDDE, TPEVDDEA, EVDDE, EVDDEALE	LKPTPEGDL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix & Li-Chan, 2014; Lacroix et al., 2017)
		LKPTPEGDLE	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix & Li-Chan, 2014)
		TPEVDDEALEK	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV, Antimicrobiano	(Silveira et al., 2013; Power et al., 2014; Demers-Mathieu et al., 2013)
		LKPTPEGDLEIL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix & Li-Chan, 2014)
	QSAPL	LDAQSAPLR	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 2000)
		DAQSAPLRVY	Inhibidor de ACE	(Tavares et al., 2011; Tavares & Xavier Malcata, 2012)
	DALNE, IDALN, IDALNE	IDALNENK	Inmunomodulador	(Jacquot et al., 2010)
			Antimicrobiano	(Demers-Mathieu et al., 2013; Sedaghati et al., 2015)
	ENSAEP	CMENSA	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 2000)
	LDIQKV	LDIQK	Inhibidor de ACE	(Hernández-Ledesma et al., 2006)
		GLDIQK	Hipocolesterolémico, inhibidor de ACE	(Nagaoka et al., 2001; Pihlanto-Leppälä et al., 1998)
		IQKVAGTW	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV, inhibidor de ACE	(Lacroix et al., 2016)
		GLDIQKVAGT	Antimicrobiano	(Ali & LaPointe, 2022)

α- Caseína	DISLLD	AASDISLLDAQSAPLR	Antimicrobiano	(Pellegrini et al., 2001)
	YKKYLLFCM	VLVLDTDYKKYLLF	Inmunomodulador	(Jacquot et al., 2010)
	QSLAC, SLACQ	WYSLA	Inhibidor de ACE	(Hernández-Ledesma et al., 2007)
		WYSLAM	Inhibidor de ACE	(Hernández-Ledesma et al., 2007)
	SFNPT, LSFNPT, FNPTQL, LSFNPTQL	LSFNPTQ	Inhibidor de ACE	(Lacroix et al., 2016)
	FFVAP	FFVAP	Inhibidor de ACE	(Maruyama et al., 1985; Adams et al., 2020)
	VAPFP	VAPFPE	Inhibidor de la solubilidad del colesterol	(Jiang et al., 2020)
		FVAPFPEVFG	Inhibidor de ACE	(Robert et al., 2004)
	LNENL	VLNENLLR	Antimicrobiano	(Hayes et al., 2006; Kent et al., 2012; Norberg et al., 2012)
	QKALNE	LAHKAL	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 1998)
		QKALNEINQF	Antimicrobiano	(Sistla, 2013)
	GKEKVNE	RFFVAPPFPEVFGKEKVNEL	Inducctor de bacteriocina	(Georgalaki et al., 2010)
	YQLDAYPS	YQLD	Antioxidante	(Zhao et al., 2021
	DIPNP, DIPNPI, SDIPNPI, DAPSFSDIPNPIGSENSEKTT	DIPNPI	Precursor del crecimiento microbiano	(Zhang et al., 2011)
		FSDIPNPIGSE	Antioxidante	(Zhao et al., 2021
		FSDIPNPIGSEN	Antioxidante	(Zhao et al., 2021
		SDIPNPIGSENSEK	Antimicrobiano	(Hayes et al., 2006)
		APSFSDIPNPIGSENSE	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)

	TEDQAMEDIKQM, ELSKDIGSESTEDQAMED, DIGSESTEDQAMEDIKQMEAES	DIGSESTEDQAMEDIK	Promotor de la absorción del calcio	(Cao et al., 2017)
	DAPSFSDIPNPIGSENSEKTT, IGSENSE, NPIGSENSEKTTMP, GTQYTDAPSFSDIPNPIGSENS, EENSKKT	IGSENSEKTTMP	Inhibidor de ACE	(Hayes et al., 2007)
		GTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW	Inhibidor de ACE	(Yamamoto et al., 1994)
	DAYPSGAWYYVPLGTQYTDAP	DÍAPSGAW	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 1998)
	QGLPQEVLN, HQGLPQ	FALPQY	Inhibidor de ACE	(Tauzin et al., 2002)
		IKHQGLPQE	Antimicrobiano	(Hayes et al., 2006; Kent et al., 2012; Norberg et al., 2012)
		IKHQGLPQEV	Antimicrobiano	(Elbarbary et al., 2012)
		KHQGLPQEVLNENLL	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
	EVVRNANEEEYSIGSSSEESA	SSSEESII	Antimicrobiano	(Bougherra et al., 2017)
	ESIISQETYKQEKNMAINPSKE	NMAINPSKENLCSTFCK	Inhibidor de ACE	(Tu et al., 2018)
	SIISQETYKQEKNMAI, INPSKENL	TYKQE	Inhibidor de ACE	(Donkor et al., 2007)
		NPSKENL	Precursor del crecimiento microbiano	(Zhang et al., 2011)
		NMAINPSK	Inhibidor de ACE	(Tauzin et al., 2002)
β-Caseína	HKEMPF	EMPFPK	Potenciador de la expresión de MUC4	(Plaisancié et al., 2015)
			Potenciador de la bradicinina	(Perpetuo et al., 2003)
			Antimicrobiano	(Sedaghati et al., 2016)

		Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 1998)
	HKEMPFPK	Antimicrobiano	(Sedaghati et al., 2016)
SEEQQQ	NI	ND	NP
PLPPT, LHLPL	LPLPL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongonierma & FitzGerald, 2014; Nongonierma & FitzGerald, 2016)
	PLPLL	Inhibidor de ACE	(Mao et al., 2007)
	LPLPLL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongonierma & FitzGerald, 2016)
		Inhibidor de ACE	(Lin et al., 2017)
	LHLPLPL	Inhibidor de ACE	(Quirós et al., 2007)
	NLHLPLPLLL	Inhibidor de ACE	(Robert et al., 2004)
	ENLHLPLPLL	Inhibidor de ACE	(Robert et al., 2004)
	HQPHQPLPPT	Inhibidor de ACE	(Adams et al., 2020)
EPVLGPV, TQTPV	QEPV	Inmunomodulador	(Jiehui et al., 2014)
	VLGP	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongonierma & FitzGerald, 2013)
		Inhibidor de ACE	(Norris et al., 2014)
	QEPVL	Inmunomodulador	(Jiehui et al., 2014)
	EPVLGPVRGP	Citomodulador	(Zhao et al., 2014)
		Inhibidor de ACE	(Lu et al., 2016)
	YQEPVLGPVR	Inmunomodulador	(Kayser & Meisel, 1996)
		Antitrombótico	(Liu et al., 2019)

	YQEPVL	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 1998; Donkor et al., 2007)
	VLGPVRGPFP	Inhibidor de ACE	(Quirós et al., 2007; Miguel et al., 2006)
	EPVLGPVRGPFP	Inhibidor de ACE	(Hayes et al., 2007)
	LYQEPVLGPVR	Antiinflamatorio	(Adams et al., 2020)
		Inhibidor de ACE	(Adams et al., 2020)
	LLYQEPVLGPVR	Inhibidor de ACE	(Liu et al., 2020)
DVENL, TDVEN	TDVEN	Inhibidor de la solubilidad del colesterol	(Jiang et al., 2020)
VPGEIVE, ELNVPGEI, LNVPGEI, EIVESL	YVEEL	Osteoanabólico	(Pandey et al., 2018)
	VPGEIVE	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongonierma & FitzGerald, 2016)
	LNVPGEIVE	Inhibidor de ACE	(Gobbetti et al., 2000)
	NVPGEIVESL	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
	ELNVPGEIVES	Antimicrobiano	(Ali & LaPointe, 2022)
FPGPIP, FPGPI, GPFPI, PFPGPI, YPFPGPI, VYPFPGPI, VYPFPGPIP, VYPFPGPIPN, LVYPFPGPI, SLVYPFPGPI, AQTQSLVYPFPG	YPFP	Opiode	(Gach et al., 2010; Meisel et al., 1989)
		Anticancerígeno	(Hatzoglou et al., 1996)
	GPFPI	Inhibidor de la catepsina B	(Lee & Lee, 2000)
	YPFPG	Promotor del crecimiento de neuritas	(Sakaguchi et al., 2003)

	Opiode	(Sienkiewicz-Szłapka et al., 2009)
	Potenciador de la motilidad intestinal	(Dalziel et al., 2014)
	Potenciador del aprendizaje y la memoria	(Sakaguchi et al., 2006)
	Inmunomodulador	(Haq et al., 2014)
	Anticancerígeno	(Hatzoglou et al., 1996)
SLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
	Opiode	(Meisel et al., 1989)
YPFPGP	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongonierma & FitzGerald, 2016)
PFPGPI	Inhibidor de la catepsina B	(Lee & Lee, 2000)
	Inmunomodulador	(Migliore-Samour & Jollès, 1988; Xu et al., 2020)
PGPIPN	Anticancerígeno	(Wang et al., 2013)
	Antiinflamatorio	(Adams et al., 2020)
	Inhibidor de ACE	(Adams et al., 2020)
PGPIPNS	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Uenishi et al., 2012)
FPGPIPN	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Uenishi et al., 2012)
	Promotor de saciedad	(Osborne et al., 2014)
YPFPGPI	Reductor del nivel de MDA en el páncreas	(Yin et al., 2012)
	Opiode	(Claustre et al., 2002; Martínez-Maqueda et al.,

		2012; Sienkiewicz-Szłapka et al., 2009; Meisel et al., 1989; Zoghbi et al., 2006)
	Potenciador de la secreción de moco yeyunal.	(Trompette et al., 2003)
	Inmunomodulador	(Haq et al., 2014; Kayser & Meisel, 1996)
	Ansiolítico	(Dubynin et al., 1998)
	Anticancerígeno	(Hatzoglou et al., 1996)
	Inhibidor de ACE	(Hernández-Ledesma et al., 2004; Amigo et al., 2020)
	Antioxidante	(Amigo et al., 2020)
LVYPFP	Inhibidor de ACE	(Gonzalez-Gonzalez et al., 2013)
VYPFPG	Inhibidor de ACE	(Abubakar et al., 1998)
VYPFPGPI	Inhibidor de la prolil endopeptidasa	(Asano et al., 1992)
VYPFPGPIP	Inhibidor de la prolil endopeptidasa	(Asano et al., 1992)
LVYPFPGP	Inhibidor de ACE	(Otte et al., 2007)
PFPGPIPN	Inhibidor de ACE	(Lin et al., 2017)
YPFPGPIP	Antioxidante	(Amigo et al., 2020)
	Inhibidor de ACE	(Amigo et al., 2020)

	VRGPFPIIV	Inhibidor de ACE	(Quirós et al., 2007; Miguel et al., 2006)
	VYPFPGPIPN	Antioxidante	(Eisele et al., 2013; Tonolo et al., 2020)
		Inhibidor de ACE	(Eisele et al., 2013)
	LVYPFPGPIP	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 2010)
		Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Uenishi et al., 2012)
	YPFPGPIPN	Inhibidor de ACE	(Saito et al., 2000; Amigo et al., 2020)
		Antioxidante	(Amigo et al., 2020)
	YPFPGPIPNS	Ansiolítico	(Takeuchi et al., 2022)
	IHPFAQTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
	KIHPFAQTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
	LVYPFPGPIPNSLPQ	Inhibidor de ACE	(Smacchi & Gobbetti, 1998)
	LVYPFPGPIPNSLPQN	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 2010)
	VYPFPGPIPNSLPQNIPP	Inhibidor de ACE	(Otte et al., 2007)
QNIPPLTQ, PNSLPQN, NIPPL, PQNIPPL	NSLP	Inhibidor de ACE	(Norris et al., 2014)
	SLPQN	Inhibidor de ACE	(Donkor et al., 2007)
	PQNIPPL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Uenishi et al., 2012)
	LPQNIPP	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Uenishi et al., 2012)

	IPPLTQT	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongonierma & FitzGerald, 2016)
	LPQNIPPLT	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongonierma & FitzGerald, 2016)
	SLPQNIPPL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Rendón-Rosales et al., 2022)
	NIPPLTQTPV	Inhibidor de ACE	(Gobbetti et al., 2000)
VKEAMAPKHKEMPF, EAMAPK	EMAPK	Antimicrobiano	(Sedaghati et al., 2016)
	EMAPKHK	Antimicrobiano	(Sedaghati et al., 2016)
	VKEAMAPK	Antioxidante, antimicrobiano	(Rival et al., 2001; Sedaghati et al., 2016)
	GVSKVKEAMAPKH	Antimicrobiano	(Ali & LaPointe, 2022)
SEEQQQTEDELQDKIHPFAQTQ, QTEDELQ	DELQDKIHPFAQTQSLVYPFPGPIPNS	Inhibidor de ACE	(Yamamoto et al., 1994)
	FQVERQQQTEDELQDK	Promotor de la absorción de calcio	(Cao et al., 2017)
	FQSEEQQQTEDELQDKIHPF		
EMPFPKYPVEPFTESQSLTL, PVQPFTESQSLTLT	GVSKVKEAMAPKHKEMPFPKYPVEPFTESQ	Cicatrizante, modulador de la barrera intestinal	(Bessette et al., 2016)
		Opioide	(Plaisancié et al., 2013)
		Restaurador de la homeostasis intestinal	(Plaisancié et al., 2013)
		Potenciador de la expresión de MUC4.	(Plaisancié et al., 2015)
	MPFPKYPVEP	Inhibidor de ACE	(Hayes et al., 2007)
	KYPVEPFTESQSLTL	Inhibidor de ACE	(Yamamoto et al., 1994)
	HKEMPFPKYPVEPFTESQ	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
TDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQ	VENLHLPLPLLL	Inhibidor de ACE	(Robert et al., 2004)
	DVENLHLPLPL	Antimicrobiano	(Ali & LaPointe, 2022)

LSLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPI	VLPVPQKAVPYPQR	Antimicrobiano	(Sedaghati et al., 2016)
	PPQSVLSLSQSKVLPVPQ	Inhibidor de ACE	(Yamamoto et al., 1994)
	SQSKVLPVPQKAVPYPQ	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
VVPPFLQPEVMGVSK, PVVVPP, PVVVPPF	VVPP	Inhibidor de ACE	(Wang et al., 2011)
	TPVVVPPFLQP	Inhibidor de ACE	(Abubakar et al., 1998)
	TQTPVVVPPFLQPE	Antioxidante	(Sabeena Farvin et al., 2010)
	LPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK	Inhibidor de ACE	(Yamamoto et al., 1994)
QSKVLPV, SQSKV, QTQSL, KVLPV, LSQSKVLP	LQSW	Inhibidor de ACE	(Maeno et al., 1996)
	KVLPVP	Inhibidor de ACE	(Liu et al., 2007; Adams et al., 2020)
	VLPVPQ	Inhibidor de la solubilidad del colesterol	(Jiang et al., 2020)
	QSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
	KVLILA	Inhibidor de ACE	(Wang et al., 2011)
	KVLPVPQ	Inhibidor de ACE, antiinflamatorio	(Maeno et al., 1996; Adams et al., 2020)
	TQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
	VLPVPQK	Antioxidante	(Sedaghati et al., 2016; Vij et al., 2016)
		Antienvejecimiento	(Kumar et al., 2019)
		Antimicrobiano	(Sedaghati et al., 2016)
		Inhibidor de ACE	(Vij et al., 2016)

			Cicatrizante	(Kumar et al., 2019)
			Osteoanabólico	(Upadhyay et al., 2020)
		SKVLPVPQ	Inhibidor de ACE	(Yamamoto et al., 1994)
		QTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
		KVLPVPQK	Antiinflamatorio, antioxidante	(Tonolo et al., 2018;Tonolo et al., 2020; Tonolo et al., 2022; Rival et al., 2001)
		SQSKVLPVPQ	Inhibidor de ACE	(Hayes et al., 2007)
		AQTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
		FAQTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
		HPFAQTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
	TEIPT	PEIT	Antimicrobiano	(López-Expósito et al., 2006)
	NYYQQ	YYQQKPVA	Antimicrobiano	(López-Expósito et al., 2006)
	NQDKTE	IPPKKNQDKTE	Mejorador de la resistencia a la insulina	(Song et al., 2017)
Kappa-Caseína	EAVESTVA	STVATL	Antimicrobiano	(López-Expósito et al., 2006)
		VESTVATL	Antimicrobiano	(López-Expósito et al., 2006)
		TEAVESTVATL	Antimicrobiano	(Elbarbary et al., 2012)
	MAIPPKK, AIPPK	MAIPPKK	Antitrombótica	(Wada & Lönnerdal, 2015)
			Inhibidor de ACE	(Miguel et al., 2007)
	NTVPAK, TVPAKSCQAQPTTMA	NTVPAKSCQAQPTTM	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)

	SPPEINTVQVTSTAV, INTVQVTS	VQVTSTAV	Antimicrobiano	(López-Expósito et al., 2006)
	EKDERFFSDKIAKYIPIQYV	KYIPIQYVLS	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
	INTIASGE, TINTIASG, TIASGEPTS, IASGEPT, KTEIPTINTIASGEPTSTPTT	DKTEIPTINTIASGEPT	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
	DSPEVIESPPEINTVQVTS	AVESTVATLEDSPEVIESPPE	Antimicrobiano	(Malkoski et al., 2001)
	RSPAQI, RSPAQIL, AAVRSPAQILQWQVLSNTVPAKS	PAAVRSPAQILQ	Antimicrobiano	(López-Expósito et al., 2006)
		AVRSPAQILQWQ	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
	ARHPHPHLSFMAIPPKKNQDKT, KSCQAQPTTMARHPHPHLSFM	ARHPHPHLSFM	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
		HPPHHLSFMAIPP	Inhibidor de ACE	(Rendón-Rosales et al., 2022)
		MAIPPKKNQDKTEIPTINT	Antimicrobiano	(Robitaille et al., 2012)

MBPDB= Base de datos de péptidos bioactivos de la leche

Tabla 30. *Péptidos identificados LEc-V (MBPDB)*

Origen	Secuencia identificada	Péptido reportado (MBPDB)	Actividad biológica	Referencia
α-LA	LDDDL, DDDLTDDI, LDDDLTDD, LDDDLTDDI, DDDLTDDIM, LDDDLTDDIM	DKFLDDDLTDDIM	Antioxidante	(Báez et al., 2021)
		KFLDDDLTDDIM		
	GGVSLP	VSLPEW	Inhibidor de ACE	(Otte et al., 2007)
		GVSLPEW	Inhibidor de ACE	(Otte et al., 2007)
		KGYGGVSL	Inhibidor de ACE	(Tavares et al., 2011; Tavares & Xavier Malcata, 2012)

β-LG		YGGVSLPEW	Inhibidor de ACE	(Otte et al., 2007)
		GYGGVSLPEW	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix et al., 2016)
		LKGYGGVSLPE	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix et al., 2016)
		KGYGGVSLPEW	Inhibidor de ACE	(Tavares et al., 2011; Tavares & Xavier Malcata, 2012)
		LKGYGGVSLPEW	Inhibidor de ACE	(Otte et al., 2007)
	QNNDST, HTSGYDTQAIVQNNDSTEYGLFQIN	IVQNNDSTEYGLF	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix & Li-Chan, 2014)
	EWVCTTFHTSGYDTQAIVQ	TTFHTSGY	Inhibidor de ACE	(Villadóniga & Cantera, 2019)
	MHIRL	HIRL	Ansiolítico	(Yamauchi et al., 2006)
		PMHIR	Inhibidor de ACE	(Li et al., 2022)
		ALPMHIR	Inmunomodulador	(Jacquot et al., 2010)
			Inhibidor de ACE	(Maes et al., 2004; (Yamada et al., 2015; Mullally et al., 1997)
	SLACQ	WYSLAM	Inhibidor de ACE	(Hernández-Ledesma et al., 2007)
	LFCMEN, ENSAEPE	CMENSA	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 2000)
	VEELKPTPE, DLEIL, PEGDLE	LKPTPEGDL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix & Li-Chan,

			2014; Lacroix et al., 2017)
	LKPTPEGDLE	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix & Li-Chan, 2014)
	LKPTPEGDLEIL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix & Li-Chan, 2014)
LSFNPTQL, LSFNP, LSFNPTQ, SFNPT	LSFNPTQ	Inhibidor de ACE	(Lacroix et al., 2016)
TQTMKGL, LIVTQT	LIVTQTMK	Inmunomodulador	(Jacquot et al., 2010)
TMKGLDIQKV, QTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDI, LDIQKVAGTWYSLAMAASDI, AMAASD, MAASDISLLD, LDIQKV	LDIQK	Inhibidor de ACE	(Hernández-Ledesma et al., 2006)
	GLDIQK	Hipocolesterolémico, inhibidor de ACE	(Nagaoka et al., 2001; Pihlanto-Leppälä et al., 1998)
	IQKVAGTW	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV, inhibidor de ACE	(Lacroix et al., 2016)
	GLDIQKVAGT	Antimicrobiano	(Ali & LaPointe, 2022)
	WYSLAMAASDI	Antioxidante	(Hernández-Ledesma et al., 2005)
EVDDE, TPEVD, PEVDDE, TPEVDDE, TPEVDDEA, EVDDEALE	TPEVDDEALEK	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV, Antimicrobiano	(Silveira et al., 2013; Power et al., 2014; Demers-Mathieu et al., 2013)
DAQSAPLRV, ASDISLLDAQSAP	LDAQSAPLR	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 2000)

α-Caseína		DAQSAPLRVY	Inhibidor de ACE	(Tavares et al., 2011; Tavares & Xavier Malcata, 2012)
		AASDISLLDAQSAPLR	Antimicrobiano	(Pellegrini et al., 2001)
	SMKEG	AMKPW	Inhibidor de ACE	(Maeno et al., 1996)
	VAPFP	VAPFPE	Inhibidor de la solubilidad del colesterol	(Jiang et al., 2020)
		FVAPFPEVFG	Inhibidor de ACE	(Robert et al., 2004)
	SENSE	IGSENSEKTTMP	Inhibidor de ACE	(Hayes et al., 2007)
	HQGLPQ	FALPQY	Inhibidor de ACE	(Tauzin et al., 2002)
		IKHQGLPQE	Antimicrobiano	(Hayes et al., 2006; (Kent et al., 2012; Norberg et al., 2012)
		IKHQGLPQEV	Antimicrobiano	(Elbarbary et al., 2012)
	LNENLL	VLNENLLR	Antimicrobiano	(Hayes et al., 2006; (Kent et al., 2012; Norberg et al., 2012)
	YQGPIVL	PIVLNP	Precursor del crecimiento microbiano	(Zhang et al., 2011)
	LNREQLS	EQLTK	Antimicrobiano	(Pellegrini et al., 1999)
		YLEQLLR	Antimicrobiano	(Liu et al., 2015)
	INPSKENL	NPSKENL	Precursor del crecimiento microbiano	(Zhang et al., 2011)

	NMAINPSK	Inhibidor de ACE	(Tauzin et al., 2002)
TEDQAME	DIGSESTEDQAMEDIK	Promotor de la absorción de calcio	(Cao et al., 2017)
DIPNPI, DIPNP, SDIPNPI, TQYTDAPSFSDIPNPI, FSDIPNP, FSDIPNPI	DIPNPI	Precursor del crecimiento microbiano	(Zhang et al., 2011)
	FSDIPNPIGSE	antioxidante	(Zhao et al., 2021
	FSDIPNPIGSEN	antioxidante	(Zhao et al., 2021
	SDIPNPIGSENSEK	Antimicrobiano	(Hayes et al., 2006)
	APSFSDIPNPIGSENSE	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
	GTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW	Inhibidor de ACE	(Yamamoto et al., 1994)
QKEDVPSERYLGY	HIQKEDVPSERYLGYLEQLLRLKKYK	Antimicrobiano	(Liu et al., 2015)
	HIQKEDVPSERYLGYLEQLLRLKK	Antimicrobiano	(Liu et al., 2015)
	HIQKEDVPSERYLGYLEQLLRLK	Antimicrobiano	(Liu et al., 2015)
ESISSSEEIVPNSVE	QMEAESISSSEEIVPNSVEQK	Inmunomodulador	(Hata et al., 1998)
ALNEINQ, QKALNE	EQLTK	Antimicrobiano	(Pellegrini et al., 1999)
	LAHKAL	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 1998)
	ALNEINQFY	Inhibidor de ACE	(Tauzin et al., 2002)
	QKALNEINQF	Antimicrobiano	(Sistla, 2013)
	ALNEINQFYQK	Inhibidor de ACE	(Tauzin et al., 2002)
QFYQKFPQYLQYLYQGPIVL	YQKFPQYLQY	Inhibidor de ACE	(Xue et al., 2018)
VPGEI, NVPGEI, NVPGEIVE, NVPGE	VPGEIVE	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongoniema &

				FitzGerald, 2016)
		LNVPGEIVE	Inhibidor de ACE	(Gobbetti et al., 2000)
		NVPGEIVESL	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
		ELNVPGEIVES	Antimicrobiano	(Ali & LaPointe, 2022)
β-Caseína	NIPPL, PQNIP, LTQTP, PQNIPPL	PQNIPPL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Uenishi et al., 2012)
		IPPLTQT	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongoniema & FitzGerald, 2016)
		LPQNIPP	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Uenishi et al., 2012)
		LPQNIPPLT	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongoniema & FitzGerald, 2016)
		SLPQNIPPL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Rendón-Rosales et al., 2022)
		NIPPLTQTPV	Inhibidor de ACE	(Gobbetti et al., 2000)
	PVVVPP, VVPPF	VVPP	Inhibidor de ACE	(Wang et al., 2011)
		TPVVVPPFLQP	Inhibidor de ACE	(Abubakar et al., 1998)
	EPVLGPV, TQTPV	QEPV	Inmunomodulador	(Jiehui et al., 2014)
		VLGP	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongoniema & FitzGerald, 2013)
			Inhibidor de ACE	(Norris et al., 2014)

	QEPVL	Inmunomodulador	(Jiehui et al., 2014)
	YQEPVL	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 1998; Donkor et al., 2007)
	EPVLGPVRGP	Citomodulador	(Zhao et al., 2014)
	YQEPVLGPVR	Inhibidor de ACE, Inmunomodulador	(Lu et al., 2016) (Kayser & Meisel, 1996)
	VLGPVRGPFP	Antitrombótico Inhibidor de ACE	(Liu et al., 2019) (Quirós et al., 2007; Miguel et al., 2006)
	LYQEPVLGPVR	Antiinflamatorio Inhibidor de ACE	(Adams et al., 2020) (Adams et al., 2020)
	EPVLGPVRGPFP	Inhibidor de ACE	(Hayes et al., 2007)
	LLYQEPVLGPVR	Inhibidor de ACE	(Liu et al., 2020)
QSLVYP, EMPFPK, HKEMPF	YPFP	Opioide, Anticancerígeno	(Meisel et al., 1989; Hatzoglou et al., 1996)
	YPFPG	Promotor del crecimiento de neuritas Opioide Potenciador de la motilidad intestinal	(Sakaguchi et al., 2003) (Sienkiewicz-Szłapka et al., 2009) (Dalziel et al., 2014)

	Potenciador del aprendizaje y la memoria	(Sakaguchi et al., 2006)
	Inmunomodulador	(Haq et al., 2014)
	Anticancerígeno	(Hatzoglou et al., 1996)
	Inmunomodulador	(Migliore-Samour & Jollès, 1988; Xu et al., 2020)
PGPIPN	Anticancerígeno	(Wang et al., 2013)
	Antiinflamatorio	(Adams et al., 2020)
	Inhibidor de ACE	(Adams et al., 2020)
YPFPGP	Opioide, nhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Meisel et al., 1989; Nongonierma & FitzGerald, 2016)
GPFPI	Inhibidor de la catepsina B	(Lee & Lee, 2000)
PFPGPI	Inhibidor de la catepsina B	(Lee & Lee, 2000)
	Opiode	(Plaisancié et al., 2015)
	Potenciador de la bradicina	(Perpetuo et al., 2003)
EMPFPK	Antimicrobiano	(Sedaghati et al., 2016)
	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 1998)
PGPIPNS FPGPIPN	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Uenishi et al., 2012)

LVYPFP	Inhibidor de ACE	(Gonzalez-Gonzalez et al., 2013)
VYPFPG	Inhibidor de ACE	(Abubakar et al., 1998)
SLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
QSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
YPFPGPI	Promotor de saciedad	(Osborne et al., 2014)
	Reductor del nivel de MDA en el páncreas	(Yin et al., 2012)
	Opioide	(Claustre et al., 2002; Martínez-Maqueda et al., 2012; Sienkiewicz-Szłapka et al., 2009; Meisel et al., 1989; Zoghbi et al., 2006)
	Potenciador de la secreción de moco yeyunal.	(Trompette et al., 2003)
	Inmunomodulador	(Haq et al., 2014; Kayser & Meisel, 1996)
	Ansiolítico	(Dubynin et al., 1998)
	Anticancerígeno	(Hatzoglou et al., 1996)
	Inhibidor de ACE	(Hernández-Ledesma et al., 2004;

		Amigo et al., 2020)
	Antioxidante	(Amigo et al., 2020)
LVYPFPGP	Inhibidor de ACE	(Otte et al., 2007)
VYPFPGPI	Inhibidor de la prolil endopeptidasa	(Asano et al., 1992)
PFPGPIPN	Inhibidor de ACE	(Lin et al., 2017)
YPFPGPIP	Antioxidante	(Amigo et al., 2020)
	Inhibidor de ACE	(Amigo et al., 2020)
HKEMPFPK	Antimicrobiano	(Sedaghati et al., 2016)
VRGPFPIIV	Inhibidor de ACE	(Quirós et al., 2007; Miguel et al., 2006)
VYPFPGPIP	Inhibidor de la prolil endopeptidasa	(Asano et al., 1992)
	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Uenishi et al., 2012)
YPFPGPIPN	Inhibidor de ACE	(Saito et al., 2000; Amigo et al., 2020)
	Antioxidante	(Amigo et al., 2020)
YPFPGPIPNS	Ansiolítico	(Takeuchi et al., 2022)
LVYPFPGPIP	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 2010)
VYPFPGPIPN	Antioxidante, Inhibidor de ACE	(Eisele et al., 2013; Tonolo et al., 2020)

	LVYPFPGPIPNSLPQ	Inhibidor de ACE	(Smacchi & Gobbetti, 1998)
	LVYPFPGPIPNSLPQN	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 2010)
	VYPFPGPIPNSLPQNIPP	Inhibidor de ACE	(Otte et al., 2007)
	LVYPFPGPIPNSLPQNIPP	Inhibidor de ACE	(Minervini et al., 2003; Otte et al., 2007; Quirós et al., 2007)
	DELQDKIHPFAQTQSLVYPFPGPIPN S	Inhibidor de ACE	(Yamamoto et al., 1994)
PVEPF, YPVEP, PVQPF	YPVEPF	Opioide	(Jinsmaa & Yoshikawa, 1999; Plaisancié et al., 2015)
		Potenciador de la expresión de MUC4.	(Plaisancié et al., 2015)
		Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongoniema & FitzGerald, 2016)
		Antioxidante	(Amigo et al., 2020)
		Antimicrobiano	(Ouertani et al., 2018)
	YPVEPFTE	Potenciador de la bradicina	(Perpetuo et al., 2003)
	FPKYPVEPF	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
	MPFPKYPVEP	Inhibidor de ACE	(Hayes et al., 2007)
PFAQTQSL	IHPFAQTQ	Inhibidor de la enzima prolil-endopeptidasa	(Meisel et al., 1989;

			Asano et al., 1992)
	TQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
	QTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
	AQTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
	FAQTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
	HPFAQTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
	IHPFAQTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
	KIHPFAQTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
KVLPV	KVLILA	Inhibidor de ACE	(Wang et al., 2011)
	KVLPVP	Inhibidor de ACE	(Liu et al., 2007; Adams et al., 2020)
	VLPVPQ	Inhibidor de la solubilidad del colesterol	(Jiang et al., 2020)
		Antimicrobiano	(Sedaghati et al., 2016)
	VLPVPQK	Inhibidor de ACE	(Vij et al., 2016)
		Antienvejecimiento	(Kumar et al., 2019)
		Osteoanabólico	(Upadhyay et al., 2020)
	KVLPVPQ	Inhibidor de ACE	(Maeno et al., 1996; Adams et al., 2020)
		Antiinflamatorio	(Adams et al., 2020)
	SKVLPVPQ	Inhibidor de ACE	(Yamamoto et al., 1994)

	KVLPVPQK	Antiinflamatorio	(Tonolo et al., 2022)
		Antioxidante	(Tonolo et al., 2020; Tonolo et al., 2018; Rival et al., 2001)
	SQSKVLPVPQ	Inhibidor de ACE	(Hayes et al., 2007)
SLSSSEESITRI	SSSEESITRIN	Antimicrobiano	(Ali & LaPointe, 2022)
EAMAPK	EMAPK	Antimicrobiano	(Sedaghati et al., 2016)
	EMAPKHK	Antimicrobiano	(Sedaghati et al., 2016)
	VKEAMAPK	Antioxidante	(Rival et al., 2001)
		Antimicrobiano	(Sedaghati et al., 2016)
PHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVL	PPQSVLSLSQSKVLPVPQ	Inhibidor de ACE	(Yamamoto et al., 1994)
TESQSLT, TESQSLTLTDVENL	KYPVEPFTESQSLTL	Inhibidor de ACE	(Yamamoto et al., 1994)
PHQPLPPT, PLPPT, LPLPL	LPLPL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongoniema & FitzGerald, 2014; Nongoniema & FitzGerald, 2016)
	LPLPLL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongoniema & FitzGerald, 2016)
		Inhibidor de ACE	(Lin et al., 2017)

		LPVPQ	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongoniema & FitzGerald, 2016)
		LHLPLPL	Inhibidor de ACE	(Quirós et al., 2007)
		NLHLPLPLL	Inhibidor de ACE	(Robert et al., 2004)
		ENLHLPLPLL	Inhibidor de ACE	(Robert et al., 2004)
		HQPHQPLPPT	Inhibidor de ACE	(Adams et al., 2020)
		WMHQPHQPLPPT	Antiinflamatorio	(Adams et al., 2020)
			Inhibidor de ACE	(Adams et al., 2020)
		SWMHQPHQPLPPT	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
		HQPHQPLPPTVMFPPQ	Antiinflamatorio, inhibidor de ACE	(Adams et al., 2020)
			Inhibidor de ACE	(Adams et al., 2020)
	PPKKN, AIPPK	MAIPPKK	Antitrombótico, inhibidor de ACE	(Wada & Lönnerdal, 2015; Miguel et al., 2007)
Kappa-Caseína	QYVLSRYPSYGLNYY	YPSYGLNY	Opioide	(Chiba et al., 1989)
		QYVLSRYPSYGLN	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
	PPEINT, EIPTINT, TEIPT	EIPT	Antimicrobiano	(López-Expósito et al., 2006)
	QVTST, ESPPEINTVQVTST	VQVTSTAV	Antimicrobiano	(López-Expósito et al., 2006)
	SFMAIPPKKNQDKTEIPTINT	MAIPPKKNQDKTEIPTINT	Antimicrobiano	(Robitaille et al., 2012)

		IPPKKNQDKTE	Potenciador de la resistencia a la insulina	(Song et al., 2017)
	PTSTPTIEAVESTVATLEASPE	AVESTVATLEDSPEVIESPPE	Antimicrobiano	(Malkoski et al., 2001)
	QDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEA	DKTEIPTINTIASGEPT	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
	PTTMARHPHPHLSFMAIPPKKNQ	HPHPHLSFMAIPP	Inhibidor de ACE	(Rendón-Rosales et al., 2022)
	LSNTVPAKSCQAQPTTMARHPH, SNTVPAKSCQAQPTTMARHPHP, QWQVLSNTVPAKSCQAQPTTMARH	NTVPAKSCQAQPTTM	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)

MBPDB= Base de datos de péptidos bioactivos de la leche

Tabla 31. *Péptidos identificados LEs (MBPDB)*

Origen	Secuencia identificada	Péptido reportado en la literatura	Actividad biológica	Referencia
α-LA	LDDDL, DDLTD, DDDLTDDI, DDDLTDDIM, LDDDLTDD, LDDDLTDDI, LDDDLTDDIM	KFLDDDLTDDIM DKFLDDDLTDDIM	Antioxidante	(Báez et al., 2021)
	QAIVQNNDSTEYGL	IVQNNDSTEYGLF	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix & Li-Chan, 2014)
	QNPHSSNICNISC	IWCKDDQNPH	Antioxidante	(Báez et al., 2021)
	VSLPE	VSLPEW	Inhibidor de ACE	(Otte et al., 2007)
		GVSLPEW	Inhibidor de ACE	(Otte et al., 2007)
		YGGVSLPEW	Inhibidor de ACE	(Otte et al., 2007)
		GYGGVSLPEW	Inhibidor de ACE	(Lacroix et al., 2016)
β-LG	LDIQKV, TMKGLDIQKV	LDIQK	Inhibidor de ACE	(Hernández-Ledesma et al., 2006)
		GLDIQK	Hipocolesterolémico	(Nagaoka et al., 2001)

		Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 1998)
	IQKVAGTW	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix et al., 2016)
		Inhibidor de ACE	(Lacroix et al., 2016)
	GLDIQKVAGT	Antimicrobiano	(Ali & LaPointe, 2022)
TPEVD, TPEVDDE, PEVDDE, TPEVDDEA	TPEVDDEALEK	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Silveira et al., 2013; Power et al., 2014)
		Antimicrobiano	(Demers-Mathieu et al., 2013)
PEGDLE, EGDLEIL, ELKPTPE	LKPTPEGDL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix & Li-Chan, 2014; Lacroix et al., 2017)
	LKPTPEGDLE	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix & Li-Chan, 2014)
	LKPTPEGDLEIL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix & Li-Chan, 2014)
SAEPE, NSAEP	IAEK	Inhibidor de ACE	(Tondo et al., 2020)
DLEILL	EILLQK	Inmunomodulador	(Jacquot et al., 2010)
SFNPT, LSFNPT, LSFNPTQL, SFNPTQLEEQ	LSFNPTQ	Inhibidor de ACE	(Lacroix et al., 2016)
TQTMKG, LIVTQT	LIVTQTMK	Inmunomodulador	(Jacquot et al., 2010)
LAMAAS, YSLAMAA, AMAASD	LAMA	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 2000)
	WYSLA	Inhibidor de ACE	(Hernández-Ledesma et al., 2007)
	WYSLAM	Inhibidor de ACE	(Hernández-Ledesma et al., 2007)
	WYSLAMA	Inhibidor de ACE	(Hernández-Ledesma et al., 2007)
	WYSLAMAASDI	Antioxidante	(Hernández-Ledesma et al., 2005)
LVLDTDYK	VLDTDY	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix et al., 2016)
	VLVLDTDYK	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Silveira et al., 2013)
		Antimicrobiano	(Pellegrini et al., 2001)
	VLVLDTDYKKYLLF	Inmunomodulador	(Jacquot et al., 2010)
ALKALPMH	ALPM	Inhibidor de ACE	(Murakami et al., 2004)

		ALPMH	Hipocolesterolémico	(Nagaoka et al., 2001)
			Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 2000)
			Inmunomodulador	(Jacquot et al., 2010)
		ALPMHIR	Inhibidor de ACE	(Maes et al., 2004)
			Inhibidor de ACE	(Mullally et al., 1997)
		LKALPMH	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix et al., 2016)
			Inhibidor de ACE	(Lacroix et al., 2016)
		ALCALPMHIR	Inmunomodulador	(Jacquot et al., 2010)
	MENSAEPEQ	CMENSA	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 2000)
	FFVAP	FFVAP	Inhibidor de ACE	(Maruyama et al., 1985)
	VAPFP	VAPFPE	Inhibidor de la solubilidad del colesterol	(Jiang et al., 2020)
		FVAPFPEVFG	Inhibidor de ACE	(Robert et al., 2004)
	AESISSSEEIVPNSV	QMEAESISSSEEIVPNSVEQK	Inmunomodulador	(Hata et al., 1998)
	ESTEDQAMEDIKQMEAESIS	DIGSESTEDQAMEDIK	Promotor de la absorción de calcio	(Cao et al., 2017)
	FYQLDA, YQLDAYPS	YQLD	Antioxidante	(Zhao et al., 2021
	GKEKVNE	RFFVAPPFPEVFGKEKVNEL	Inductor de bacteriocina	(Georgalaki et al., 2010)
α-S1-Caseina	HQGLPQ	FALPQY	Inhibidor de ACE	(Tauzin et al., 2002)
		IKHQGLPQE	Antimicrobiano	(Hayes et al., 2006; Kent et al., 2012; Norberg et al., 2012)
		IKHQGLPQEV	Antimicrobiano	(Elbarbary et al., 2012)
	LNENLL	NPSKENL	Precursor de crecimiento microbiano	(Zhang et al., 2011)
		VLNENLLR	Antimicrobiano	(Hayes et al., 2006; Kent et al., 2012; Norberg et al., 2012)
		KHQGLPQEVLNENLL	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
	SDIPNPI, SFSDIPNP	DIPNPI	Precursor de crecimiento microbiano	(Zhang et al., 2011)
		FSDIPNPIGSE	Antioxidante	(Zhao et al., 2021
		FSDIPNPIGSEN	Antioxidante	(Zhao et al., 2021
		SDIPNPIGSENSEK	Antimicrobiano	(Hayes et al., 2006)

β-Caseína		APSFSDIPNPIGSENSE	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
	EPFTE	YPVEPFTE	Potenciador de bradicinina	(Perpetuo et al., 2003)
	KVLPV	KVLILA	Inhibidor de ACE	(Wang et al., 2011)
		KVLPVP	Inhibidor de ACE	(Liu et al., 2007; Adams et al., 2020)
		VLPVPQ	Inhibidor de la solubilidad del colesterol	(Jiang et al., 2020)
			antioxidante	(Vij et al., 2016)
		VLPVPQK	Antienvejecimiento	(Kumar et al., 2019)
			Osteoanabólico	(Upadhyay et al., 2020)
		KVLPVPQ	Inhibidor de ACE	(Maeno et al., 1996; Adams et al., 2020)
			Antiinflamatorio	(Adams et al., 2020)
		KVLPVPQK	Antiinflamatorio	(Tonolo et al., 2022)
			Antioxidante	(Tonolo et al., 2018; Rival et al., 2001; Tonolo et al., 2020)
		SKVLPVPQ	Inhibidor de ACE	(Yamamoto et al., 1994)
		SQSKVLPVPQ	Inhibidor de ACE	(Hayes et al., 2007)
	LYQEP	YQEPVL	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 1998; Donkor et al., 2007)
	HKEMPF	EMPFPK	Opiode	(Plaisancié et al., 2015)
			Potenciador de la bradicina	(Perpetuo et al., 2003)
			Antimicrobiano	(Sedaghati et al., 2016)
			Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 1998)
		HKEMFPK	Antimicrobiano	(Sedaghati et al., 2016)
	PLLLQS	LPLPLL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongonierma & FitzGerald, 2016)
			Inhibidor de ACE	(Lin et al., 2017)
	EAMAPK	EMAPK	Antimicrobiano	(Sedaghati et al., 2016)
		EMAPKHK	Antimicrobiano	(Sedaghati et al., 2016)
		VKEAMAPK	Antioxidante	(Rival et al., 2001)
			Antimicrobiano	(Sedaghati et al., 2016)

TQTPVVV	TQTPVVVPPFLQPE	Antioxidante	(Sabeena Farvin et al., 2010)
DVENL, TDVEN	TDVEN	Inhibidor de la solubilidad del colesterol	(Jiang et al., 2020)
EEQQQTEDELQDKI	FQVERQQQTEDELQDK	Promotor de la absorción de calcio	(Cao et al., 2017)
	FQSEEQQQTEDELQDKIHPF	Promotor de la absorción de calcio	(Cao et al., 2017)
GPFPI, GPIPN, FPGPI, YPFPG, YPFPGPI, RGPFP, VYPFPGPI, VYPFPGPIPNSLPQN	YPFP	Opiode	(Gach et al., 2010; Meisel et al., 1989)
		Anticancerígeno	(Hatzoglou et al., 1996)
	GPFPI	Inhibidor de la catepsina B	(Lee & Lee, 2000)
		Promotor del crecimiento de neuritas	(Sakaguchi et al., 2003)
	YPFPG	Opiode	(Sienkiewicz-Szłapka et al., 2009)
		Potenciador de la motilidad intestinal	(Dalziel et al., 2014)
		Potenciador del aprendizaje y la memoria	(Sakaguchi et al., 2006)
		Inmunomodulador	(Haq et al., 2014)
	YPFPGP	Anticancerígeno	(Hatzoglou et al., 1996)
		Opiode	(Meisel et al., 1989)
		Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongonierma & FitzGerald, 2016)
		Inmunomodulador	(Migliore-Samour & Jollès, 1988; Xu et al., 2020)
	PGPIPN	Anticancerígeno	(Wang et al., 2013)
		Antiinflamatorio	(Adams et al., 2020)
		Inhibidor de ACE	(Adams et al., 2020)
	PFPGPI	Inhibidor de la catepsina B	(Lee & Lee, 2000)
	LVYPFP	Inhibidor de ACE	(Gonzalez-Gonzalez et al., 2013)
	VYPFPG	Inhibidor de ACE	(Abubakar et al., 1998)
	YPFPGPI	Promotor de saciedad	(Osborne et al., 2014)
		Reductor del nivel de MDA en el páncreas	(Yin et al., 2012)

	Opiode	(Claustre et al., 2002; Martínez-Maqueda et al., 2012; Sienkiewicz-Szłapka et al., 2009; Meisel et al., 1989; Zoghbi et al., 2006)
	Potenciador de la secreción de moco yeyunal.	(Trompette et al., 2003)
	Inmunomodulador	(Haq et al., 2014; Kayser & Meisel, 1996)
	Ansiolítico	(Dubynin et al., 1998)
	Anticancerígeno	(Hatzoglou et al., 1996)
	Inhibidor de ACE	(Hernández-Ledesma et al., 2004; Amigo et al., 2020)
	Antioxidante	(Amigo et al., 2020)
PGPIPNS	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Uenishi et al., 2012)
FPGPIPN	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Uenishi et al., 2012)
YPFPGPIP	Antioxidante	(Amigo et al., 2020)
	Inhibidor de ACE	(Amigo et al., 2020)
PFPGPIPN	Inhibidor de ACE	(Lin et al., 2017)
LVYPFPGP	Inhibidor de ACE	(Otte et al., 2007)
VYPFPGPI	Inhibidor de la prolil endopeptidasa	(Asano et al., 1992)
VYPFPGPIP	Inhibidor de la prolil endopeptidasa	(Asano et al., 1992)
	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Uenishi et al., 2012)
YPFPGPIPN	Inhibidor de ACE	(Saito et al., 2000; Amigo et al., 2020)
	Antioxidante	(Amigo et al., 2020)
VRGPFPIIV	Inhibidor de ACE	(Quirós et al., 2007; Miguel et al., 2006)
VRGFPPIIV	Inhibidor de ACE	(Quirós et al., 2007)
	Inhibidor de ACE	(Miguel et al., 2006)
YPFPGPIPNS	Ansiolítico	(Takeuchi et al., 2022)

	VYPFPGPIPN	Antioxidante	(Eisele et al., 2013; Tonolo et al., 2020)
		Inhibidor de ACE	(Eisele et al., 2013)
	LVYPFPGPIP	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 2010)
	VLGPVRGPFP	Inhibidor de ACE	(Quirós et al., 2007)
		Inhibidor de ACE	(Miguel et al., 2006)
	LVYPFPGPIPNSLPQ	Inhibidor de ACE	(Smacchi & Gobbetti, 1998)
	LVYPFPGPIPNSLPQN	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 2010)
	VYPFPGPIPNSLPQNIPP	Inhibidor de ACE	(Otte et al., 2007)
	LVYPFPGPIPNSLPQNIPP	Inhibidor de ACE	(Minervini et al., 2003; Otte et al., 2007; Quirós et al., 2007)
IPNSLPQNIP, HNSLPQ, QNIPPLTQ, LTQTPV, TQTPV, PLTQTPV, PNSLPQN	NSLP	Inhibidor de ACE	(Norris et al., 2014)
	SLPQN	Inhibidor de ACE	(Donkor et al., 2007)
	IPPLTQT	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongonierma & FitzGerald, 2016)
	PQNIPPL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Uenishi et al., 2012)
	LPQNIPP	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Uenishi et al., 2012)
	SLPQNIPPL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Rendón-Rosales et al., 2022)
	LPQNIPPLT	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongonierma & FitzGerald, 2016)
	NIPPLTQTPV	Inhibidor de ACE	(Gobbetti et al., 2000)
PHQPLPPT, WMHQPH, PLPPTVMFPPQSVLSLSQSK, PTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVP, TVMFPPQSVLSLSQ, SLSQSKVLP	LHLPLPL	Inhibidor de ACE	(Quirós et al., 2007)
	HQPHQPLPPT	Inhibidor de ACE	(Adams et al., 2020)
	WMHQPHQPLPPT	Antiinflamatorio	(Adams et al., 2020)
		Inhibidor de ACE	(Adams et al., 2020)
	SWMHQPHQPLPPT	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)

		HQPHQPLPPTVMFPPQ	Antiinflamatorio	(Adams et al., 2020)
			Inhibidor de ACE	(Adams et al., 2020)
		PPQSVLSLSQSKVLPVPQ	Inhibidor de ACE	(Yamamoto et al., 1994)
	QTQSLV, QSLTL, ELQDKIHPFAQTQ, QDKIHPFAQTQSLVYPFPGPI	QSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
		TQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
		QTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
		IHPFAQTQ	Inhibidor de la enzima prolil endopeptidasa (PEP)	(Asano et al., 1992)
		AQTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
		HPFAQTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
		IHPFAQTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
		KIHPFAQTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
		DELQDKIHPFAQTQSLVYP FPGPIPNS	Inhibidor de ACE	(Yamamoto et al., 1994)
	NVPGEIVE, VPGEI, EIVESLSSSEES	VPGEIVE	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongonierma & FitzGerald, 2016)
		LNVPGEIVE	Inhibidor de ACE	(Gobbetti et al., 2000)
		NVPGEIVESL	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
		SSEESITRINA	Antimicrobiano	(Ali & LaPointe, 2022)
		ELNVPGEIVES	Antimicrobiano	(Ali & LaPointe, 2022)
	AIPPK	MAIPPKK	Antitrombótico	(Wada & Lönnerdal, 2015)
			Inhibidor de ACE	(Miguel et al., 2007)
	NQDKTE	IPPKKNQDKTE	Mejorador de la resistencia a la insulina	(Song et al., 2017)
Kappa-caseína	QAQPTTMA, WQVLSNTVPAKSCQAQPTTMAR, CQAQPTTMARHPHPHL	ARHPHPHLSFM	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
		NTVPAKSCQAQPTTM	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
	TEIPT, ESPPE, PPEINT	PEIT	Antimicrobiano	(López-Expósito et al., 2006)
	PAQILQWQV	PAAVRSPAQILQ	Antimicrobiano	(López-Expósito et al., 2006)
		AVRSPAQILQWQ	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)

	IASGEPT, TINTIASG, INTIASGEPTST	DKTEIPTINTIASGEPT	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
	EAVESTVATLEDSPEVIES	TEAVESTVATL	Antimicrobiano	(Elbarbary et al., 2012)
		AVESTVATLEDSPEVIESPPE	Antimicrobiano	(Malkoski et al., 2001)

MBPDB= Base de datos de péptidos bioactivos de la leche

Tabla 32. *Péptidos identificados Colada (MBPDB)*

Origen	Secuencia identificada	Péptido reportado (MBPDB)	Actividad biológica	Referencia
α-LA	DDDLTDDI, LDDDLTDD, LDDDLTDDI, DDDLTDDIM, LDDDLTDDIM	KFLDDDLTDDIM	Antioxidante	(Báez et al., 2021)
		DKFLDDDLTDDIM	Antioxidante	(Báez et al., 2021)
	CTTFHTSGYDTQAIVQNNDS, TTFHTSGYDTQAIVQNNDSTEYG	YDTQA	Antioxidante	(Sadat et al., 2011)
		TTFHTSGY	Inhibidor de ACE	(Villadóniga & Cantera, 2019)
β-LG	SFNPT	LSFNPTQ	Inhibidor de ACE	(Lacroix et al., 2016)
	SLACQ	PEQSLACQCL	Inhibidor de ACE	(Ibrahim et al., 2017)
		QSLACQCLVR	Anticancerígeno	(Sah et al., 2015)
	PEGDLEI	LKPTPEGDLEIL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix & Li-Chan, 2014)
		LKPTPEGDLE	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix & Li-Chan, 2014)
		LKPTPEGDL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix et al., 2017; Lacroix & Li-Chan, 2014)
	QTMKGLDI	MKG	Inhibidor de ACE	(Hernández-Ledesma et al., 2006)
		LIVTQTMK	Inmunomodulador	(Jacquot et al., 2010)
	ASDISLLDAQSAP	LDAQSAPLR	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 2000)
		AASDISLLDAQSAPLR	Antimicrobiano	(Pellegrini et al., 2001)

	WY	Inhibidor de ACE, antioxidante	(Hernández-Ledesma et al., 2007)
	WYS	Inhibidor de ACE, antioxidante	(Hernández-Ledesma et al., 2007)
	GTW	Inhibidor de ACE	(Chen et al., 2007)
	WYSL	Inhibidor de ACE, antioxidante	(Hernández-Ledesma et al., 2007)
		Inmunomodulador	(Ma et al., 2016)
	LAMA	Inhibidor de ACE	(Hernández-Ledesma et al., 2007)
	WYSLA	Inhibidor de ACE, antioxidante	(Hernández-Ledesma et al., 2007)
GLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLL, DIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDA, QTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASD, VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSA, TMKGLDIQKVAGTW	WYSLAM	Inhibidor de ACE	(Hernández-Ledesma et al., 2007)
		Antioxidante	(Hernández-Ledesma et al., 2007)
	WYSLAMA	Inhibidor de ACE, antioxidante	(Hernández-Ledesma et al., 2007)
	WYSLAMAASDI	Antioxidante	(Hernández-Ledesma et al., 2007)
	GTWY	Antiinflamatorio	(Ma et al., 2016)
	LDIQK	Inhibidor de ACE	(Hernández-Ledesma et al., 2006)
	GLDIQK	Hipocolesterololémico	(Nagaoka et al., 2001)
		Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 1998)
		Inmunomodulador	(Jacquot et al., 2010)
	VAGTWY	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV, antioxidante	(Power et al., 2014)
		Antimicrobiano	(Pellegrini et al., 2001)
	IQKVAGTW	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix et al., 2016)
		Inhibidor de ACE	(Ashok & Aparna, 2017)
	GLDIQKVAGT	Antimicrobiano	(Ali & LaPointe, 2022)
	LDIQKVAGTW	Inhibidor de ACE	(Lacroix et al., 2016)
LLFCMENSAEPEQSLACQCLVRTP	CMENSA	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 2000)

	TPEVDDEA, TPEVDDE	TPEVDDEALEK	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Silveira et al., 2013; Power et al., 2014)
			Antimicrobiano	(Demers-Mathieu et al., 2013)
	LDTDYKKYLLFCMENSAE	LDTDY	Inhibidor de ACE	(Lacroix et al., 2016)
		DYKKY	Antiinflamatorio	(Ma et al., 2016)
		VLDTDY	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Lacroix et al., 2016)
			Inhibidor de ACE	(Lacroix et al., 2016)
		VLDTDYK	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 2000)
		VLVLDTDYK	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Silveira et al., 2013)
			Antimicrobiano	(Almaas et al., 2011; Pellegrini et al., 2001)
		VLVLDTDYKKYLLF	Inmunomodulador	(Jacquot et al., 2010)
β-Caseína	PLPPT	LPLPLL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongonierma & FitzGerald, 2016)
			Inhibidor de ACE	(Lin et al., 2017)
		LPLPL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongonierma & FitzGerald, 2014, 2016)
		PLPLL	Inhibidor de ACE	(Mao et al., 2007)
		HQPHQPLPPT	Inhibidor de ACE	(Adams et al., 2020)
	PVEPF	YPVEPF	Opioide	(Plaisancié et al., 2015; Jinsmaa & Yoshikawa, 1999)
			Potenciador de la expresión de MUC4	(Plaisancié et al., 2015)
			Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongonierma & FitzGerald, 2016; Nongonierma et al., 2018)
			Antioxidante	(Amigo et al., 2020)
			Antimicrobiano	(Ouertani et al., 2018)
		YPVEPFTE	Potenciador de la bradicinina	(Perpetuo et al., 2003)
		FPKYPVEPF	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
	GPFPIIV	VRGPFPIIV	Inhibidor de ACE	(Quirós et al., 2007; Miguel et al., 2006)
	QTQSLV	QSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)

	TQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
	QTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
	AQTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
	FAQTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
	HPFAQTQSLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)
LNVPGEIVE	VPGEIVE	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongonierma & FitzGerald, 2016)
	LNVPGEIVE	Inhibidor de ACE	(Gobbetti et al., 2000)
	NVPGEIVESL	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
	ELNVPGEIVES	Antimicrobiano	(Ali & LaPointe, 2022)
PPTVMFPPQSVLSLSQSKV	PPQSVLSLSQSKVLPVPQ	Inhibidor de ACE	(Yamamoto et al., 1994)
PVQPFTESQSLTLTDVENL, MPFPKYPVQPFTESQSLTLT	TDVEN	Inhibidor de la solubilidad del colesterol	(Jiang et al., 2020)
	KYPVEPFTESQSLTL	Inhibidor de ACE	(Yamamoto et al., 1994)
	HKEMPFPKYPVEPFTESQ	Antioxidante	(Tonolo et al., 2020)
PFPGPI, VYPFPGPI, LVYPFPGPI, SLVYPFPGPI, VYPFPGPIP, YPFPGPI, QSLVYPFPGPIHNSLPQNIPPL, FAQTQSLVYPFPGPIHNSLPQN	VY	Antioxidante	(Martín-del-Campo et al., 2019; Corrochano et al., 2019)
	YPFP	Opiode	(Gach et al., 2010; Meisel et al., 1989)
	YPFPG	Anticancerígeno	(Hatzoglou et al., 1996)
		Promotor del crecimiento de neuritas	(Sakaguchi et al., 2003)
		Opiode	(Sienkiewicz-Szłapka et al., 2009)
		Potenciador de la motilidad intestinal	(Dalziel et al., 2014)
		Potenciador del aprendizaje y la memoria	(Sakaguchi et al., 2006)
		Inmunomodulador	(Haq et al., 2014)
		Anticancerígeno	(Hatzoglou et al., 1996)
	GPFPI	Inhibidor de la catepsina B	(Lee & Lee, 2000)
	SLVYP	Inhibidor de ACE	(Kohmura et al., 1990)

LVYPFP	Inhibidor de ACE	(Gonzalez-Gonzalez et al., 2013)
YPFPGP	Opiode	(Meisel et al., 1989)
	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongonierma & FitzGerald, 2016)
	Inmunomodulador	(Migliore-Samour & Jollès, 1988; Xu et al., 2020)
PGPIPN	Anticancerígeno	(Wang et al., 2013)
	Antiinflamatorio	(Adams et al., 2020)
	Inhibidor de ACE	(Adams et al., 2020)
PFPGPI	Inhibidor de la catepsina B	(Lee & Lee, 2000)
VYPFPG	Inhibidor de ACE	(Abubakar et al., 1998)
	Opiode	(Plaisancié et al., 2015)
EMPFPK	Potenciador de la bradicina	(Perpetuo et al., 2003)
	Antimicrobiano	(Sedaghati et al., 2016)
	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 1998)
	Promotor de saciedad	(Osborne et al., 2014)
	Reductor del nivel de MDA en el páncreas	(Yin et al., 2012)
	Opiode	(Claustre et al., 2002; Martínez-Maqueda et al., 2012; Sienkiewicz-Szłapka et al., 2009; Meisel et al., 1989; Zoghbi et al., 2006)
YPFPGPI	Potenciador de la secreción de moco yeyunal.	(Trompette et al., 2003)
	Inmunomodulador	(Haq et al., 2014)
	Ansiolítico	(Dubynin et al., 1998)
	Anticancerígeno	(Hatzoglou et al., 1996)
	Inhibidor de ACE	(Hernández-Ledesma et al., 2004; Amigo et al., 2020)
	Inmunomodulador	(Kayser & Meisel, 1996; Haq et al., 2014)
	Antioxidante	(Amigo et al., 2020)
PGPIPNS	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Uenishi et al., 2012)

FPGPIPN	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Uenishi et al., 2012)
YPFPGPIP	Antioxidante	(Amigo et al., 2020)
	Inhibidor de ACE	(Amigo et al., 2020)
PFPGPIPN	Inhibidor de ACE	(Lin et al., 2017)
LVYPFPGP	Inhibidor de ACE	(Otte et al., 2007)
VYPFPGPI	Inhibidor de la prolil endopeptidasa	(Asano et al., 1992)
VYPFPGPIP	Inhibidor de la prolil endopeptidasa	(Asano et al., 1992)
	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Uenishi et al., 2012)
YPFPGPIPN	Inhibidor de ACE	(Saito et al., 2000; Amigo et al., 2020)
	Antioxidante	(Amigo et al., 2020)
LVYPFPGPIP	Inhibidor de ACE	(Pihlanto-Leppälä et al., 2010)
YPFPGPIPNS	Ansiolítico	(Takeuchi et al., 2022)
VYPFPGPIPN	Antioxidante	(Eisele et al., 2013; Tonolo et al., 2020)
	Inhibidor de ACE	(Eisele et al., 2013)
LVYPFPGPIPNSLPQ	Inhibidor de ACE	(Smacchi & Gobbetti, 1998)
LVYPFPGPIPNSLPQN	Inhibidor de ACE	(Pihlanto et al., 2010)
VYPFPGPIPNSLPQNIPP	Inhibidor de ACE	(Otte et al., 2007)
	Opiode	(Claustre et al., 2002; Martínez-Maqueda et al., 2012; Sienkiewicz-Szłapka et al., 2009; Meisel et al., 1989; Zoghbi et al., 2006)
	Potenciador de la secreción de moco yeyunal.	(Trompette et al., 2003)
	Inmunomodulador	(Haq et al., 2014)
	Ansiolítico	(Dubynin et al., 1998)
	Anticancerígeno	(Hatzoglou et al., 1996)
	Inhibidor de ACE	(Hernández-Ledesma et al., 2004; Amigo et al., 2020)
	Inmunomodulador	(Kayser & Meisel, 1996)

			Antioxidante	(Amigo et al., 2020)
		LVYPFPGPIPNSLPQNIPP	Inhibidor de ACE	(Minervini et al., 2003; Quirós et al., 2007; Otte et al., 2007)
		DELQDKIHPFAQTQSLVYPF PGPIPNS	Inhibidor de ACE	(Yamamoto et al., 1994)
	NIPPLTQTPV, NSLPQN, NIPPLTQT, LTQTPVVV, PQNIPPLTQTPVVVPPFLQP EVMGVS	NSLP	Inhibidor de ACE	(Norris et al., 2014)
		SLPQN	Inhibidor de ACE	(Donkor et al., 2007)
		PQNIPPL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Uenishi et al., 2012)
		IPPLTQT	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongonierma & FitzGerald, 2016)
		LPQNIPP	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Uenishi et al., 2012)
		SLPQNIPPL	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Rendón-Rosales et al., 2022)
		LPQNIPPLT	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Nongonierma & FitzGerald, 2016)
		NIPPLTQTPV	Inhibidor de ACE	(Gobbetti et al., 2000)
		TQTPVVVPPFLQPE	Antioxidante	(Sabeena Farvin et al., 2010)
		NIPPLTQTPVVVPPFLQ	Inhibidor de ACE	(Hayes et al., 2007)
		SLPQNIPPLTQTPVVVPPF	Anticancerígeno, antioxidante	(Sah et al., 2016)
		LPQNIPPLTQTPVVVPPFLQP EVMGVSK	Inhibidor de ACE	(Yamamoto et al., 1994)
	LEDSPEV	NI	ND	NP
Kappa-caseína	VIESPPEI, VIESPPEIN, ESPPEINT, VIESPPEINT	SPPEIN	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV, inhibidor de ACE	(Skrzypczak et al., 2017)
		PEVIESPPEI	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV, inhibidor de ACE	(Skrzypczak et al., 2017)
		VIESPPEINT	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV	(Skrzypczak et al., 2017)
		SPPEINTVQ	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV, inhibidor de ACE	(Skrzypczak et al., 2017)
		EDSPEVIESPP	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV, inhibidor de ACE	(Skrzypczak et al., 2017)

	SPPEINTVQVT	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV, inhibidor de ACE	(Skrzypczak et al., 2017)
	IESPPEINTVQV	Inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV, inhibidor de ACE	(Skrzypczak et al., 2017)
	AVESTVATLEDSPEVIESPPE	Antibacteriano	(Malkoski et al., 2001)

MBPDB= Base de datos de péptidos bioactivos de la leche.

NI=No identificado, ND=No determinado, NP=No publicado

Actualmente se reconoce que el lactosuero mejora la actividad enzimática antioxidante y disminuye el estrés oxidativo (Nabuco et al., 2019). Esta capacidad antioxidante del lactosuero se atribuye a ciertos péptidos que se liberan durante la hidrólisis de las proteínas, cuyas propiedades antioxidantes se relacionan con la composición, estructura e hidrofobicidad de sus aminoácidos, estableciéndose que los aminoácidos hidrófobos y aromáticos actúan como donantes de electrones para estabilizar los radicales libres (Corrochano et al., 2019; Mann et al., 2015). Dado que en este trabajo nos centramos en el estudio de la capacidad antioxidante de nuestras muestras tras la digestión buscamos péptidos que pudieran ser responsables de esta actividad biológica.

Los péptidos con actividad antioxidante derivados de las proteínas de la leche se han asociado principalmente con la caseína bovina, por lo que, esta actividad está ampliamente estudiada y descrita (Amigo et al., 2020; Eisele et al., 2013; Rival et al., 2001; Tonolo et al., 2020). La digestión *in vitro* de las muestras liberó un importante número de péptidos que tienen similitud con varios péptidos o fragmentos descritos (MBPDB) con actividad antioxidante (Tabla 33). El mayor número de péptidos identificados con esta actividad procedían de la β-Caseína. De hecho, los péptidos identificados de la β-Caseína en todas las muestras FPGPI, FPGPIP, LVYPFPGPI, SLVYPFPGPI, VYPFPGPIP y el YPFPGPI, comparten secuencia con los péptidos YPFPGPI, YPFPGPIPN, YPFPGPIP y VYPFPGPIPN descritos como potentes antioxidantes (Amigo et al., 2020; Eisele et al., 2013; Tonolo et al., 2020).

Para predecir la posible actividad antioxidante de las secuencias identificadas, los péptidos fueron analizados mediante la herramienta computacional AnOxPePred-1.0 disponible en línea en https://services.healthtech.dtu.dk/services/AnOxPePred-1.0/.AnOxPePred predice las propiedades antioxidantes de los péptidos mediante el empleo de una red neuronal convolucional que incluye las puntuaciones de eliminación de radicales libres (FRS) y la actividad quelante de metales (MCA), con sus predicciones de 0 no antioxidante a 1 antioxidante (Olsen et al., 2020).

Los péptidos identificados AMAASD, DIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDA, GLDIQKVAG, LAMAAS, LDIQKVAGTWYSLAMAASDI, MAASDISLLD, QTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASD, QTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDI, TWYSLAMAASDISLL, VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSA e YSLAMAA, originados de **β-LG** son fragmentos o tienen en su secuencia los péptidos WYSLAMAASDI, WYSLAMA, WYSLAM, WYSLA, WYSL, WYS, WY potentes péptidos antioxidantes previamente descritos

(Hernández-Ledesma et al., 2005), al igual que el péptido multifuncional VAGTWY del fragmento (15-20) que exhibió fuerte poder antioxidante (Báez et al., 2021; Power et al., 2014). Hernández-Ledesma et al., (2005) demostraron que el péptido WYSLAMAASDI exhibe mayor actividad de eliminación de radicales que el hidroxianisol butilado (BHA), un potente antioxidante utilizado en la industria alimentaria. La actividad antioxidante de este péptido podría deberse a los aminoácidos tirosina (Y) y triptófano (W) presentes en la secuencia, ya que estos dos aminoácidos son los principales contribuyentes a la actividad de eliminación de radicales peroxilos de los péptidos derivados de alimentos (Blanca Hernández-Ledesma et al., 2005; Herrera-Ponce et al., 2019). Aminoácidos hidrofóbicos como Ala (A), Pro (P), Val (V), Ile (I), Leu (L), Phe (F), Tyr (Y), podrían también ser responsables de la actividad antioxidante (Mann et al., 2015).

Curiosamente LEc-V y LEs compartieron la secuencia LDIQKVAGTWYSLAMAASDI, la que además fue la única secuencia identificada en β-LG con una puntuación alta en AnOxPePred-1.0 (0.51940328), posiblemente por que contiene en su secuencia el péptido antioxidante WYSLAMAASDI. Otras secuencias homólogas entre LEc-V y LEs fueron los péptidos de β-Caseína QYVLSRYPSYGLNYY (0.56609654) y PHQPLPPT (0.51506734) que contienen en su secuencia o son fragmentos de los péptidos QYVLSRYPSYGLN y SWMHQPHQPLPPT anteriormente reportados por su actividad antioxidante (Tonolo et al., 2020).

En LEs se identificaron también los péptidos YPFPG y VYPFPGPIPNSLPQN con puntuaciones en AnOxPePred-1.0 de (0.55982882 y 0.53060156). Estos péptidos contienen en su secuencia el péptido YPFPGPIPN descrito como antioxidante (Amigo et al., 2020). En LEc-I se identificó en la β-Caseína el péptido VKEAMAPKHKEMPF (0.52948618) que contiene la secuencia antioxidante VKEAMAPK (Rival et al., 2001). En la *Colada* se identificaron también de β-Caseína los péptidos PQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVS (0.53479415) y QSLVYPFPGPIHNSLPQNIPPL (0.5352537) que contienen en sus secuencias los péptidos con actividad antioxidante descrita TQTPVVVPPFLQPE y VY (Martín-del-Campo et al., 2019; Sabeena Farvin et al., 2010).

La **α-LA** constituye asimismo una abundante fuente de péptidos con actividad biológica que se encuentran codificados en la estructura natural de la proteína (Corrochano, et al., 2018). Aunque se ha destacado anteriormente su potencial antioxidante, los péptidos identificados no se han obtenido mediante digestión gastrointestinal. Así, estudios realizados a partir de la hidrólisis de esta proteína con Corolasa PP®, una mezcla compleja de enzimas similares a la pancreatina,

demostraron su actividad antioxidante pero no purificaron ni identificaron ninguno de los péptidos responsables de la actividad en la fracción hidrolizada (Blanca Hernández-Ledesma et al., 2005). Otras investigaciones demostraron que la actividad antioxidante de α-LA aumenta después de la hidrólisis con alcalasa y que esta se potencia aún más cuando el hidrolizado es sometido a digestión gastrointestinal *in vitro* (Báez et al., 2021; Fernández, 2017; Fernández-Fernández et al., 2018; Hernández-Ledesma et al., 2005; Mann et al., 2015; Sadat et al., 2011). Tras la digestión *in vitro* de nuestras muestras, se identificaron un total de 37 péptidos provenientes de **α-LA** todos estos con actividad biológica descrita según la base de datos MBPDB. De los péptidos identificados 10 tienen en sus secuencias péptidos o fragmentos identificados con posible actividad antioxidante (Tabla 34. Muchos de estos péptidos podrían ser hidrolizados aún más por las peptidasas del borde en cepillo del epitelio intestinal dando lugar a la posible generación de nuevos biopéptidos (Ozorio, Mellinger-Silva, et al., 2020; Vivanco-Maroto et al., 2022).

Tabla 33. *Identificación de péptidos con posible actividad antioxidante*

Muestra	Origen	Secuencia identificada	Puntuación AnOXPepred (FR)	Péptido reportado en la literatura	Referencia
LEc-V, LEs	β-LG	LDIQKVAGTWYSLAMAASDI	0,519403	WYSLAMAASDI	(Hernández-Ledesma et al., 2005)
LEc-V, LEs	β-Ca	PHQPLPPT	0,515067	SWMHQPHQPLPPT	(Tonolo et al., 2020)
LEs	β-Ca	YPFPG	0,559829		(Amigo et al., 2020; Eisele et al., 2013; Tonolo et al., 2020)
LEc-I, LEc-V y LEs	β-Ca	FPGPI	0,495404	YPFPGPI YPFPGPIP YPFPGPIPN VYPFPGPIPN	(Amigo et al., 2020; Corrochano et al., 2018,2019; Krunic et al., 2018; Bjørklund & Chirumbolo, 2017; Castro & Sato, 2014; Adjonu et al., 2013; Zhang et al., 2012)
		FPGPIP	0,505404		
Colada, LEc-V, LEs	β-Ca	PFPGPI	0,507075		
Colada, LEc-I, LEc-V y Les	β-Ca	YPFPGPI	0,538555		(Eisele et al., 2013; Tonolo et al., 2020; Amigo et al., 2020)
		VYPFPGPI	0,5478		
		VYPFPGPIP	0,570759		
		LVYPFPGPI	0,586314		

		SLVYPFPGPI	0,570387		
LEc-I	β-Ca	VYPFPGPIPN	0,558803		
LEs	β-Ca	VYPFPGPIPNSLPQN	0,530602		
Colada	β-Ca	QSLVYPFPGPIHNSLPQNIPPL	0,535254	VY	(Martín-del-Campo et al., 2019; Corrochano et al., 2019)
LEc-I	β-Ca	VKEAMAPKHKEMPF	0,529486	VKEAMAPK	(Rival et al., 2001)
		VVPPFLQPEVMGVSK	0,492507	TQTPVVVPPFLQPE	(Sabeena Farvin et al., 2010)
Colada	β-Ca	PQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVS	0,534794		
LEc-V, LEs	K-Ca	QYVLSRYPSYGLNYY	0,566097	QYVLSRYPSYGLN	(Tonolo et al., 2020)

Los péptidos identificados CTTFHTSGYDTQAIVQNNDS, DDLTD, DDDLTDDI, DDDLTDDIM, LDDDL, LDDDLTDD, LDDDLTDDI, LDDDLTDDIM, QNPHSSNICNISC, TTFHTSGYDTQAIVQNNDSTEYG contienen en sus secuencias o son fragmentos de los péptidos DKFLDDDLTDDIM, KFLDDDLTDDIM, YDTQA, IWCKDDQNPH, descritos anteriormente como antioxidantes (Báez et al., 2021; Sadat et al., 2011). Todos los péptidos identificados de **α-LA** tienen leucina presente en su secuencia y en teoría podrían considerarse potenciales antioxidantes, pero las predicciones utilizando la herramienta AnOxPePred-1.0 dan valores muy bajos para estos péptidos, por lo que, se requiere más investigación.

Además de los péptidos del lactosuero también se identificaron veintitrés péptidos provenientes de la cebada, los que no reportaron actividad antioxidante en la base de datos de BIOPEP, probablemente porque es una fuente de proteínas no tan bien estudiada como la leche. Para establecer la bioactividad potencial de los péptidos secuenciados, estos fueron analizados utilizando PeptideRanker, una herramienta en línea que permite predecir la probabilidad de que un péptido tenga actividad biológica (Bioware.ucd.ie). Este predictor de péptidos bioactivos proporciona una predicción computacional que asigna puntuaciones entre 0 y 1 a péptidos en función de la probabilidad de ser bioactivo de la red neuronal N-a-1 (N1-NN) calculada en función de la secuencia primaria del péptido entrenada a partir de diferentes bases de datos de péptidos bioactivos. Cualquier péptido que posea una puntuación por encima del umbral de 0,5 está etiquetado como bioactivo (Sadat et al., 2011). La bioactividad teórica T se expresó como valores de puntuación calculados (de 0 a 1, siendo 1 el más probable que sea bioactivo). En el caso de estas secuencias de κ-caseína su puntuación fue muy baja (0.14 a 0.22). Dieciséis de los péptidos procedentes de proteínas de cebada tenían una puntuación superior a 0,5 y tres de ellos, PQQPFP, PQQPPFG, QPQPFP, con una probabilidad muy alta de ser biológicamente activos con una puntuación superior a 0,9. Los péptidos etiquetados como potencialmente bioactivos se analizaron por su potencial actividad antioxidante utilizando la herramienta Anoxprep-0.1, Tabla 34. Todos los péptidos mostraron una probabilidad moderada de ser antióxidante, sin embargo, hay que tener en cuenta que todo este estudio se ha realizado *in silico* y por tanto para poder afirmar que tienen esta actividad biológica se requerirá el desarrollo de estudios más profundos tantos *in vitro* como *in vivo*.

Hasta ahora, la mayoría de los estudios destinados a identificar la bioactividad de los péptidos se han llevado a cabo *in vitro* (Amigo et al., 2020; Hernández-Ledesma et al., 2004; Ozorio, Matsubara, et al., 2020; Plaisancié et al., 2015; Tonolo et al., 2020; Wada & Lönnerdal, 2015). Aunque algunos estudios *in vivo* han respaldado la eficacia de los péptidos derivados de las proteínas del lactosuero, la confirmación de la bioactividad de péptidos específicos provenientes de las proteínas de la leche o sus hidrolizados ha sido limitada y ha generado datos contradictorios en la literatura científica (Bojsen et al., 2007; Bouzerzour et al., 2012). Esta discrepancia destaca la falta de correlación entre las propiedades bioactivas observadas *in vitro* y su manifestación *in vivo*. Por lo tanto, para perfeccionar el desarrollo de alimentos funcionales, es crucial obtener un entendimiento más profundo de las secuencias peptídicas responsables de las propiedades bioactivas, así como mejorar la comprensión de la biodisponibilidad y estabilidad de estos péptidos en entornos *in vivo*.

Tabla 34. *Péptidos identificados a partir de α-LA con posible actividad antioxidante*

Secuencia identificada	Puntuación de eliminación de radicales libres	Puntuación de quelación	Péptido reportado	Referencia	Origen
DDLTD	0.29326391	0.25402418	DKFLDDDLTDDIM	(Báez et al., 2021)	LEs
			KFLDDDLTDDIM	(Báez et al., 2021)	
LDDDL	0.3201572	0.23704888			LEc-V, Les
LDDDLTDD	0.27620494	0.2564252			LEc-V, Les, Colada
LDDDLTDDI	0.27425945	0.24734713			LEc-V, LEc-I, LEs, Colada
DDDLTDDIM	0.28313795	0.26775151			LEc-V, LEc-I, LEs, Colada
LDDDLTDDIM	0.28571594	0.26301891			LEc-V, LEc-I, LEs, Colada
DDDLTDDI	0.27256438	0.27041051			LEc-V, LEc-I, LEs, Colada
QNPHSSNICNISC	0.33869171	0.22492634	IWCKDDQNPH	(Báez et al., 2021)	LEs
CTTFHTSGYDTQAIVQNNDS	0.35682714	0.21132275	YDTQA	(Sadat et al., 2011)	Colada
TTFHTSGYDTQAIVQNNDSTEYG	0.32498825	0.23588178	YDTQA	(Sadat et al., 2011)	Colada

Tabla 35. *Caracterización in silico de péptidos de la cebada identificados en la fracción bioaccesible de la bebida de suero digerida (Colada). Predicción de la actividad antioxidante mediante AnOxPePred-1.0*

Origen	Secuencia identificada	Puntuación del clasificador de péptidos	Puntuación de eliminación de radicales libres	Puntuación de quelación
B1-hordeína	PQQPFPPQQPF	0,88	0,52	0,35
B1-hordeína	KPFPQQP	0,62	0,42	0,3
B1-hordeína	PQQPFPPQQP	0,71	0,52	0,34
B1-hordeína	PQQPPFG	0,92	0,51	0,27
Hordeína B1, Hordeína B3	LPQIPE	0,31		
Hordeína B1, Hordeína B3	QLPQIPEQ	0,22		
Hordeína B1, Hordeína B3	LPQIPEQ	0,21		
Hordeína B1, Hordeína B3, Hordeína C	PQQPIPQ	0,51	0,46	0,27
Hordeína B1, Hordeína B3, Hordeína C	PQQPIP	0,66	0,46	0,27
Hordeína B1, Hordeína C, Hordeína Gamma	PQQPFPQ	0,75	0,48	0,28
Hordeína B1, Hordeína C, Hordeína Gamma	PQQPFP	0,9	0,48	0,26
B3-hordeína	QPFPQQP	0,69	0,45	0,32
B3-hordeína	QVQIP	0,17		
C-Hordeína	PQQPLP	0,73	0,46	0,27
C-Hordeína	PQQPLPQ	0,52		
C-Hordeína	SQQPIPQ	0,46		
C-Hordeína	QPLPQPQ	0,48		
Hordeína C, Hordeína B3	QPQPFP	0,92	0,48	0,28
Hordeína C, Hordeína B3	QPQPFPQ	0,8	0,48	0,29
Hordeína Gamma, Hordeína C	QPFPQP	0,87	0,47	0,31
Hordeína Gamma, Hordeína C	PQQPFPQQPQQPFP	0,66	0,51	0,33
Hordeína Gamma	HQFPQPT	0,58	0,47	0,29
Hordeína Gamma	FNPSG	0,75	0,41	0,28

Los resultados obenidos sobre la *Colada* han revelado datos prometedores que podrían tener un impacto significativo en la sociedad. Los péptidos identificados en esta bebida, junto con los resultados detallados de su composición nutricional, indican la posibilidad de que pueda clasificarse como un alimento funcional. Este hallazgo es especialmente relevante en un momento en el que la búsqueda de bebidas funcionales a base de lactosuero se ha intensificado. Recientemente, se han descrito preparaciones que combinan permeado de lactosuero hidrolizado al 80 % mezclado con frutas como la uchuva (*Physalis peruviana L*) y agraz (*Vaccinium meridionale Swartz);* bebida que mostró capacidad antioxidante por ABTS 452,42

± 12 µg trolox/ml y DPPH 219,4±13,34 µg trolox/ml, además de reportar una aceptación del 80 % tras ser sometida a evaluación sensorial del consumidor (Meza et al., 2023). Sin embargo otras preparaciones a base de suero mezclada con zumo de caña de azúcar en proporciones iguales, con un alto contenido en polifenoles 76,33 (µg/L (Zaman et al., 2023) no han tenido aceptación entre los consumidores. Esta disparidad entre los resultados resalta la importancia de la investigación continua para comprender mejor los factores que influyen en la aceptación y el éxito de los productos alimenticios.

Los ensayos realizados en esta tesis doctoral sobre la actividad antioxidante de la *Colada* en cultivos celulares Caco-2 proporcionan evidencia adicional de su potencial beneficio nutricional. Estos hallazgos sugieren que la *Colada* podría ser una opción saludable y accesible para poblaciones con recursos limitados. En última instancia, estos resultados ofrecen perspectivas valiosas para mejorar la calidad de vida y promover la salud en comunidades que enfrentan desafíos nutricionales.

Artículo publicado

antioxidants

Antioxidant potential of the sweet whey-based beverage *Colada* after the digestive process and relationships with the lipid and protein fractions

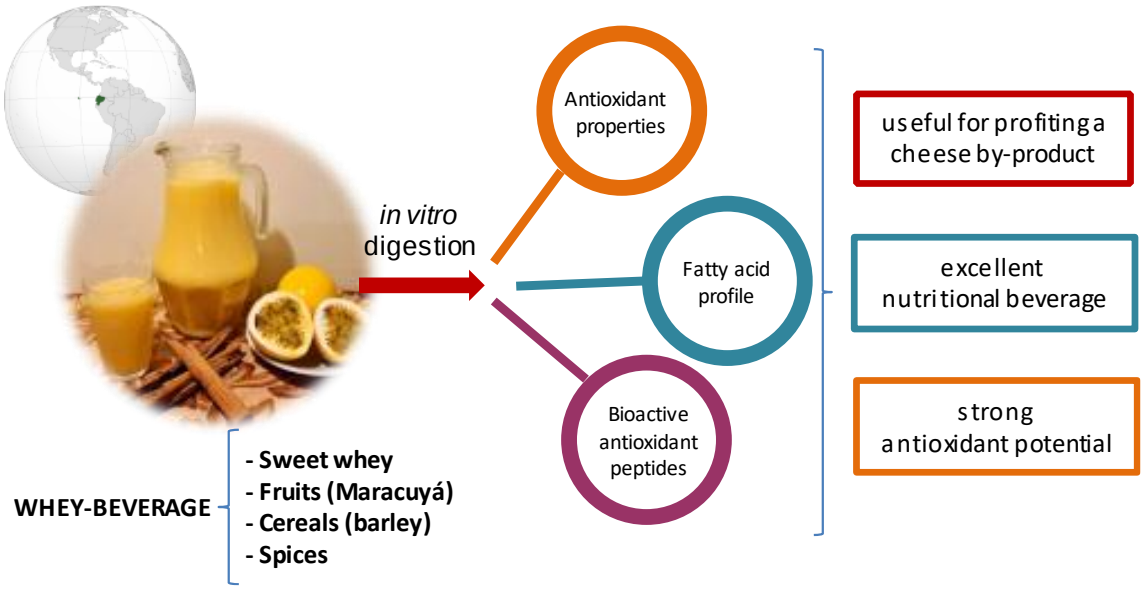
Victoria E. García-Casas[1], Isabel Seiquer[2]*, Zaira Pardo[2], Ana Haro[2], Isidra Recio[3] and Raquel Olías[2]

1. Facultad de Ingeniería Química, Universidad de Guayaquil, Ciudadela Universitaria, Avenida Delta S/N y Avenida Kennedy 090514, Guayaquil, Ecuador; victoriagarciacasas@gmail.com (V.G.C.)
2. Departamento Nutrición y Producción Animal Sostenible, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), San Miguel 101, Armilla, 18100 Granada, Spain. iseiquer@eez.csic.es (I.S.); zaira.pardo@eez.csic.es (Z.P.); ana.haro@eez.csic.es (A.H.); raquel.olias@eez.csic.es (R.O.)
3. Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL (CSIC-UAM, CEI UAM+CSIC), Nicolás Cabrera, 9, 28049 Madrid, Spain; i.recio@csic.es (I.R.)

*Correspondence: iseiquer@eez.csic.es; Tel.: +34-958-572-757

Antioxidants **2022**, *11*(9), 1827; https://doi.org/10.3390/antiox11091827

Received: 7 August 2022
Accepted: 14 September 2022



Abstract: Whey-based beverages could be an effective way of reusing a by-product of th cheese industry, mitigating environmental hazards and, at the same time, profiting a useful food with high nutritional and antioxidant properties. In this study, a traditional Ecuadorian beverage (*Colada*) was prepared combining sweet whey, Maracuyá and barley. Antioxidant properties before and after an in vitro digestion using the INFOGEST method were determined, and relationships with intestinal transformations of the lipid and protein fractions were analyzed. The digestive process had a positive effect on antioxidant properties based on increased values of ABTS and FRAP located in the bioaccessible fraction (BF), together with strong increments of total polyphenols. Moreover, pretreatment of Caco-2 cells with the BF of *Colada* significantly reduced ROS generation ($p < 0.001$) measured by the dichlorofluorescein assay. Substantial changes of the fatty acid profile occurred during digestion, such as a fall of saturated fatty acids and a rise of polyunsaturated. The protein profile, examined by SDS-PAGE and exclusion molecular chromatography in the BF, showed that the major part of the proteins were digested in the intestinal phase. Analysis of NanoLC-MS/MS revealed 18 antioxidant peptides originated from whey proteins, but also 16 peptides from barley with potential antioxidant properties. In conclusion, combining sweet whey with Maracuyá and barley constitutes an excellent nutritional beverage with a strong antioxidant potential.

Keywords: sweet whey; whey beverages; antioxidant activity; in vitro digestion; fatty acids; protein profile; antioxidant peptides.

1. Introduction

Whey is the remaining liquid of the milk after the separation of curd during cheese manufacturing, accounting for 85–90% of the milk volume [1]. It is the main byproduct of the cheese-making industry and about 50% of it is treated as a waste and discarded as an effluent, causing major environmental pollution problems [2]. However, whey contains approximately 55% of the nutrients from milk, including 50–100% of lactose (depending on the pH of whey), 20% of the total protein content and minerals, and it is recognized as a source of functional and bioactive compounds which may represent a valuable food ingredient for human health [3]. Recently, great attention has been focused on the benefits of whey protein regarding antioxidant properties [2,4–6]. Dietary antioxidants provide health advantages to the consumer by combating oxidative stress through different pathways and thus reducing the risk of related diseases, such as cardiovascular and inflammatory pathologies [7].

The whey protein fraction, composed by β-lactoglobulin, α-lactalbumin, bovine serum albumin, immunoglobulins and lactoferrin, is considered to be the main factor responsible for the antioxidant activity [8]. Antioxidant properties of bovine whey proteins have been extensively proven in vitro by decreasing lipid peroxidation [9] or scavenging free radicals [10,11] and

have been attributed to their hydrophobic and aromatic amino acids which can serve as proton donators for free radicals [12]. Assays in cell cultures have shown that whey proteins protect against oxidation by stimulating the cellular antioxidant defenses, such as glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase activities, and enhance expression of genes linked to the antioxidant capacity of cells such as HO-1, NQO1 and Nrf2 [13,14].

The current scientific evidence suggests that whey has transitioned from a waste into a high value-added product useful for the food industry [1]. Nutritional properties of whey have aroused worldwide interest in the formulation of whey-based beverages enriched with diverse fruits and cereals [15]. A wide number of whey beverages have been developed in recent years, those containing fruit juices being among the more relevant and are often preferred by consumers [16,17]. Moreover, fruits and vegetables are a valuable source of different antioxidant compounds, such as carotenoids and polyphenols [17]. *Passiflora edulis* var. Flavicarpa, also known as yellow passion fruit or Maracuyá, is a highly desirable fruit due to the eating quality of its fruits, juiciness, attractive nutritional values and essential health benefits, including antioxidant activity [18]. Among cereals, barley (*Hordeum vulgare L.*) is characterized by its high content of saponarin (flavone-C-glycosides) which possesses antioxidant effects, policosanol polyphenol series, minerals and free amino acids [19]. In developing countries, such as Ecuador, whey is often discarded without any treatment because of the high cost of processing it, with the consequent adverse environmental impacts and wasting of a valuable product for a population with serious problems of maternal and child malnutrition [20]. *Colada* is a traditional beverage usually consumed in Ecuador, made from fruit juice, cereals and spices (https://soleq.travel/traditionalecuadorian-drinks-desserts/, accessed on 1 August 2022).

It is important to bear in mind that, once ingested, the bioactive compounds of any food and their metabolites are subjected to transformations in the gastrointestinal tract due to enzymatic, mechanic and acidic conditions, which may alter their intrinsic activity [21]. It is widely accepted that the crucial requisite for a bioactive compound to exert an antioxidant activity in vivo is to be bioaccessible, i.e., released from the food matrix during the digestive process and still maintain its activity [21]. In this sense, it has been shown that the antioxidant capacity of whey isolated proteins significantly increases after in vitro gastrointestinal digestion and that α-lactalbumin, which releases the highest amount of tryptophan, has the highest antioxidant properties [5].

In the present work, we considered that using whey as a substitute for water in the *Colada* drink would have a double advantage. On the one hand, it would profit a by-product of the cheese industry, mitigating environmental hazards and favoring a circular economy in a sustainable way and, on the other hand, it would increase the nutritional value of the traditional beverage, producing a novel valuable product with nutritional benefits for population. With this background, the aim of this study was to determine the antioxidant properties of a beverage made from sweet whey and enriched with Maracuyá (*Passiflora edulis*) and barley grain (*Hordeum vulgare*), before and after in vitro digestion. Within this purpose, modifications of the lipid and protein fractions due to the digestive process were also analyzed.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

The chemicals used were all of high purity or analytical reagent grade. Bidistilled deionized water (Milli-Q purification system, Millipore, Bedford, MA, USA) was used. Methanol was provided by VWR (Barcelona, Spain), while sodium bicarbonate, acetate sodium, galic acid and hydrochloric acid were acquired from Merck (Darmstad, Germany). Folin–Ciocalteau reagent, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid (Trolox), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), amylase (A1031), pepsin (P7012), pancreatin (P7545), bile salts, sodium dodecyl sulfate (SDS), o-phthaldialdehyde (OPA), DL-dithiothreitol (DTT), L-serine, (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (HEPES), tert-butylhydroperoxide (*t*-BOOH), the cell culture media, cell culture-grade chemicals and fatty acid standards (C15:0 and CRM47885 Supelco 37 Component FAME Mix) were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The ABTS was obtained from Amresco (Solon, OH, USA). 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) and iron (III) chloride for the ferric reducing power (FRAP) assay were from Fluka Chemicals (Fluka Chemicals, Madrid, Spain).

2.2. Preparation of the Whey-Based Beverage Colada and Sensory Evaluation

Milk was obtained from braham cows and fresh bovine whey was supplied by the DIPROLAC center (Balzar canton, Guayas Province, Ecuador). The sweet whey obtained after the precipitation of casein by the enzymatic action of rennet was collected at 37 ˚C and pasteurized at 65 ˚C for 30 min, cooled with thermal shock and kept refrigerated at 4 ˚C until used. The pH (6.55) was measured with a pH-meter BioCharge (BioCharge C.A., Maracay, Venezuela) and it was within the limits of sweet whey (6.4–6.8) of the Ecuadorian technical standard NTE

INEN 2594. Maracuyá, barley and spices used in the beverage preparation were purchased in local stores (municipal market "San Jacinto", Guayaquil, Ecuador); all of them of Ecuadorian origin and with food quality. Barley was selected to be free of contaminants such as weevils, molds or stones, and free of moisture; Maracuyá fruits were collected at a coloration degree of 3–4, according with the maturity degree.

The *Colada* was prepared following the traditional protocol for drinks with cereals and fruits used regularly in the Ecuadorian gastronomic culture, with the exception that water was replaced by sweet whey. Since unprocessed whey is not attractive to consumers because of its sensory properties [22], previous sensorial evaluation was performed to determine the consumer acceptance of the whey beverage. Initially, formulations with different proportions of Maracuyá juice (5, 7, 10, 15 and 20%) were evaluated by five trained judges applying discriminative sensorial analysis to choose the best formulation (Supplementary Material, Table S1). The juice was obtained after separating the seed from the pulp with the help of a spoon and passing the pulp through a 0.5 mm mesh size sieve. The beverage with 15% Maracuyá juice obtained the highest score and, therefore, subsequent sensory analysis of this formulation was performed with a panel of 80 untrained consumers. The sensory attributes evaluated were flavor (bitter, salty, acid, sweet, umami, pungent and astringent), color (brightness, transparency, opacity and paleness), texture (pasty, tender, rubbery, fluid, dense, viscous, elastic, sticky, adherent, fine and liquid) and general appearance (slight, dense and very dense). A 5-point hedonic scale was used in the following sequence: (1): It is not perceived, (2): It is perceived little, (3): It is perceived as fair, (4): It is perceived as good and (5): It is perceived as excellent [22,23]. Panelists were also asked whether they would consume the product, answering with yes or no. Once the good overall acceptance of the assayed whey-beverage *Colada* was proven (Supplementary Material, Table S2), this formulation was selected to perform the current study.

The ingredients (depicted in Table 1) were mixed and homogenized. The mixture was thermally treated at 87 °C for 15 min with constant stirring (Bunsen, Madrid, Spain), cooled to room temperature, filtered and lyophilized (freeze dryer Virtis Genesis, SQ25EL, Warminster, PA, USA). Then, the sample was reduced to a fine dried powder (Moulinex, Barcelona, Spain), mixed to obtain a homogenate sample and stored in aliquots at −20 °C until further analysis.

Table 1. Composition and nutritional analysis of the whey-beverage (*Colada*).

Ingredients (%)

Sweet whey	70
Maracuyá juice	15
Barley	10
Saccharose	4
Aromatic spices [1]	1
Chemical analysis [2]	
Moisture (%)	81.6 ± 0.001
Ash (%)	0.48 ± 0.001
Fat (%)	0.87 ± 0.08
Protein (%)	1.29 ± 0.06
Energy (Kcal/100 g)	81.9 ± 0.11
Calcium (mg/100 g)	29.9 ± 0.10
Phosphorus (mg/100 g)	39.6 ± 0.23
Magnesium (mg/100 g)	8.82 ± 0.07
Sodium (mg/100 g)	34.2 ± 0.20
Potassium (mg/100 g)	156 ± 1.20

[1] Mix of equal parts sweet pepper, cloves and cinnamon. [2] Values are mean ± SE (n = 4), expressed on a fresh matter basis.

2.3. Analysis of Nutrient Composition

Analyses were performed in quadruplicate. Dry matter (method 934.01) and total ash content (method 942.05) were determined using official methods (AOAC, 2000). Fat was extracted with chloroform:methanol at a ratio of 2:1 and quantified by Soxhlet (AOAC, 2000). Total nitrogen was analyzed by the Dumas procedure using LECO Truspec CN equipment (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA); protein content was calculated using the factor of 6.38. Gross energy was determined in an isoperibolic bomb calorimeter (Parr Instrument Co., Moline, LL, USA). The mineral content was analyzed according to the procedure described by Haro et al. [24]. Briefly, after wet digestion of the samples (HNO_3:$HClO_4$ 1:4, 180–220 °C), calcium (Ca), magnesium (Mg), sodium (Na) and potassium (K) were analyzed by flame atomic absorption spectroscopy (FAAS) in a Perkin–Elmer Analyst 700 Spectrophotometer (Norwalk, CT, USA). Total phosphorus (P) was determined colorimetrically at 820 nm in a spectrophotometer (Shimadzu UV-1700, Model TCC-240A, Columbia, CA, USA) by the vanadomolybdate procedure (AOAC, 2000). Certified external standards (European Commission, Reference Materials Unit, Geel, Belgium) were used to assess the accuracy of the methods. All glassware and polyethylene sample bottles used for mineral analysis were washed with 10 mM nitric acid and Milli-Q water.

2.4. In Vitro Digestion

The simulated digestion was performed in triplicate according to the established INFOGEST method [25,26]. Before digestion, an adequate amount of the lyophilized sample was resuspended in water to obtain a final weight of 5 g of fresh matter. The process consisted of oral, gastric and intestinal phases.

For the oral phase, 5 g of the beverage was mixed with 5 g of salivary fluid with α-amylase (75 U/mL). The sample was incubated at 37 °C for 2 min with mild and constant agitation. The gastric phase was initiated with the addition of simulated gastric fluid with pepsin (2000 U/mL in the final mixture); the pH was lowered to 3.0 and the final volume was adjusted to 20 mL with Milli Q water. The mix was then incubated at 37 °C for 2 h with mild and constant agitation. For the intestinal phase, the pH was raised to 7.0 and simulated intestinal fluid containing pancreatin (200 U/mL) and bile salts (10 mM) was added. The volume of the sample was brought up to 40 mL and the mixture was again incubated for 2 h at 37 °C with continuous shaking.

To stop the intestinal digestion, samples were immediately frozen in liquid nitrogen. Samples were defrosted afterwards on ice and centrifuged at 12,000× *g* at 4 °C to separate the soluble or bioaccessible fraction (BF) and the residual fraction (RF). A blank digestion was performed by using a mixture of simulated digestion fluids and the same concentration of enzymes, but the sample was replaced with Milli-Q water. Aliquots for antioxidant analysis and cell culture assays were stored at −80 °C in tubes protected from the light under a nitrogen blanket. For cell experiments and peptide analysis, the BF was filtered through a 30 KDa cutoff filter (Amicon ultra-15 15mL, millipore) in order to eliminate all the intestinal enzymes background.

2.5. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity

Prior to analysis of antioxidant activity and total phenolic content (TPC), a chemical extraction was performed in the undigested samples and the RF from the simulated digestion, following the procedure described by Seiquer et al. [27]. 250 mg of the sample, or the total RF, were mixed with 2.5 mL of acidic methanol/water (50:50 *v*/*v*, pH 2), shaken for 60 min at 220 rpm (circulating shaker OVAN, Barcelona, Spain) and centrifuged (2500× *g*, 10 min,4 °C). A second extraction was performed, adding to the residue 2.5 mL of acetone/water (70:30, *v*/*v*). The supernatants were combined and used for determinations. The BF was used directly.

Three procedures were applied to test the antioxidant activity of the samples: theABTS and DPPH assays, to measure the free radical scavenger ability, and the FRAP method, to study the ferric reducing antioxidant power. The methodologies previously described by Seiquer et al.

[27] were generally followed. A multilabel plate reader (Victor X3, Waltham, MA, USA) was used. Aqueous solutions of Trolox were used for calibration (0.01–0.1 mg/mL). The results were expressed as mM equivalents of Trolox per kg of sample.

In the ABTS assay, the ABTS•+ solution was prepared 12–16 h before use by mixing 2.45 mM potassium persulfate with ABTS 7 mM and diluted to an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 750 nm with 5 mM phosphate-buffered saline. Twenty µL of the samples were added to 280 µL of ABTS solution and incubated for 20 min in the dark before reading the absorbance at 750 nm.

For the DPPH method, 50 µL of the sample were mixed with 250 µL of DPPH solution (74 mg/L in methanol prepared freshly). After 60 min of incubation period, the absorbance was read at 520 nm, maintaining the temperature at 30 °C. The FRAP reagent was prepared daily by mixing 10 mM Fe^{2+}-2,4,6-Tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) with 40 mM HCl, 20 mM ferric chloride and 0.3 M acetate sodium buffer (pH 3.6) at a ratio 1:1:10 *v/v/v*. Twenty µL of sample extract were added to 280 µL of warmed FRAP reagent (37 °C) and incubated at 37 °C for 30 min in darkness, and the absorbance was read at 595 nm.

The TPC was determined following the Folin–Ciocalteau colorimetric method [27]. Ten µL of sample and 10 µL of Folin–Ciocalteau reagent were mixed and let stand for 3 min. 200 µL of sodium carbonate solution (75 g/L) were added, the volume was made up to 250 µL with Milli-Q water, mixed and allowed to stand in the dark for 60 min. The absorbance was measured at 750 nm against a standard curve of gallic acid (0–250 mg/L).

2.6. Reactive Oxygen Species (ROS) Generation in Caco-2 Cells

The BF obtained after in vitro digestion of the *Colada* beverage was used to test the antioxidant potential of the whey beverage at the cell level by measuring effects in the reactive oxygen species (ROS) generation in Caco-2 cells, according with Borges et al. [21]. Caco-2 cells were purchased through the Cell Bank of Granada University (Granada, Spain) from the European Collection of Cell Cultures (ECACC). The cells were maintained in 75 cm^2 plastic flasks (Costar, Cambridge, MA, USA) by serial passages, using as a culture medium high-glucose Dulbecco's modified minimal essential medium (DMEM), with heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (10%), $NaHCO_3$ (3.7 g/L), nonessential amino acids (1%), HEPES (15 mM), bovine insulin (0.1 UI/mL) and 1% antibiotic–antimycotic solution. ROS determinations were carried out both at basal conditions and against an induced oxidative stress. Experiments were carried out with BF:FSB-free DMEM (at a ratio of 1:1 *v/v*), as previous assays using the

colorimetric MTT method (3-(4,5-dime thylthiazol2-yl)-2.5-diphenyltetrazolium bromide, Roche, Mannheim, Germany) showed that cell viability was >90% at such conditions.

Determination of ROS generation was performed by the dichlorofluorescin (DCFH) assay. Briefly, cells were seeded in 24-well multiwell plates 10×10^4 cells/mL (400 µL/well) and allowed to grow for 48 h. Spent medium was removed and cells were preincubated with the BF for 2 h. Then, cells were treated with DCFH 20 µM and incubated for 1 h. The DCFH was removed and culture medium (for basal measurements) or *t-BOOH* 10 mM (to induce oxidation) was added to the wells. The absorbance was measured at a wavelength of 485 nm excitation and 535 nm emission at 37 ˚C for 0–90 min. In the presence of free radicals such as ROS, the DCFH is oxidized into dichlorofluorescein (DCF) and emits fluorescence, which is measured to estimate the ROS production. Results of ROS generation were expressed as fluorescence units.

2.7. Fatty Acid (FA) Analysis

The FA analysis was carried out before and after the in vitro digestion of the samples. Prior to the analysis, aliquots of 10 mL of the BF (in triplicate) were lyophilized using a LyoQuest-85 freeze dryer (Telstar, Terrasa, Spain).

Fat was extracted with a 2: 1 chloroform/methanol mixture (*v*/*v*) [28], and the FA were then methylated in accordance with Kramer et al. [29], with slight modifications. The extracted lipid fraction was initially methylated using NaOH/methanol (50 ˚C, 15 min) followed by HCl/methanol (50 ˚C, 1 h) for obtaining the fatty acid methyl esters (FAME). Pentadecanoic acid (C15:0) was used as internal standard. The fatty acid profile was determined with a gas chromatograph (Focus GC, Thermo Scientific, Milan, Italy) equipped with a split/splitless injector, a flame ionization detector and a 100 m × 0.25 mm × 0.2 µm capillary silica gel column (SP 2560 Supelco, Bellefonte, PA, USA). The temperature of the program was 70 to 240 ˚C and the injector and detector were maintained at 250 ˚C. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. Individual FAME peaks were identified by comparing their retention times with those of standards (Supelco 37 Component FAME Mix) and the results were expressed as the relative percentage of each fatty acid of the total identified, calculated by internal normalization of the chromatographic peak area. Chromatograms of the FAME of the whey-beverage (*Colada*) before and after the in vitro digestion are shown as supplementary material (Figures S1 and S2, respectively).

2.8. Amino Acid Analysis

The amino acid (aa) analysis was carried out quantitatively by using a Biochrom 30 amino acid analyzer based on ion-exchange liquid chromatography and a post-column continuous reaction with ninhydrin. The post-column ninhydrin derivative eluted from the column was monitored at 570 and 440 nm (proline). The resultant chromatogram gave us the identity and amount of the aa present in samples (Supplementary Material, Figure S3). Total aa content was analyzed after 50 mg were hydrolyzed with 4 mL of 6 N HCl. The solutions were sealed in tubes under nitrogen and incubated at 110 °C for 24 h. The sulfur-containing AA, cysteine, and methionine were measured as methionine sulphone and cysteic acid after performic acid oxidation (Supplementary Material, Figure S4). The determination of tryptophan was not possible due to its degradation following acid hydrolysis.

2.9. Degree of Hydrolysis (DH)

The protein hydrolysis in each one of the digestion phases was measured using the OPA (o-phthaldialdehyde) methodology at 340 nm [30]. The OPA reagent was prepared as follows: 7.62 g di-Na-tetraborate decahydrate and 200 mg Na-dodecyl-sulfate (SDS) were dissolved in 150 mL deionized water. 160 mg OPA was dissolved in 4 mL ethanol; the OPA solution was then transferred to the above-mentioned solution. Finally, 176 mg DTT was added to the solution. The solution was made up of 200 mL with deionized water. The free amino group concentration was determined with reference to a calibration curve using l-serine (12.5–100 mg L^{-1}), since in OPA reactions serine shows a response close to the average response of amino acids. The degree of protein hydrolysis (DH%) was estimated according to the following equation:

$$DH\ \% = [NH_2\,(final) - NH_2\,(initial)] \times 100 / NH_2\,(acid) - NH_2\,(initial)]$$

where NH_2 (final) is the concentration of free amino groups in the digested sample after each phase, NH_2 (initial) is the concentration of free amino groups before digestion, and NH_2 (acid) is the total content of completely hydrolyzed sample in 6 N HCl at 110 °C for 24 h. All measurements were carried out at least in triplicate for each digesta.

2.10. SDS-PAGE Analysis of Protein Profiles

Denaturing gel analyses were carried out using gradient 4–12% Bis-Tris pre-cast gels (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions, with 2-N-morpholine-ethane sulphonic acid (NuPAGE MES, Invitrogen, Barcelona, Spain) as running buffer. Gels were stained using Colloidal Blue (Expedeon, Harston, UK). For accurate molecular weight

estimation, the unstained protein standard Mark12TM (Invitrogen, LC5677, Barcelona, Spain) was included in the gel with proteins in the range of 2.5 to 200 kDa.

2.11. Gel Filtration Analysis (SEC)

Molecular weight of the soluble fractions after each digestion phase was monitored by size exclusion chromatography (SEC). Samples were loaded onto a HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR column (flow rate of 0.3 mL per min) in 50 mM phosphate buffer containing

150 mM NaCl, pH 7.5. Three replicates per sample were analyzed. The column was calibrated by molecular weight standards, each in 2 mL buffer [bovine serum albumin (63.5 kDa) ovalbumin (48.1 kDa), chymotrypsinogen A (20.4 kDa), ribonuclease A (15.6 kDa), aprotinin (6.5 kDa), conalbumin (1.3 KDa).

2.12. Antioxidant Peptides Identification

Peptides after in vitro digestion were identified in the BF using liquid chromatography and mass spectrometry (nanoLC-MS/MS). The analysis was performed on a nanoLC (easy nanoLC II, Proxeon, now Thermo Scientific, West Palm Beach, FL, USA), directly connected to an Ion Trap Mass Spectrometer (Amazon Speed ETD, Bruker, Madrid, Spain), with a CaptiveSpray Source. Peptides separation was performed on a C18 column 75 µm × 15 cm, 3 µm, 100A (Acclaim PepMap100, Thermo Scientific, West Palm Beach, FL, USA) over a 180 min acetonitrile gradient from 5 to 30% B (solvent A: 0.1% formic acid in water; solvent B: 0.1% formic acid in acetonitrile) with a flow rate of 300 nl/min. The Ion Trap was set to analyze the survey scans in the mass range m/z 250 to 2500 in Enhanced Resolution MS mode (speed 8100 m/z/s), and the top 10 most intense ions in each duty cycle were selected for MS/MS in UltraScan mode (32,500 m/z/s). Fragmentation parameters: Active exclusion after 2 spectra and active release of 0.4 min, scan range: 50 m/z–2 × precursor.

Identification of the parental proteins for peptide sequences was done using the software ProteinScape (Bruker) and MASCOT v 2.7 (Matrix Science) search engine. Only peptide sequences with high confidence (>95%) were analyzed. Peptide sequences obtained were analyzed from BIOPEP-UWM, an online database of bioactive peptides (http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep, accessed on 10 July 2022). The BIOPEPUWM database of bioactive peptides contained a current number of 4485 bioactive peptides at the time of the sequence-based search [31]. Peptides not reported in the BIOPEP data base were evaluated by Peptide Ranker, an online tool that allows the user to predict the probability of a peptide having a biological activity (Bioware.ucd.ie). Theoretical bioactivity was expressed as

score values calculated from 0 to 1, with 1 being the most likely to be bioactive. Peptides with a score above 0.5 are considered to have a potential biological activity and were analyzed for antioxidant activity using the online tool AnOxPepre-1.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?AnOxPePred-1.0, accessed on 20 July 2022), including free radical scavenging (FRS) and metal-chelating activity (MCA) scores, with its predictions being from 0 (not antioxidant) to 1 (antioxidant) [32].

2.13. Statistical Analysis

The experimental results are expressed as the mean ± standard error (SE) of at least three replicates. The data obtained were analyzed by applying analysis of variance (oneway ANOVA) to study the effects of the in vitro digestion. LSD test was used to compare mean values and significant differences were established at $p < 0.05$. Statistical calculations were carried out using the StatGraphics Centurion XVI software version 16.1.18 (StatPoint Technologies Inc. Warrenton, VA, USA).

3. Results and Discussion

3.1. Nutritional Composition of the Colada Beverage

Beverages based on liquid whey mixed with fruit juices are a great way to use a by- product of the cheese industry which is full of nutrients. Composition of the main ingredient, the whey, depends on the origin of the milk, type of cheese, and the cheese processing method [33]. Based on pH, whey may be classified as acidic whey (pH < 5) or sweet whey (pH 6–7); since acidic pH may cause protein sedimentation due to heat treatment, sweet whey is considered more suitable as the raw material for the whey-based beverages [15].

The chemical composition of the whey beverage is depicted in Table 1. The Ecuadorian technical standard NTE INEN 2609 establishes the requirements for whey-based beverages, i.e., those whose main ingredient is whey and are intended for direct consumption (FAO, 2022). The protein content found in the *Colada* (1.29%) significantly exceeds the minimum percentage established in Ecuadorian regulations of 0.4%, which reinforce its nutritional value. The result is within the range found in the bibliography for whey beverages, which may vary from 0.94% in beverages prepared with hydrolyzed collagen, milk powder and sucrose [34] to 1.21–1.61% in traditional whey blended with fruit juices [35].

The *Colada* beverage showed an ash content of around 0.5%; this value, that provides an estimate of the minerals present in the beverage, was slightly higher than the average content observed for whey (0.25–0.4%, [36]). Whey is recognized as a source of valuable minerals, especially sodium and potassium, followed by calcium and magnesium [37]. Due to the addition of barley, the *Colada* beverage also provided high amounts of phosphorus, which may reinforce the mineral contribution to the diet.

Analysis of the amino acid content revealed that the proteins of the *Colada* are rich in essential amino acids, with the exception of valine and methionine (tryptophan was not determined) (Table 2).

Table 2. Amino acid composition of the whey-beverage (*Colada*).

Amino Acid	**mg/g *Colada***
Alanine	0.544 ± 0.057
Arginine	0.461 ± 0.147
Asx	1.190 ± 0.19
Cysteine	0.309 ± 0.126
Glx	2.496 ± 0.303
Glycine	0.344 ± 0.036
Histidine	0.286 ± 0.061
Isoleucine	0.623 ± 0.065
Leucine	1.089 ± 0.091
Lysine	0.903 ± 0.113
Metionine	0.230 ± 0.070
Phenilalanine	0.603 ± 0.107
Proline	0.993 ± 0.103
Serine	0.599 ± 0.066
Threonine	0.682 ± 0.062
Tyrosine	0.367 ± 0.064
Valine	0.659 ± 0.123

Values are mean ± SE (n = 3), expressed on a fresh matter basis. Asx: aspartic acid (Asp) and asparagine (Asn); Glx: glutamic acid (Glu) and glutamine (Gln). Cystein is measured as cysteic acid and methionine as methyl sulfone. Tryptophan was not determined due to its degradation after acid hydrolysis.

The major amino acids were glutamic, aspartic, leucine, proline and lysine. Methionine and histidine were the limiting amino acids. The amino acid composition of the beverage is mainly determined by its principal component, sweet whey. The amino acid composition of whey depends on the milk origin and on the stage of lactation that influences on the β-lactoglobulin/α-lactoalbumin ratio [38].

*3.2. Proteolysis and Peptide Release during In Vitro Digestio***n**

Once the nutritional composition of the Colada had been established, the beverage was digested, following the INFOGEST protocol in order to study the DH and the changes in the protein profile. A negative control of the digestion was performed, with no enzymes to confirm there is no protein autolysis during the process (data not shown). The proteolysis started after the gastric phase with a 14 ± 2% DH and was much higher after the intestinal phase, with a 57.69 ± 3% DH measured by OPA. The protein profile after in vitro digestion was studied by SDS-PAGE (Figure 1) and exclusion molecular chromatography (SEC) (Figure 2). As expected, there was no protein degradation after the oral phase being the protein profile identical to the undigested *Colada* (lanes 2 and 3). Proteolysis started with the action of pepsin during the gastric digestion (lane 4). Most proteins of a molecular weight higher than 24 KDa were completely digested after 2 h. Two major protein bands at an apparent molecular weight around 21 and 14 KDa were observed, corresponding to β-lactoglobulin and α-lactoabumin. These two proteins have a globular structure which prevents the access of enzymes to potential cleavage sites and have been described as resistant to the action of the pepsin [39,40]. The great number of proteins of apparent molecular weight higher than 20 KDa, observed in the SDS-PAGE after the complete in vitro digestion, correspond to pancreatin background (lane 5). Most of the proteins are digested, and only small peptides are present after the digestive process.

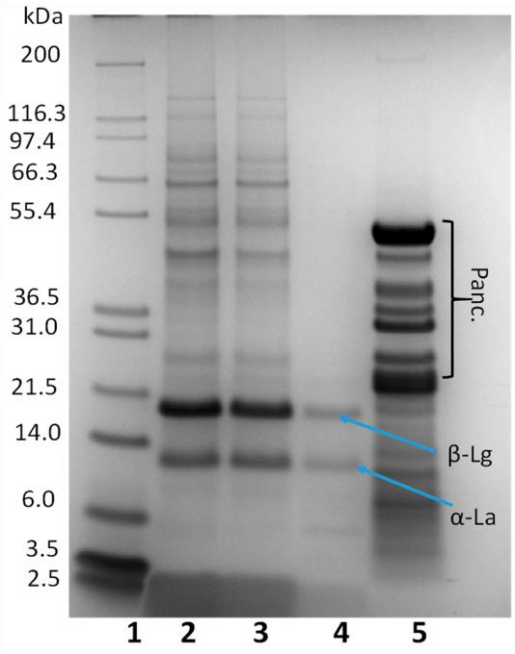


Figure 1. Protein profile of the whey-beverage (*Colada*) before and after in vitro digestion using an SDS-PAGE (4–12%) gel. Lane 1: molecular markers; Lane 2: *Colada* before digestion; Lane 3: oral phase; Lane 4: gastric phase; Lane 5: intestinal phase. Significant protein bands are denoted as follows:

SA: serum albumin (66 kDa); β-Lg: β-lactoglobulin (18.3 kDa); α-La: α-lactalbumin (14.2 kDa); Panc. refers to proteins present in Pancreatin.

In order to have a better picture of the peptide profile after digestion, SEC was used, and a control sample (digestion without sample) was ran and subtracted from the chromatogram of the completely digested sample to reduce the enzyme background observed in SDS-PAGE. The SEC chromatograms give valuable information on size distributions of proteins, large peptides, and smaller protein degradation products. The SEC profile of the *Colada* (Figure 2) indicated that the main difference in the oral phase (part A) compared to the gastric phase (part B) was observed in the range of 40–13 KDa (130–180 mL of elution volume). The two main peaks observed at 145 mL and 165 mL probably corresponded to β-lactoglobulin and α-lactoalbumin that were still undigested in the gastric phase, as it was observed in the SDS-PAGE. Although the digestion process starts in the gastric phase, the great majority of proteins were digested in the intestinal phase (part C). After this phase there was a great increase in the intensity in the peaks corresponding to peptides ≤6 KDa (240 mL of elution volume) and all the proteins with an apparent molecular weight ≥40 KDa were hydrolyzed into smaller peptides/free aa.

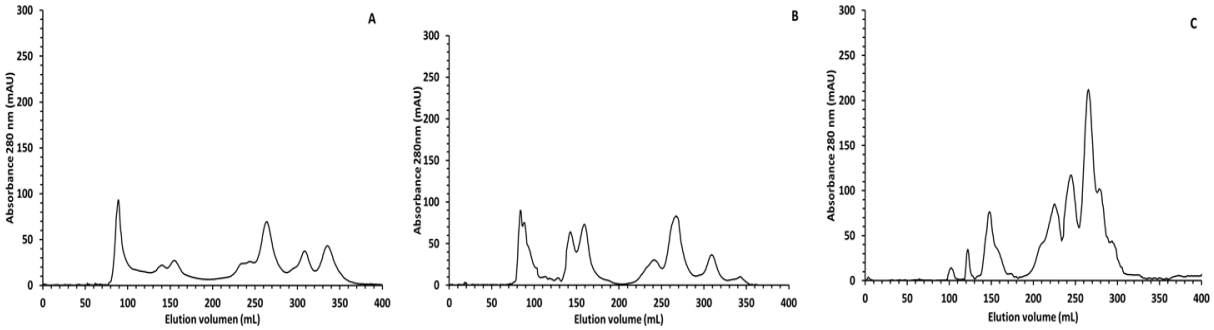


Figure 2. Size exclusion chromatography profile of protein and peptides after different phases of digestion of the whey-beverage (*Colada*). (**A**) Oral phase, (**B**) gastric phase, (**C**) intestinal phase (complete digestion).

3.3. Antioxidant Properties

Currently, it is widely accepted that the effect of any dietary component is defined by the bioavailable amount rather than the dose ingested, and that bioaccessibility constitutes a prerequisite and the most influential factor of bioavailability [41]. Thus, determination of bioaccessibility in vitro reflects reasonably well bioavailability in vivo [42].

The digestive process had a general positive effect on the antioxidant properties of the *Colada*, represented by significant increases of around 2 fold on ABTS and FRAP assays after digestion, although a slight decline was observed in DPPH values (Table 3). Moreover, a strong increment of TPC was observed (>6 fold).

Table 3. Antioxidant activity by ABTS (2,2´-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) and FRAP (ferric reducing antioxidant power), and total phenolic content (TPC) of the whey-beverage (*Colada*) before and after the in vitro digestion.

	Before digestion	After digestion		Fold increase
		Bioaccessible fraction	Residual fraction	
ABTS (mM trolox Eq. /kg)	0.76 ± 0.001 b	1.21 ± 0.04 c	0.15 ± 0.001 a	1.79
DPPH (mM trolox Eq. /kg)	0.51 ± 0.01 c	0.41 ± 0.001 b	0.05 ± 0.004 a	0.90
FRAP (mM trolox Eq. /kg)	0.74 ± 0.01 b	1.66 ± 0.07 c	0.05 ± 0.01 a	2.31
TPC (mM galic acid Eq./kg)	0.46 ± 0.02 a	2.42 ± 0.12 b	0.58 ± 0.04 a	6.52

Values are mean ± SE (n = 4). Means values in each row with different letters are significantly different (one-way ANOVA and LSD test, $p < 0.05$).

Both antioxidant properties and polyphenols post digestion were mainly located in the bioaccessible fraction (90–97% of ABTS, DPPH and FRAP; 80% of polyphenols, Figure 3), which included compounds released from the food matrix that are potentially absorbable from the lumen. In the residual fraction, usually discarded when studying bioavailability of bioactive compounds, there still remained low but appreciable amounts of antioxidant activity (10% of radical scavenging ability) and phenolic compounds (20%). These may exert antioxidant and anti-inflammatory local action [43] or be metabolized by the intestinal microbiota in potentially absorbable complexes [44].

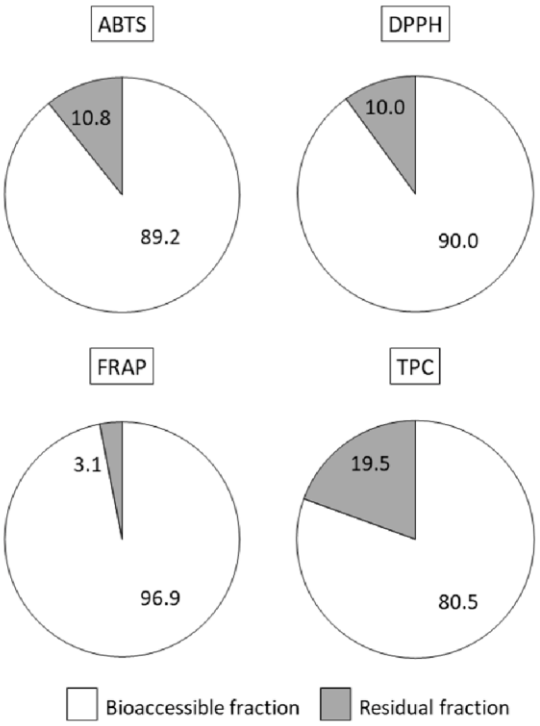


Figure 3. Contribution of the bioaccessible and residual fractions (%) to the total ABTS, DPPH, FRAP and total polyphenols (TPC) recovered after in vitro digestion of the whey beverage (*Colada*).

Usually, antioxidant properties are measured in vitro by the ability to transfer hydrogen atoms or electrons to an oxidant, and ABTS, DPPH and FRAP methods are commonly applied with this aim. However, the use of cell model systems, such as the Caco-2 intestinal cell line, is recommendable to better assess the in vivo antioxidant potential of dietary compounds [37]. Preincubating Caco-2 cells for 2 h with the BF of the *Colada* beverage significantly reduced ROS generation in basal conditions (Figure 4A). In addition, a protective effect against induced oxidative stress (25% of decrease in ROS production) was observed (Figure 2B), supporting the antioxidant activity of the *Colada* digest at the cell level.

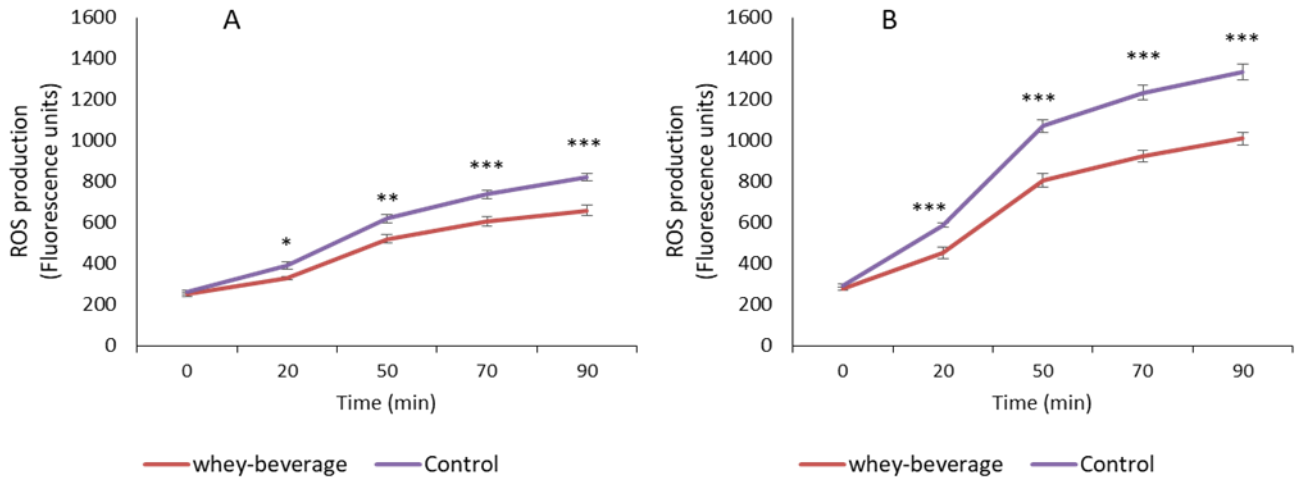


Figure 4. ROS generation expressed as fluorescence units during 90 min (mean ± SE) in Caco-2 cells pre-incubated with BF of the whey beverage compared with control cells incubated with culture medium. (A) Basal conditions. (B), oxidative stress induced with t-BOOH 10 mM. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Our results showing the increasing release of bioactive antioxidant compounds during digestion agree with those previously observed in oils [21,27] and other foods [45], although disappointing data have also been observed in coffee extracts [46]. The antioxidant behavior of dietary components during digestion seems to be strongly dependent on the food matrix and the kind of antioxidant compounds; phytochemicals (carotenoids and polyphenols, among others) from fruit and vegetables are traditionally designed as the main contributors [47]. In the last years, whey-derived peptides with oxidation inhibitory activities have received special attention [37,48]. Although antioxidant properties of whey peptides and their hydrolysates have been deeply studied, little information exists on the effect of the digestion process and their interactions with other components when whey is included as a part of a complex food or beverage. Previous studies [48] demonstrated that antioxidant properties of isolated bovine whey proteins, tested by ABTS, FRAP and ORAC methods, significantly increase after simulated gastrointestinal digestion, α-lactalbumin having the highest antioxidant post-digestion activity. Therefore, the increasing radical scavenging ability (by ABTS) and ferric reducing power found in the present assay could be at least partly due to the digested whey proteins of the *Colada*, mainly α-lactoalbumin, as indicated by the results obtained by SDS-PAGE.

Interestingly, in Caco-2 cells, isolated digested whey proteins were unable to reduce induced ROS formation [8], although were effective in HT-29 cells and for stimulating antioxidant

enzymes. Thus, in our study, other food components of the *Colada* digest could have contributed to the protecting ability against radical generation observed in Caco-2 cells.

It has been shown that combination of whey with additional antioxidant ingredients (vitamin B12, astaxanthin and plant extracts) improves the bioactivity of the formulated beverages [49], and that values of antioxidant activity in whey-based drinks added with fruit and vegetables are positively correlated with the polyphenol content [17]. Results of the present assay are comparable with those found for homemade beverages prepared with 50% whey and with fruits (pear, cherry and banana) and vegetables (carrot and parsley) added, in which DPPH and ORAC values were around 0.78 and 0.71 mM trolox Eq./kg, respectively [17]. Therefore, it seems clear that antioxidant properties of the intact *Colada* were due, in addition to the whey proteins, to antioxidant compounds, especially polyphenols, provided by barley and Maracuyá [18,19]. Moreover, polyphenol extracts of Maracuyá have shown preventive effects against induced barrier dysfunction in Caco-2 cells by increasing transepithelial electrical resistance [50], a reliable indicator of the normal and functional state of cell membranes which is linked to reducing level of oxidative stress and ROS accumulation [51].

However, these antioxidant properties may be altered during gastrointestinal transit. Interestingly, it has been reported that antioxidant activity after simulated digestion increases in whey beverages but decreases when drinks were added with additional antioxidant compounds [49]. It seems that adding carotenoids and polyphenols interact with the digestibility of whey proteins, reducing the release of antioxidant peptides and amino acids [18] which, in turn, decrease the antioxidant activity of the formulation [49]. This fact would explain the decreasing value of DPPH post digestion found in the *Colada* beverage. However, the possible negative influence of antioxidant phytochemicals seems to be counteracted with the high antioxidant potential of the whey proteins, since whey was the major component of the formulation, leading to strongly increased ABTS and FRAP values. On the other hand, discrepancies between different antioxidant assays (ABTS and FRAP) with DPPH have been previously observed [48].

The digestive process also produces structural transformations in food polyphenols, mainly due to changes of pH and interactions with other compounds, which may alter their bioaccessibility [52]. Anthocyanins, the major polyphenols of Maracuyá, are highly stable during simulated gastric digestion but are degraded to different catabolic products during the intestinal phase [53]. Therefore, the large increase found in TPC of the *Colada* BF could be due to the different chemical structures of the existing polyphenols and their biotransformation

during digestive conditions. In addition, the fact that the Folin–Ciocalteu reagent, used for the determination of polyphenolic compounds, could react with amino acids from whey digest leading to overestimation of results [17], cannot be discarded.

3.4. The Lipid Fraction

The type of dietary fatty acids (FA) affects the physiological body response; saturated FA (SFA) have been related to adverse health effects, whereas unsaturated fatty acids, especially monounsaturated (MUFA) and n3 polyunsaturated (PUFA), are thought to be protective. They reduce the risk of cardiovascular and inflammatory diseases, although PUFA are more susceptible to being oxidized [54].

The FA profile and the related indexes of the *Colada* beverage before and after the in vitro digestion (BF) are shown in Table 4 and Figure 5, respectively.

Table 4. Fatty acid profile (%) of the whey-beverage (*Colada*) before and after the in vitro digestion.

Fatty acid	Before digestion	After digestion (bioaccessible fraction)	Fold increase
C8:0	0.02 ± 0.001 a	0.07 ± 0.02 b	3.71
C10:0	0.68 ± 0.007 a	2.14 ± 0.05 b	3.15
C12:0	1.81 ± 0.03 a	1.95 ± 0.02 b	1.07
C14:0	9.82 ± 0.11 b	5.64 ± 0.11 a	0.58
C14:1	0.78 ± 0.004 a	1.22 ± 0.003 b	1.57
C16:0	31.6 ± 0.12 b	15.3 ± 0.03 a	0.48
C16:1	1.83 ± 0.03 a	3.39 ± 0.06 b	1.85
C17:0	1.04 ± 0.004 b	0.28 ± 0.008 a	0.27
C17:1	0.59 ± 0.05 a	2.50 ± 0.03 b	4.25
C18:0	17.3 ± 0.05 b	7.23 ± 0.03 a	0.42
C18:1 n9	27.6 ± 0.24 a	45.4 ± 0.40 b	1.68
C18:1 n7	0.50 ± 0.003 a	0.96 ± 0.01 b	1.93
C18:2 n6	2.97 ± 0.04 a	8.91 ± 0.009 b	3.00
C18:3 n6	0.02± 0.003 a	0.04 ± 0.009 b	2.60
C18:3 n3	0.84 ± 0.003 a	1.57 ± 0.005 b	1.88
C20:0	0.30 ± 0.004 b	0.10 ± 0.001 a	0.32
C20:3 n6	0.04 ± 0.001	0.08 ± 0.023	2.25
C20:3 n3	0.08 ± 0.02	0.11 ± 0.004	1.47
C20:4 n6	0.06 ± 0.001 a	0.33 ± 0.02 b	5.46
C20:5 n3	0.05 ± 0.005 a	0.08 ± 0.006 b	1.58
C21:0	1.51 ± 0.007 a	2.42 ± 0.01 b	1.60
C22:4 n6	0.008 ± 0.002 a	0.04 ± 0.005 b	4.67
C22:5 n3	0.09 ± 0.001 a	0.17 ± 0.005 b	1.99
C22:6 n3	0.01 ± 0.001	0.02 ± 0.001	1.73

Values are mean ± SE (n = 3). Means values in each row with different letters are significantly different (one-way ANOVA and LSD test, $p < 0.05$).

Before digestion, the major FA of the *Colada* was palmitic acid (C16:0, 32%), followed by oleic (C18.1n9, 28%) and stearic acid (C18:0, 17%); this is in agreement with the main FA observed in whey [55] and in milk fat [56]. Total SFA represented the major fraction of the undigested sample (65%), whereas MUFA and PUFA contributed 31 and 4%, respectively. After digestion, significant changes in the FA profile of the beverage were observed: SFA were drastically reduced nearly to the half, whereas total MUFA and PUFA increased approximately 2- and 3-fold, respectively, compared with values pre-digestion.

Compositional studies of whey and whey beverages have been mainly focused on the protein components, and little attention has been given to the lipid fraction, probably due to its minority presence in the final product. Moreover, there is a lack of information concerning the FA profile of whey or whey-based drinks after the digestive process and the subsequent bioavailability. Santillo et al. [57] showed that the percentage distribution of FA in in vitro-digested milk from different species did not reflect the patterns of the corresponding milk sources, which is according with our results. This finding might be explained by different reasons. On the one hand, Ca may affect FA bioaccessibility since, at pH intestinal conditions, it reacts with saturated long chain FA (>14 C) and forms the corresponding insoluble soaps, which significantly reduces their availability [56]. Therefore, the high Ca level of the *Colada* could have induced the precipitation of myristic (C14:0), palmitic (C16:0), and stearic (C18:0) acid as non-soluble soaps in the RF, thus decreasing their levels in the soluble fraction.

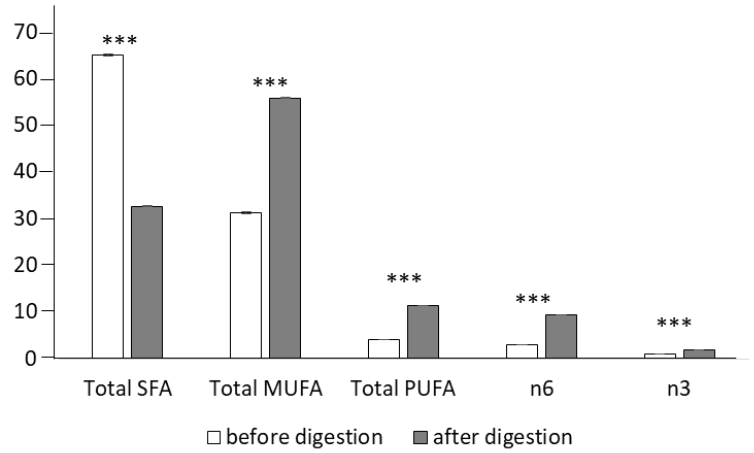


Figure 5. Fatty acid indexes before and after the in vitro digestion of the whey-beverage; SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids. Asteriscs means significant differences (one-way ANOVA and LSD test, *** $p < 0.001$).

On the other hand, the digestion may induce lipid oxidation, mainly due to acidic pH in the gastric fluid, the disintegration of the food matrix or the action of digestive enzymes [58]. Oxidation of PUFA led to the formation of lipid oxidation by-products and subsequent decrease of PUFA bioaccessibility, especially n3 [59]. However, after digestion of the *Colada*, higher levels of n6 and n3 in the BF were observed. This may be attributed to the high level of antioxidant compounds present in the formulation; specifically, it has been suggested that the addition of polyphenols during simulated digestion limits the lipid oxidation and promotes the bioavailability of non-oxidized PUFA [59]. Moreover, the food matrix also may impact on the release of FA during in vitro intestinal digestion. In this line, it has been shown that adding barley to a meal increases the release of long-chain PUFA and their percentage contribution to the total FA in the digest [60]. Therefore, the ingredients added to the whey beverage *Colada*, such as barley and Maracuyá polyphenols, could have contributed to increase the PUFA proportions in the BF after the in vitro digestion.

After digestion of *Colada*, strong increases in C18:1n9 and C18:2n6 were also observed. These FA are of interest in human nutrition, since oleic acid has noticeable health effects in preventing degenerative diseases, and linoleic acid an essential FA precursor of other important long chain FA [61]. Moreover, substitution of dietary saturated fat by oleic acid and/or PUFA produces cardiovascular benefits by reducing blood lipids [61].

Hence, the in vitro digestion of the *Colada* induces positive transformation in the composition and bioaccessibility of the FA, which could be at least partly due to the presence of antioxidant compounds provided by its different ingredients.

3.5. Peptide Identification with Antioxidant Potential Activity

Since antioxidant properties of the *Colada* could be also determined by the protein composition, we analyzed the peptides released after the in vitro digestion. Bioactive peptides are encrypted amino acid sequences inactive in the native protein that could be released through different processes including gastrointestinal digestion [62]. Ingested proteins from the *Colada* were hydrolyzed by proteinases present in the gastrointestinal tract that are used in the in vitro digestion process to produce peptides of various sizes, as shown in Figure 2. To identify peptides potentially responsible for the antioxidant activity observed in the digested sample, the bioaccesible fraction was analyzed by NanoLC-MS/MS. A total of 251 peptides of different lengths from 5 to 25 aminoacids were identified. The peptides released after the digestion of the *Colada* beverage not only originated from whey proteins but also from barley (Hordeon

Vulgare) used in the formulation. Surprisingly, many of the peptides identified were fragments of β-casein normally not present in sweet whey. The presence of casein peptides in the digestion of the beverage made using sweet whey, suggests the leakage of casein into the whey fraction in the process of cheese making, a fact that has been previously described [8]. Peptides from κ-casein were also identified and the longer peptides were obtained from α-lactoalbumin and β-lactoglobulin. These last proteins are described as the least digestible proteins from whey. The sequences of the generated peptides were analyzed through BIOPEP a database of biologically active peptide sequences [31]. The peptides analyzed showed homology with several bioactive peptide sequences, whose activities include ACE inhibition, DDP-IV enzyme inhibition, antithrombotic, antibacterial and antioxidant effects. Here we wanted to highlight those peptides with antioxidant activity (Table 5).

Antioxidant peptides derived from milk proteins have been mostly associated with bovine casein [63,64]. The in vitro digestion of the *Colada* produced 11 peptides with sequences described as antioxidant activity from β-casein (Table 5). The antioxidant activity of casein derived peptides has been extensively studied and described [63]. One of the peptides identified, YPFPGPI, which shares sequence with other peptides found, has been recently described as a potent antioxidant [65]. Although antioxidant peptides derived from milk proteins have been mostly associated with bovine casein, hydrolysis of whey proteins may also result in the production of antioxidant peptides [63,64]. In our digested beverage we have identified 18 peptides from β-lactoglobulin, all with different biological activities but only 7 with potential antioxidant activity (Table 5). β-lactoglobulin is the major whey protein and biological active peptides derived from this protein is an area of intense research [66,67]. Four of the longer peptides identified (QTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASD, VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSA, GLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLL, DIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDA) contain in their sequence previously described potent antioxidant peptides (WYSLAMAASDI, WYSLAMA, WYSLAM, WYSLA, WYSL, WYS, and WY). One of these peptides, WYSLA-MAASDI, possessed higher radical scavenging activity than butylated hydroxyanisole (BHA), a potent antioxidant used in the food industry [68]. Only two of the sequenced peptides, GLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLL and DIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDA have a relatively high enough FRS score, predicted through AnOxprep-1.0, to be considered as potential antioxidant peptides. The presence of tyrosine and tryptophan could determine its potent activity, as these two amino acids have been reported to be the main contributors to the peroxyl radical-scavenging activity of food-derived

peptides [69]. All of these peptides could still be considered as potential antioxidants since they could be further hydrolyzed by peptidases present in the intestinal brush border. The action of the enzymes present in the brush border is very intense and could release new peptides available for absorption with important biological activity [70,71].

Table 5. Peptides with antioxidant activity identified in the bioaccessible fraction of the digested whey beverage (*Colada*).

Parental Protein	Identified Peptide Sequence	BIOPEP Identified Peptide	Peptide ID	Location
β-**Casein**	LPLPL	LPL	10000	[1–5]
	YQEPV	YQEP	7878	[1–4]
	YPFPGPI	YPFPGPI	10050	[1–7]
	ELNVPGEIa	EL	7888	[1,2]
	VYPFPGPI	VY	8224	[1,2]
		YPFPGPI	10050	[2–8]
	VYPFPGPIP	VY	8224	[1,2]
		PFPGPI	10050	[2–8]
		PFPGPIP	10062	[2–9]
	LVYPFPGPI	VY	8224	[2,3]
		YPFPGPI	10050	[3–9]
	SLVYPFPGPI	VY	8224	[3,4]
		YPFPGPI	10050	[4–10]
	PPTVMFPPQSVLSLSQSKV	SLV	9879	[10–12]
	QSLVYPFPGPIHNSLPQNIPPL	VY	8224	[4,5]
		YPFPGPI	10050	[5–11]
β-**lactoglobulin**	QTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASD	WY	7898	[15,16]
		WYS	7900	[15–17]
		WYSL	7901	[15–18]
		WYSLA	7902	[15–19]
		WYSLAM	7903	[15–20]
		WYSLAMA	7905	[15–21]
		TW	8459	[14,15]
		GTW	9165	[13–15]

	VAGTWY	9435	[11–16]
DIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDA	WYSLAMAASDI	7891	[9–19]
	WY	7898	[9,10]
	WYS	7900	[9–11]
	WYSL	7901	[9–12]
	WYSLA	7902	[9–13]
	WYSLAM	7903	[9–14]
	WYSLAMA	7905	[9–15]
	TW	8459	[8,9]
	GTW	9165	[7–9]
	VAGTWY	9435	[5–10]
VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSA	WYSLAMAASDI	7891	[11–21]
	WY	7898	[11,12]
	WYS	7900	[11–13]
	WYSL	7901	[11–14]
	WYSLA	7902	[11–15]
	WYSLAM	7903	[11–16]
	WYSLAMA	7905	[11–17]
	TW	8459	[10,11]
	GTW	9165	[9–11]
	VAGTWY	9435	[7–12]
TMKGLDIQKVAGTW	TW	8459	[13,14]
	GTW	9165	[12–14]
LDTDYKKYLLFCMENSAE	TDY	8445	[3–5]
	FC	9342	[11,12]
	YLL	9349	[8–10]
	LFC	9352	[10–12]
	FCM	9353	[11–13]
	CME	9354	[12–14]
	DYK	9364	[4–6]

	KKY	9365	[6–8]
	KYL	9366	[7–9]

The second most important milk protein, α-lactalbumin, is also known to be an important source of essential amino acids that present bioactive peptides encrypted in their sequence [8]. Ten peptides were identified from α-lactalbumin, all with previously described biological activities but none of them noted as antioxidant. Previous studies have shown that the antioxidant activity of α-lactalbumin increases after hydrolysis with alcalase and even more when this hydrolysate was subjected to a gastrointestinal digestion in vitro [72,73]. Very recently the sequence of these peptides has been reported [74]. Five of the peptides identified in our samples, LDDDL, LDDDLTDD, DDDLTDDI, LDDDLTDDI and DDDLTDDIM are fragments of the peptides previously identified as potent antioxidants (Table 6). The peptide VSLPE is a fragment of the antioxidant peptide VSLPEW sequenced earlier [75].

Table 6. Peptides identified from alpha-lactoalbumin.

Peptide identified from Alpha-lactoalbumin	Free Radical Scavenging score	Chelating score	Peptide reported in literature
CTTFHTSGYDTQAIVQNNDS	0.357	0.211	YDTQA[1]
TTFHTSGYDTQAIVQNNDSTEYG	0.325	0.236	
GVSLP	0.376	0.237	
LDKVG	0.315	0.210	
VSLPE	0.402	0.267	VSLPEW[1]
LDDDL	0.320	0.237	
LDDDLTDD	0.276	0.256	DKFLDDDLTDDIM, KFLDDDLTDDIM, IWCKDDQNPH[2]
DDDLTDDI	0.283	0.268	
LDDDLTDDI	0.274	0.247	
DDDLTDDIM	0.273	0.270	

References in the literature 1: Sadat et al., [75]; 2: Báez et al., [74].

Despite the fact that α-lactoalbumin has been described as a potent antioxidant [12,69,75] only a few peptides have been described and none of them obtained after gastrointestinal digestion. Previous studies on peptides from this protein obtained by hydrolysis with Corolase PP®, a complex mixture of enzymes similar to pancreatin, proved its antioxidant activity but did not

purify or identify any of the responsible peptides in the hydrolyzed fraction [69]. It is well known that the potential antioxidant activity of the peptides depends on the abundance of certain amino acids and the order in the sequence. Basic and acidic amino acid residues can act as hydrogen donors, and hydrophobic residues facilitate access to hydrophobic radical species. Hydrophobic amino acids such as Ala (A), Pro (P), Val (V), Ile (I), Leu (L), Phe (F), Tyr (Y) can contribute on antioxidant properties [12]. All the peptides found from α lactalbumin have leucine present in its sequence, and could be in theory considered potential antioxidants, but the predictions using the Anoxprep-0.1 tool gives very low values for these peptides (Table 6). From our results, we can conclude that the peptides obtained after digestion of α-lactalbumin in the Colada need further investigation in order to establish their antioxidant potential.

Twenty-three peptides of barley proteins were also identified in our samples (Table 7).

Table 7. In silico characterization of peptides from barley identified in the bioaccessible fraction of digested whey beverage (Colada). Antioxidant activity prediction by AnOxPrep.

Parental Protein	Peptide Sequence	Peptide Ranker score	Free Radical Scavenging score	Chelating score
B1-hordein	PQQPFPPQQPF	0.88	0.52	0.35
B1-hordein	KPFPQQP	0.62	0.42	0.30
B1-hordein	PQQPFPPQQP	0.71	0.52	0.34
B1-hordein	PQQPPFG	0.92	0.51	0.27
B1-hordein, B3-hordein	LPQIPE	0.31		
B1-hordein, B3-hordein	QLPQIPEQ	0.22		
B1-hordein, B3-hordein	LPQIPEQ	0.21		
B1-hordein, B3-hordein, C-hordein	PQQPIPQ	0.51	0.46	0.27
B1-hordein, B3-hordein, C-hordein	PQQPIP	0.66	0.46	0.27
B1-hordein, C-hordein, Gamma-hordein	PQQPFPQ	0.75	0.48	0.28
B1-hordein, C-hordein, Gamma-hordein	PQQPFP	0.9	0.48	0.26
B3-hordein	QPFPQQP	0.69	0.45	0.32
B3-hordein	QVQIP	0.17		
C-hordein	PQQPLP	0.73	0.46	0.27
C-hordein	PQQPLPQ	0.52		

C-hordein	SQQPIPQ	0.46		
C-hordein	QPLPQPQ	0.48		
C-hordein, B3-hordein	QPQPFP	0.92	0.48	0.28
C-hordein, B3-hordein	QPQPFPQ	0.8	0.48	0.29
Gamma-hordein,C-hordein	QPFPQP	0.87	0.47	0.31
Gamma-hordein,C-hordein	PQQPFPQQPQQPFP	0.66	0.51	0.33
Gamma-hordein	HQFPQPT	0.58	0.47	0.29
Gamma-hordein	FNPSG	0.75	0.41	0.28

None of these peptides were reported as antioxidant in the BIOPEP database, probably because it is a protein source not as well studied as milk. In order to establish the potential bioactivity of the sequenced peptides, these were analyzed using PeptideRanker. This bioactive peptide predictor provides a computational prediction, assigning scores between 0 and 1 to peptides based on the probability of being bioactive from the N-to-1 neural network (N1-NN). This is computed based on the peptide primary sequence trained from different bioactive peptide databases. Any peptide possessing a score above the 0.5 threshold is labeled as bioactive [76]. Sixteen of these peptides had a score above 0.5 and three of them, PQQPFP, PQQPPFG, QPQPFP, with a very high probability of being biologically active with a score above 0.9. Those peptides labelled as potentially bioactive were analyzed for their potential antioxidant activity using the Anoxprep-0.1 tool (Table 7). All of the peptides showed a moderate probability of being antioxidants, but this will require further investigation.

4. Conclusions

The present study represents an effort to create a whey-based functional food and is in accordance with the Sustainable Development Goals and the circular economy concept. Findings of the present study provide important insights into the potential antioxidant value of a sweet whey-based beverage, prepared by adding fruits (Maracuyá) and cereals (barley). Our results show that the digestive process stimulated the antioxidant properties of the beverage, and that the bioaccessible fraction obtained afterwards in vitro digestion was even able to prevent the induced ROS generation in intestinal cultured cells. Not only bioactive compounds resulting from the digestion of the sweet whey, but also from Maracuyá and barley, seem to contribute to the high antioxidant potential of the *Colada* beverage. A total of 251 peptides of

5–25 amino acids were identified after the digestion process; among them, 18 peptides originated from whey proteins (11 peptides from βcasein and 7 from β-lactoglobulin) and had a well-established antioxidant activity, but also 16 peptides from barley proteins were detected as potential antioxidants. We may conclude that the *Colada* beverage could be a valuable food with economic and nutritional advantages, since it may be a useful tool for profiting from a cheese by-product, many times discarded, causing contaminant problems and at the same time serving as a source of bioactive compounds with antioxidant properties.

Supplementary Materials: Table S1, Discriminant sensory analysis of different formulations of Colada; Table S2, Hedonic evaluation of Colada (15% Maracuyá juice) by consumers. Figure S1. Chromatogram (GC) of fatty acid methyl esters (FAME) of the whey-beverage (Colada) before the in vitro digestion. Figure S2. Chromatogram (GC) of fatty acid methyl esters (FAME) of the whey-beverage (Colada) after the in vitro digestion (bioaccessible fraction). Figure S3. Chromatogram (HPLC) of amino acids of the whey-beverage (Colada) (acid hydrolysis). Figure S4. Chromatogram (HPLC) of amino acids of the whey-beverage (Colada) (performic oxidation).

Author Contributions: Conceptualization, V.E.G.-C., I.S. and R.O.; methodology, R.O., Z.P., A.H., I.R. and I.S.; software, I.S. and R.O.; formal analysis, R.O., Z.P., A.H., I.R. and I.S.; investigation, V.E.G.-C., I.S. and R.O.; funding acquisition, V.E.G.-C., I.S. and R.O.; writing—original draft preparation, V.E.G.-C., I.S. and R.O.; writing—review and editing, I.S. and R.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported with funding of the Spanish National Research Council (CSIC, Spanish Government) (Reference 202140E009). This work is part of the doctoral thesis of Victoria García-Casas, student from the Official Doctoral Program "Nutrition and Food Sciences" of the Granada University, who received a doctoral scholarship from the University of Guayaquil.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article or supplementary material.

Acknowledgments: We are grateful to the DIPROLAC center of Guayas Province (Ecuador) from providing the sweet whey and to the proteomics Facility of Instituto Lopez Neyra (CSIC-Granada, Spain) for carrying out the peptide analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Zandona, E.; Blažić, M.; Režek Jambrak, A. Whey Utilisation: Sustainable Uses and Environmental Approach. Food Technol. Biotechnol. 2021, 59, 147–161, doi:10.17113/ftb.59.02.21.6968.
2. Prazeres A.R.; Carvalho, F.; Rivas, J. Cheese whey management: A review. Journal of Environmental Management 2012, 110, 46-46, doi:10.1016/j.envman.2012.15.018.
3. Ryan, M.P.; Walsh, G. The biotechnological potential of whey Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. 2016, 15, 479–498, doi.org/10.1007/s11157-016-9402-1.
4. Martín-del-Campo, S.T.; Martínez-Basilio, P.C.; Sepúlveda-Álvarez, J.C.; Gutiérrez-Melchor, S.E.; Galindo-Peña, K.D.; Lara-Domínguez, A.K.; Cardador-Martínez, A. Production of Antioxidant and ACEI Peptides from Cheese Whey Discarded from Mexican White Cheese Production. Antioxidants 2019, 8, 158, doi:10.3390/antiox8060158.
5. Corrochano, A.R.; Sariçay, Y.; Arranz, E.; Kelly, P.M.; Buckin, V.; Giblin, L. Comparison of Antioxidant Activities of Bovine Whey Proteins before and after Simulated Gastrointestinal Digestion. J. Dairy Sci. 2019, 102, 54–67, doi:10.3168/jds.2018-14581.
6. Krunic, T.; Rakin, M.; Bulatovic, M.; Zaric, D. Chapter 9 - The Contribution of Bioactive Peptides of Whey to Quality of Food Products. In Food Processing for Increased Quality and Consumption; Grumezescu, A.M., Holban, A.M., Eds.; Handbook of Food Bioengineering; Academic Press, 2018; pp. 251–285 ISBN 978-0-12-811447-6.
7. Bjørklund, G.; Chirumbolo, S. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Daily Nutrition and Human Health. Nutrition 2017, 33, 311–321, doi:10.1016/j.nut.2016.07.018.
8. Corrochano, A.R.; Arranz, E.; De Noni, I.; Stuknytė, M.; Ferraretto, A.; Kelly, P.M.; Buckin, V.; Giblin, L. Intestinal Health Benefits of Bovine Whey Proteins after Simulated Gastrointestinal Digestion. J. Funct. Foods 2018, 49, 526–535, doi:10.1016/j.jff.2018.08.043.
9. Castro, R.J.S. de; Sato, H.H. Comparison and Synergistic Effects of Intact Proteins and Their Hydrolysates on the Functional Properties and Antioxidant Activities in a Simultaneous Process of Enzymatic Hydrolysis. Food Bioprod. Process. 2014, 92, 80–88, doi:10.1016/j.fbp.2013.07.004.
10. Adjonu, R.; Doran, G.; Torley, P.; Agboola, S. Screening of Whey Protein Isolate Hydrolysates for Their Dual Functionality: Influence of Heat Pre-Treatment and Enzyme Specificity. Food Chem. 2013, 136, 1435–1443, doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.053.

11. Zhang, Q.X.; Ling, Y. F.; Zhang,L.; Yu,H.X.; Kamau,S.M.; Lu,R.R. Protective Effect of Whey Protein Hydrolysates against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress on PC12 Cells | SpringerLink Available online: https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-012-1017-1 (accessed on 29 July 2022).
12. Mann, B.; Kumari, A.; Kumar, R.; Sharma, R.; Prajapati, K.; Mahboob, S.; Athira, S. Antioxidant Activity of Whey Protein Hydrolysates in Milk Beverage System. J. Food Sci. Technol. 2015, 52, 3235–3241, doi:10.1007/s13197-014-1361-3.
13. Xu, R.; Liu, N.; Xu, X.; Kong, B. Antioxidative Effects of Whey Protein on Peroxide-Induced Cytotoxicity. J. Dairy Sci. 2011, 94, 3739–3746, doi:10.3168/jds.2010-3891.
14. O'Keeffe, M.B.; FitzGerald, R.J. Antioxidant Effects of Enzymatic Hydrolysates of Whey Protein Concentrate on Cultured Human Endothelial Cells. Int. Dairy J. 2014, 36, 128–135, doi:10.1016/j.idairyj.2014.01.013.
15. Tallapragada, P.; Rayavarapu, B. Recent Trends and Developments in Milk-Based Beverages; Grumezescu, A.M., Holban, A.M., Eds.; Woodhead Publ Ltd: Cambridge, 2019; Vol. 9, pp. 139–172; ISBN 978-0-12-815711-4.
16. Guneser, O.; Hosoglu, M.I.; Guneser, B.A.; Yuceer, Y.K. Engineering of Milk-Based Beverages: Current Status, Developments, and Consumer Trends; Grumezescu, A.M., Holban, A.M., Eds.; Woodhead Publ Ltd: Cambridge, 2019; Vol. 9, pp. 1–37; ISBN 978-0-12-815711-4.
17. Purkiewicz, A.; Pietrzak-Fiećko, R. Antioxidant Properties of Fruit and Vegetable Whey Beverages and Fruit and Vegetable Mousses. Molecules 2021, 26, 3126, doi:10.3390/molecules26113126.
18. He, X.; Luan, F.; Yang, Y.; Wang, Z.; Zhao, Z.; Fang, J.; Wang, M.; Zuo, M.; Li, Y. Passiflora Edulis: An Insight Into Current Researches on Phytochemistry and Pharmacology. Front. Pharmacol. 2020, 11, 617, doi:10.3389/fphar.2020.00617.
19. Mohamed, R.S.; Marrez, D.A.; Salem, S.H.; Zaghloul, A.H.; Ashoush, I.S.; Farrag, A.R.H.; Abdel-Salam, A.M. Hypoglycemic, Hypolipidemic and Antioxidant Effects of Green Sprouts Juice and Functional Dairy Micronutrients against Streptozotocin-Induced Oxidative Stress and Diabetes in Rats. Heliyon 2019, 5, e01197, doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01197.
20. Ramírez-Luzuriaga, M.J.; Belmont, P.; Waters, W.F.; Freire, W.B. Malnutrition Inequalities in Ecuador: Differences by Wealth, Education Level and Ethnicity. Public Health Nutr. 2020, 23, s59–s67, doi:10.1017/S1368980019002751.
21. Borges, T.H.; Serna, A.; López, L.C.; Lara, L.; Nieto, R.; Seiquer, I. Composition and Antioxidant Properties of Spanish Extra Virgin Olive Oil Regarding Cultivar, Harvest Year and Crop Stage. Antioxidants 2019, 8, 217, doi:10.3390/antiox8070217.
22. Skryplonek, K.; Dmytrow, I.; Mituniewicz-Malek, A. The Use of Buttermilk as a Raw Material for Cheese Production. Int. J. Dairy Technol. 2019, 72, 610–616, doi:10.1111/1471-0307.12614.

23. Molero-Mendez, M.; Castro-Albornoz, G.; Brinez-Zambrano, W. Physicochemical Characterization of whey Obtained by Cheese Making Process Aplying an Artisanal Method. Rev. Cient.-Fac. Cienc. Vet. 2017, 27, 149–153.
24. Haro, A.; Trescastro, A.; Lara, L.; Fernández-Fígares, I.; Nieto, R.; Seiquer, I. Mineral Elements Content of Wild Growing Edible Mushrooms from the Southeast of Spain. J. Food Compos. Anal. 2020, 91, 103504, doi:10.1016/j.jfca.2020.103504.
25. Minekus, M.; Alminger, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carrière, F.; Boutrou, R.; Corredig, M.; Dupont, D.; et al. A Standardised Static in Vitro Digestion Method Suitable for Food – an International Consensus. Food Funct. 2014, 5, 1113–1124, doi:10.1039/C3FO60702J.
26. Brodkorb, A.; Egger, L.; Alminger, M.; Alvito, P.; Assuncao, R.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu-Lacanal, C.; Boutrou, R.; Carriere, F.; et al. INFOGEST Static in Vitro Simulation of Gastrointestinal Food Digestion. Nat. Protoc. 2019, 14, 991–1014, doi:10.1038/s41596-018-0119-1.
27. Seiquer, I.; Rueda, A.; Olalla, M.; Cabrera-Vique, C. Assessing the Bioavailability of Polyphenols and Antioxidant Properties of Extra Virgin Argan Oil by Simulated Digestion and Caco-2 Cell Assays. Comparative Study with Extra Virgin Olive Oil. Food Chem. 2015, 188, 496–503, doi:10.1016/j.foodchem.2015.05.006.
28. Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. J. Biol. Chem. 1957, 226, 497–509.
29. Kramer, J.K.G.; Zhou, J.Q. Conjugated Linoleic Acid and Octadecenoic Acids: Extraction and Isolation of Lipids. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2001, 103, 594–600.
30. Nielsen, P.M.; Petersen, D.; Dambmann, C. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. J. Food Sci. 2001, 66, 642–646, doi:10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x.
31. Minkiewicz, P.; Iwaniak, A.; Darewicz, M. BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities. Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 5978, doi:10.3390/ijms20235978.
32. Olsen, T.H.; Yesiltas, B.; Marin, F.I.; Pertseva, M.; García-Moreno, P.J.; Gregersen, S.; Overgaard, M.T.; Jacobsen, C.; Lund, O.; Hansen, E.B.; et al. AnOxPePred: Using Deep Learning for the Prediction of Antioxidative Properties of Peptides. Sci. Rep. 2020, 10, 21471, doi:10.1038/s41598-020-78319-w.
33. Prazeres, A.R.; Carvalho, F.; Rivas, J. Cheese Whey Management: A Review. J. Environ. Manage. 2012, 110, 48–68, doi:10.1016/j.jenvman.2012.05.018.
34. León-López, A.; Pérez-Marroquín, X.A.; Campos-Lozada, G.; Campos-Montiel, R.G.; Aguirre-Álvarez, G. Characterization of Whey-Based Fermented Beverages Supplemented with Hydrolyzed Collagen: Antioxidant Activity and Bioavailability. Foods 2020, 9, 1106, doi:10.3390/foods9081106.
35. Hailu, M.; Tola, A.; Teshome, G.; Agza, B. Food Sci. Nutr. Complet. Res. 2019, pp. 85–93.

36. Pires, A.F.; Marnotes, N.G.; Rubio, O.D.; Garcia, A.C.; Pereira, C.D. Dairy By-Products: A Review on the Valorization of Whey and Second Cheese Whey. Foods 2021, 10, 1067, doi:10.3390/foods10051067.
37. Brandelli, A.; Daroit, D.J.; Corrêa, A.P.F. Whey as a Source of Peptides with Remarkable Biological Activities. Food Res. Int. 2015, 73, 149–161, doi:10.1016/j.foodres.2015.01.016.
38. Rako, A.; Tudor Kalit, M.; Kalit, S.; Soldo, B.; Ljubenkov, I. Nutritional Characteristics of Croatian Whey Cheese (Bračka Skuta) Produced in Different Stages of Lactation. LWT 2018, 96, 657–662, doi:10.1016/j.lwt.2018.06.024.
39. Dupont, D.; Mandalari, G.; Molle, D.; Jardin, J.; Léonil, J.; Faulks, R.M.; Wickham, M.S.J.; Clare Mills, E.N.; Mackie, A.R. Comparative Resistance of Food Proteins to Adult and Infant in Vitro Digestion Models. Mol. Nutr. Food Res. 2010, 54, 767–780, doi:10.1002/mnfr.200900142.
40. Sanchón, J.; Fernández-Tomé, S.; Miralles, B.; Hernández-Ledesma, B.; Tomé, D.; Gaudichon, C.; Recio, I. Protein Degradation and Peptide Release from Milk Proteins in Human Jejunum. Comparison with in Vitro Gastrointestinal Simulation. Food Chem. 2018, 239, 486–494, doi:10.1016/j.foodchem.2017.06.134.
41. Holst, B.; Williamson, G. Nutrients and Phytochemicals: From Bioavailability to Bioefficacy beyond Antioxidants. Curr. Opin. Biotechnol. 2008, 19, 73–82, doi:10.1016/j.copbio.2008.03.003.
42. Bohn, T.; Carriere, F.; Day, L.; Deglaire, A.; Egger, L.; Freitas, D.; Golding, M.; Le Feunteun, S.; Macierzanka, A.; Menard, O.; et al. Correlation between in Vitro and in Vivo Data on Food Digestion. What Can We Predict with Static in Vitro Digestion Models? Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2018, 58, 2239–2261, doi:10.1080/10408398.2017.1315362.
43. Biasi, F.; Astegiano, M.; Maina, M.; Leonarduzzi, G.; Poli, G. Polyphenol Supplementation as a Complementary Medicinal Approach to Treating Inflammatory Bowel Disease. Curr. Med. Chem. 2011, 18, 4851–4865, doi:10.2174/092986711797535263.
44. Cardona, F.; Andres-Lacueva, C.; Tulipani, S.; Tinahones, F.J.; Isabel Queipo-Ortuno, M. Benefits of Polyphenols on Gut Microbiota and Implications in Human Health. J. Nutr. Biochem. 2013, 24, 1415–1422, doi:10.1016/j.jnutbio.2013.05.001.
45. Pastoriza, S.; Delgado-Andrade, C.; Haro, A.; Rufian-Henares, J.A. A Physiologic Approach to Test the Global Antioxidant Response of Foods. The GAR Method. Food Chem. 2011, 129, 1926–1932, doi:10.1016/j.foodchem.2011.06.009.
46. Khochapong, W.; Ketnawa, S.; Ogawa, Y.; Punbusayakul, N. Effect of in Vitro Digestion on Bioactive Compounds, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Coffee (Coffea Arabica L.) Pulp Aqueous Extract. Food Chem. 2021, 348, 129094, doi:10.1016/j.foodchem.2021.129094.
47. Aune, D. Plant Foods, Antioxidant Biomarkers, and the Risk of Cardiovascular Disease, Cancer, and Mortality: A Review of the Evidence. Adv. Nutr. 2019, 10, S404–S421, doi:10.1093/advances/nmz042.

48. Corrochano, A.R.; Buckin, V.; Kelly, P.M.; Giblin, L. Invited Review: Whey Proteins as Antioxidants and Promoters of Cellular Antioxidant Pathways. J. Dairy Sci. 2018, 101, 4747–4761, doi:10.3168/jds.2017-13618.
49. Arranz, E.; Corrochano, A.R.; Shanahan, C.; Villalva, M.; Jaime, L.; Santoyo, S.; Callanan, M.J.; Murphy, E.; Giblin, L. Antioxidant Activity and Characterization of Whey Protein-Based Beverages: Effect of Shelf Life and Gastrointestinal Transit on Bioactivity. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 2019, 57, 102209, doi:10.1016/j.ifset.2019.102209.
50. Carlos Carmona-Hernandez, J.; Taborda-Ocampo, G.; Valdez, J.C.; Bolling, B.W.; Helena Gonzalez-Correa, C. Polyphenol Extracts from Three Colombian Passifloras (Passion Fruits) Prevent Inflammation-Induced Barrier Dysfunction of Caco-2 Cells. Molecules 2019, 24, 4614, doi:10.3390/molecules24244614.
51. Pardo, Z.; Seiquer, I. Supplemental Zinc Exerts a Positive Effect against the Heat Stress Damage in Intestinal Epithelial Cells: Assays in a Caco-2 Model. J. Funct. Foods 2021, 83, 104569, doi:10.1016/j.jff.2021.104569.
52. Rueda, A.; Cantarero, S.; Seiquer, I.; Cabrera-Vique, C.; Olalla, M. Bioaccessibility of Individual Phenolic Compounds in Extra Virgin Argan Oil after Simulated Gastrointestinal Process. Lwt-Food Sci. Technol. 2017, 75, 466–472, doi:10.1016/j.lwt.2016.09.028.
53. Correa-Betanzo, J.; Allen-Vercoe, E.; McDonald, J.; Schroeter, K.; Corredig, M.; Paliyath, G. Stability and Biological Activity of Wild Blueberry (Vaccinium Angustifolium) Polyphenols during Simulated in Vitro Gastrointestinal Digestion. Food Chem. 2014, 165, 522–531, doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.135.
54. Tvrzicka, E.; Kremmyda, L.-S.; Stankova, B.; Zak, A. Fatty Acids as Biocompounds: Their Role in Human Metabolism, Health and Disease - a Review. Part 1: Classification, Dietary Sources and Biological Functions. Biomed. Pap.-Olomouc 2011, 155, 117–130, doi:10.5507/bp.2011.038.
55. Tomaino, R.M.; Parker, J.D.; Larick, D.K. Analysis of Free Fatty Acids in Whey Products by Solid-Phase Microextraction. J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 3993–3998, doi:10.1021/jf001503r.
56. Ayala-Bribiesca, E.; Turgeon, S.L.; Britten, M. Effect of Calcium on Fatty Acid Bioaccessibility during in Vitro Digestion of Cheddar-Type Cheeses Prepared with Different Milk Fat Fractions. J. Dairy Sci. 2017, 100, 2454–2470, doi:10.3168/jds.2016-11902.
57. Santillo, A.; Figliola, L.; Ciliberti, M.G.; Caroprese, M.; Marino, R.; Albenzio, M. Focusing on Fatty Acid Profile in Milk from Different Species after in Vitro Digestion. J. Dairy Res. 2018, 85, 257–262, doi:10.1017/S0022029918000274.
58. Lamothe, S.; Guerette, C.; Dion, F.; Sabik, H.; Britten, M. Antioxidant Activity of Milk and Polyphenol-Rich Beverages during Simulated Gastrointestinal Digestion of Linseed Oil Emulsions. Food Res. Int. 2019, 122, 149–156, doi:10.1016/j.foodres.2019.03.068.

59. Maestre, R.; Douglass, J.D.; Kodukula, S.; Medina, I.; Storch, J. Alterations in the Intestinal Assimilation of Oxidized PUFAs Are Ameliorated by a Polyphenol-Rich Grape Seed Extract in an In Vitro Model and Caco-2 Cells. J. Nutr. 2013, 143, 295–301, doi:10.3945/jn.112.160101.
60. Aarak, K.E.; Rigby, N.M.; Kirkhus, B.; Salt, L.J.; Sahlstrom, S.; Bengtsson, G.B.; Vegarud, G.E.; Mackie, A.R. The Impact of Meal Composition on the Release of Fatty Acids from Salmon during in Vitro Gastrointestinal Digestion. Food Funct. 2013, 4, 1819–1826, doi:10.1039/c3fo60346f.
61. Lopez-Huertas, E. Health Effects of Oleic Acid and Long Chain Omega-3 Fatty Acids (EPA and DHA) Enriched Milks. A Review of Intervention Studies. Pharmacol. Res. 2010, 61, 200–207, doi:10.1016/j.phrs.2009.10.007.
62. Hernández-Ledesma, B.; García-Nebot, M.J.; Fernández-Tomé, S.; Amigo, L.; Recio, I. Dairy Protein Hydrolysates: Peptides for Health Benefits. Int. Dairy J. 2014, 38, 82–100, doi:10.1016/j.idairyj.2013.11.004.
63. Phelan, M.; Aherne, A.; FitzGerald, R.J.; O'Brien, N.M. Casein-Derived Bioactive Peptides: Biological Effects, Industrial Uses, Safety Aspects and Regulatory Status. Int. Dairy J. 2009, 19, 643–654, doi:10.1016/j.idairyj.2009.06.001.
64. Pihlanto, A. Antioxidative Peptides Derived from Milk Proteins. Int. Dairy J. 2006, 16, 1306–1314, doi:10.1016/j.idairyj.2006.06.005.
65. Amigo, L.; Martínez-Maqueda, D.; Hernández-Ledesma, B. In Silico and In Vitro Analysis of Multifunctionality of Animal Food-Derived Peptides. Foods 2020, 9, 991, doi:10.3390/foods9080991.
66. Hernández-Ledesma, B.; Miguel, M.; Amigo, L.; Aleixandre, M.A.; Recio, I. Effect of Simulated Gastrointestinal Digestion on the Antihypertensive Properties of Synthetic β-Lactoglobulin Peptide Sequences. J. Dairy Res. 2007, 74, 336–339, doi:10.1017/S0022029907002609.
67. Hernández-Ledesma, B.; Recio, I.; Amigo, L. β-Lactoglobulin as Source of Bioactive Peptides. Amino Acids 2008, 35, 257–265, doi:10.1007/s00726-007-0585-1.
68. Hernández-Ledesma, B.; Amigo, L.; Recio, I.; Bartolomé, B. ACE-Inhibitory and Radical-Scavenging Activity of Peptides Derived from β-Lactoglobulin f(19−25). Interactions with Ascorbic Acid. J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 3392–3397, doi:10.1021/jf063427j.
69. Hernández-Ledesma, B.; Dávalos, A.; Bartolomé, B.; Amigo, L. Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from α-Lactalbumin and β-Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS. J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 588–593, doi:10.1021/jf048626m.
70. Ozorio, L.; Mellinger-Silva, C.; Cabral, L.M.C.; Jardin, J.; Boudry, G.; Dupont, D. The Influence of Peptidases in Intestinal Brush Border Membranes on the Absorption of Oligopeptides from Whey Protein Hydrolysate: An Ex Vivo Study Using an Ussing Chamber. Foods 2020, 9, 1415, doi:10.3390/foods9101415.
71. Vivanco-Maroto, S.M.; Santos-Hernández, M.; Sanchón, J.; Picariello, G.; Recio, I.; Miralles, B. In Vitro Digestion of Milk Proteins Including Intestinal Brush Border Membrane Peptidases.

Transepithelial Transport of Resistant Casein Domains. Food Res. Int. 2022, 157, 111238, doi:10.1016/j.foodres.2022.111238.

72. Fernández-Fernández, A.M.; López-Pedemonte, T.; Medrano-Fernandez, A. Evaluation of Antioxidant, Antiglycant and ACE-Inhibitory Activity in Enzymatic Hydrolysates of α-Lactalbumin. Food Nutr. Sci. 2016, 8, 84–98, doi:10.4236/fns.2017.81006.
73. Fernández-Fernández, A.M.; Dumay, E.; López-Pedemonte, T.; Medrano-Fernandez, A. Bioaccessibility and Cell Metabolic Activity Studies of Antioxidant Low Molecular Weight Peptides Obtained by Ultrafiltration of α-Lactalbumin Enzymatic Hydrolysates. Food Nutr. Sci. 2018, 9, 1047–1065, doi:10.4236/fns.2018.99077.
74. Báez, J.; Fernández-Fernández, A.M.; Tironi, V.; Bollati-Fogolín, M.; Añón, M.C.; Medrano-Fernández, A. Identification and Characterization of Antioxidant Peptides Obtained from the Bioaccessible Fraction of α-Lactalbumin Hydrolysate. J. Food Sci. 2021, 86, 4479–4490, doi:10.1111/1750-3841.15918.
75. Sadat, L.; Cakir-Kiefer, C.; N'Negue, M.-A.; Gaillard, J.-L.; Girardet, J.-M.; Miclo, L. Isolation and Identification of Antioxidative Peptides from Bovine α-Lactalbumin. Int. Dairy J. 2011, 21, 214–221, doi:10.1016/j.idairyj.2010.11.011.
76. Mooney, C.; Haslam, N.J.; Pollastri, G.; Shields, D.C. Towards the Improved Discovery and Design of Functional Peptides: Common Features of Diverse Classes Permit Generalized

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Discriminant sensory analysis of different formulations of *Colada* (25-5 % Maracuyá juice) by trained judges (n=5)[1].

Categories	Attributes	25%		15%[3]		10%		7%		5%	
		Mean	CVC[2]	Mean	CVC	Mean	CVC	Mean	CVC	Mean	CVC
Flavor	Bitter	3	0.56032	2	0.48032	3	0.64032	2	0.36032	2	0.32032
	Salty	2	0.48032	2	0.36032	3	0.60032	2	0.48032	2	0.40032
	Acidic	**4**	**0.76032**	**5**	**0.92032**	**3**	**0.68032**	**3**	**0.60032**	**3**	**0.56032**
	Sweet	**4**	**0.76032**	**5**	**0.96032**	**3**	**0.68032**	**3**	**0.64032**	**3**	**0.64032**
	Umami	2	0.40032	2	0.32032	3	0.64032	2	0.40032	2	0.36032
	Spicy	3	0.56032	3	0.68032	2	0.48032	2	0.40032	2	0.36032
	Astringent	2	0.36032	2	0.48032	2	0.40032	2	0.32032	2	0.36032
Color	Brightness	2	0.40032	3	0.56032	2	0.32032	2	0.40032	2	0.40032
	Transparency	3	0.56032	2	0.44032	2	0.48032	2	0.48032	2	0.36032
	Opacity	**4**	**0.80032**	**5**	**0.92032**	**4**	**0.88032**	**4**	**0.80032**	**4**	**0.80032**
	Pallor	**4**	**0.88032**	**5**	**0.96032**	**5**	**0.92032**	**4**	**0.84032**	**4**	**0.88032**
Texture	Pasty	3	0.60032	3	0.64032	3	0.60032	2	0.36032	2	0.40032
	Tender	**4**	**0.84032**	**5**	**0.96032**	**4**	**0.88032**	**4**	**0.88032**	**4**	**0.80032**
	Rubbery	3	0.68032	2	0.32032	3	0.60032	1	0.28032	2	0.32032
	Fluid	3	0.64032	2	0.48032	2	0.44032	2	0.44032	1	0.28032
	Dense	**4**	**0.84032**	**5**	**0.96032**	**5**	**0.92032**	**4**	**0.88032**	**4**	**0.88032**
	Viscous	**4**	**0.80032**	**5**	**0.92032**	**4**	**0.88032**	**4**	**0.88032**	**4**	**0.80032**
	Elastic	2	0.48032	3	0.64032	3	0.60032	2	0.44032	3	0.52032
	Sticky	2	0.40032	1	0.28032	3	0.60032	2	0.44032	2	0.36032
	Adherent	3	0.52032	3	0.52032	2	0.48032	2	0.44032	2	0.36032
	Fine	**4**	**0.72032**	**5**	**0.92032**	**4**	**0.80032**	**4**	**0.88032**	**4**	**0.80032**
	Liquid	3	0.56032	3	0.64032	3	0.60032	3	0.56032	2	0.36032
General Appearance	**Low Dense**	**4**	**0.88032**	**5**	**0.96032**	**4**	**0.80032**	**4**	**0.84032**	**4**	**0.84032**
	Dense	2	0.48032	3	0.56032	3	0.60032	2	0.32032	2	0.40032
	Very Dense	3	0.52032	2	0.44032	3	0.56032	2	0.40032	2	0.44032

[1] The measure scale was of five points (1: not perceived, 2: poorly perceived, 3: fairly perceived, 4: well perceived and 5: excellent perceived)

[2] CVC: Concordance Validity Coefficient (from < 0.60, very deficient, to > 0.90, excellent)

[3] The *Colada* at 15% Maracuyá juice obtained the best score with CVC values of 0.92 - 0.96.

Table S2. Hedonic evaluation of *Colada* (15 % Maracuyá juice) by consumers (n=80)[1].

Categories	Attributes	Mean	CVC[2]
Flavor	Bitter	1	0.29
	Salty	3	0.58
	Acidic	**4**	**0.85**
	Sweet	**4**	**0.87**
	Umami	2	0.48
	Spicy	3	0.50
	Astringent	2	0.50
Color	Brightness	3	0.52
	Transparency	2	0.44
	Opacity	**4**	**0.80**
	Pallor	**4**	**0.82**
Texture	Pasty	1	0.30
	Tender	**4**	**0.90**
	Rubbery	1	0.30
	Fluid	3	0.65
	Dense	**4**	**0.80**
	Viscous	**4**	**0.85**
	Elastic	1	0.30
	Sticky	3	0.65
	Adherent	1	0.30
	Fine	**4**	**0.80**
	Liquid	1	0.30
General Appearance	**Low Dense**	**4**	**0.83**
	Dense	1	0.30
	Very Dense	1	0.30

[1] The measure scale was of five points (1: not perceived, 2: poorly perceived, 3: fairly perceived, 4: well perceived and 5: excellent perceived).

[2] CVC: Concordance Validity Coefficient (from < 0.60, very deficient, to > 0.90, excellent).

Consumers evaluated the beverage with CVC between 0.80 and 0.90.

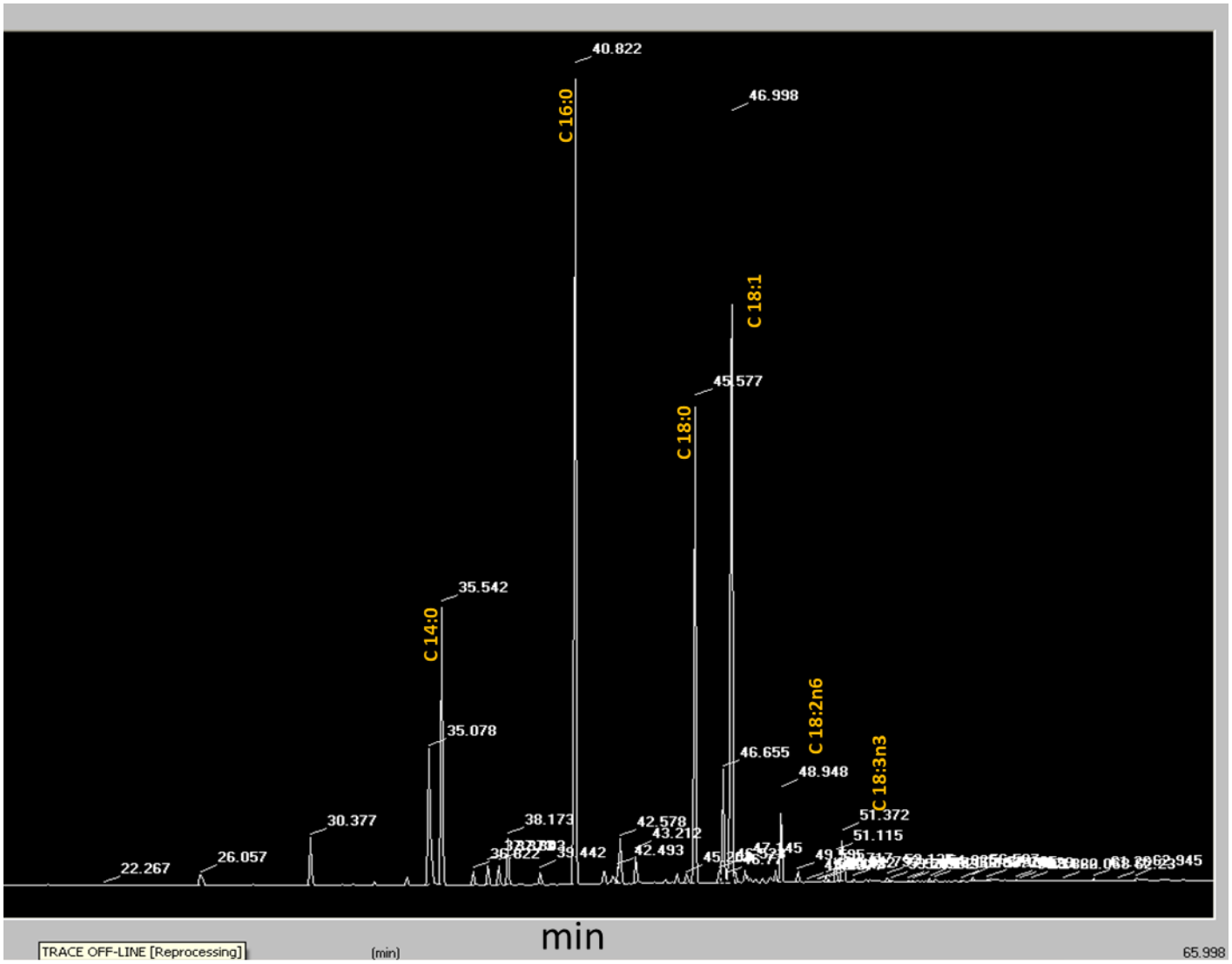


Figure S1. Chromatogram (GC) of fatty acid methyl esters (FAME) of the whey-beverage (*Colada*) before the in vitro digestion.

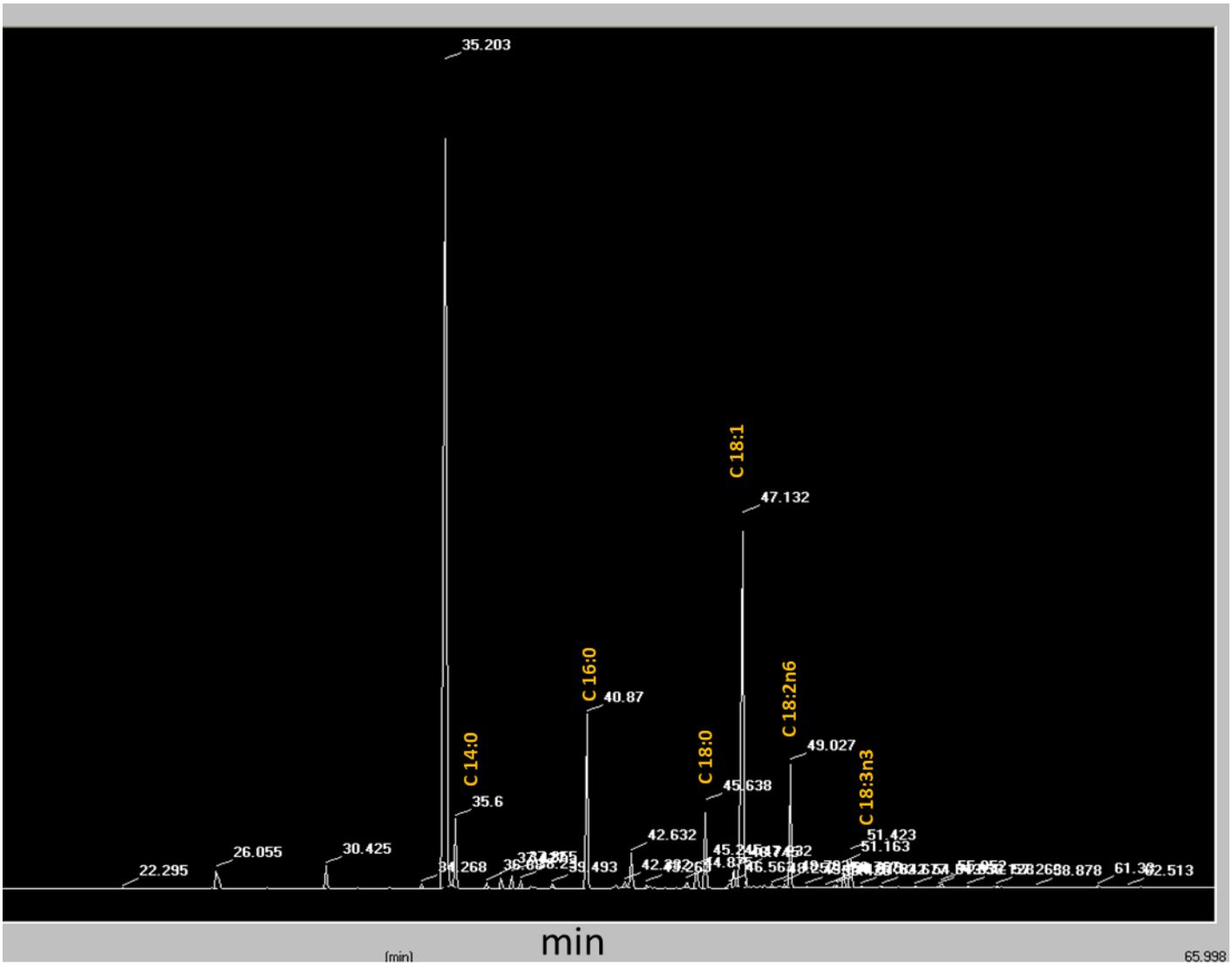


Figure S2. Chromatogram (GC) of fatty acid methyl esters (FAME) of the whey-beverage (*Colada*) after the in vitro digestion (bioaccessible fraction).

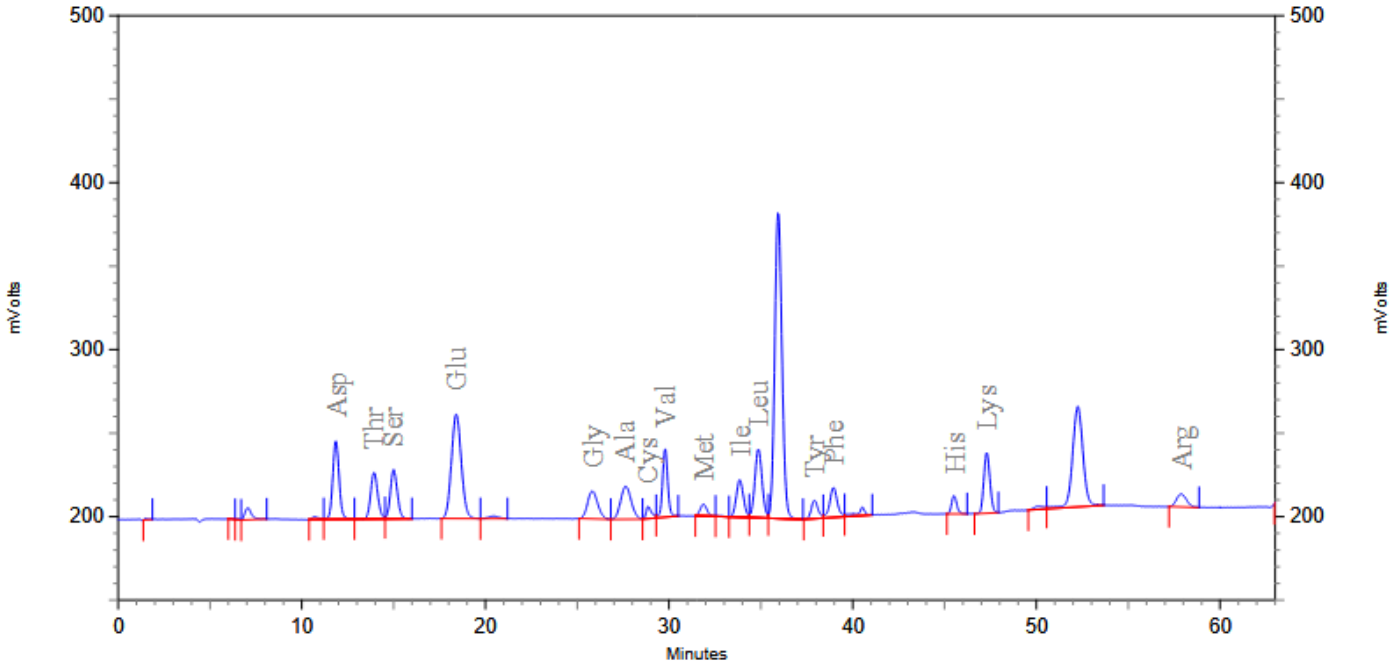


Figure S3. Chromatogram (HPLC) of amino acids of the whey-beverage (*Colada*) (acid hydrolysis).

Capítulo V

Conclusiones y resumen

Capítulo V. Conclusiones y resumen

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en la presente Memoria de Tesis Doctoral se arriba a las siguientes conclusiones:

1. Tras la caracterización fisicoquímica de las muestras objeto de estudio, se confirma que el lactosuero es un subproducto de la industria quesera de alto valor nutricional y que la estacionalidad, la raza, la alimentación del ganado y el proceso tecnológico empleado durante la elaboración del queso son determinantes para establecer su composición.
2. La fracción grasa del lactosuero depende, en cuanto a cantidad, de la época del año en que se obtengan las muestras de leche. Sin embargo, el perfil de AG se relaciona en mayor medida con la raza y la alimentación de los animales de procedencia y, además, se afecta sustancialmente por el proceso de digestión *in vitro*. Este proceso influye también en las propiedads antioxidantes del lactosuero, que se ven incrementadas notablemente en las muestras digeridas.
3. El lactosuero se ratifica como una buena fuente de minerales, ya que contiene valores medios entre 30 y 90 % de los minerales de la leche, siendo los principales, por orden de abundancia: K, Na, P, Ca y Mg, seguidos de los elementos traza Fe y Zn. Estos minerales reportan alta bioaccesibilidad, así como buena biodisponibilidad en las células Caco-2.
4. Tras la digestión de las muestras se identifican por vez primera más de 500 péptidos, cuyas secuencias coinciden con diversos péptidos de actividad biológica confirmada, como la actividad inhibitoria de la ACE y de la enzima dipeptidil peptidasa IV, y péptidos opiodes, anticancerígenos, antitumorales, antimicrobianos, osteoanabólicos, queladores de minerales y antioxidantes, entre otros.
5. La bebida llamada *Colada*, preparada a base de lactosuero adicionado con cereales y fruta, resulta ser un alimento con excelentes cualidades nuticionales y saludables. Además de contener proteínas de alto valor biológico, presenta propiedades antioxidantes que mejoran con el proceso de digestión. La *Colada* puede ser considerada como un alimento de gran valía para la población, ya que, además de coadyuvar en la mitigación de la desnutrición crónica infantil en el Ecuador, puede favorecer la economía circular de los pequeños y medianos productores de la industria quesera

ecuatoriana, contribuyendo a minimizar el impacto ambiental que genera el vertido del lactosuero al medio sin tratamiento previo.

Resumen

El lactosuero es el subproducto que se genera durante la producción quesera, en el que quedan retenidos nutrientes de gran valía para el ser humano como proteínas, lactosa, grasas, vitaminas y minerales; representa entre el 80 al 90 % del volumen total de le leche empleada en el proceso productivo del queso, por lo que, se estima que anualmente se producen más de 200 millones de toneladas de lactosuero en el mundo. En el Ecuador el volumen producido es aproximadamente de 1.75 millones de litros de suero lácteo por día, cifra que resulta alarmante considerando que más del 50 % no se aprovecha, sino que, al igual que ocurre en otros paises en vía de desarrollo, es vertido al medio sin tratamiento previo con la consecuente contaminación ambiental que genera. En contraparte, en paises del primer mundo, el lactosuero es ampliamente utilizado en la elaboración de productos alimenticios y nutracéuticos, es así que durante la última década ha sido objeto de estudio de muchas investigaciones centradas especialmente en la recuperación de sus proteínas. En este sentido, el **objetivo** de este trabajo fue caracterizar el lactosuero dulce procedente de Ecuador antes y después de un proceso de digestión *in vitro*, evaluando los péptidos bioactivos, la composición mineral y las propiedades antioxidantes. Para ello, se obtuvieron muestras de lactosuero ecuatoriano durante dos épocas diferentes del año, verano e invierno (estación seca y lluviosa); como complemento del estudio, para conocer las diferencias en la composición nutricional del lactosuero proveniente de diferentes razas y zonas geográficas se analizó también una muestra de lactosuero procedente de España, obtenido durante la época de otoño. Además, se evaluó el efecto de la matriz alimentaria analizando una bebida de consumo habitual en el Ecuador, preparada a partir del lactosuero de la zona.

En las muestras se determinó en primer lugar la composición nutricional, por lo que se analizó el contenido de proteína, grasas, cenizas y minerales. Se analizó tambien el perfil de aminoácidos. Posteriormente se realizó la determinación del perfil de ácidos grasos, la capacidad antioxidante y el contenido total de polifenoles de las muestras antes y después de un proceso de digestión *in vitro* realizado mediante la metodología INFOGEST. Se evaluó además la bioaccesibilidad y biodisponibilidad mineral en ensayos en cultivos celulares en células Caco-2. Los péptidos liberados tras la digestión fueron analizados en distintas bases de datos, identificando aquellos con posible actividad antioxidante. Para conocer el nivel de aceptación de la bebida formulada a partir del lactosuero (*Colada*), esta fue sometida al análisis

sensorial discriminativo de cinco jueces semientrenados, mediante una escala hedónica de 5 puntos, en la que los atributos sensoriales evaluados fueron sabor (amargo, salado, ácido, dulce, umami, picante y astringente), color (brillo, transparencia, opacidad y palidez), textura (pastosa, tierna, gomosa, fluida, densa, viscosa, elástica, pegajosa, adherente, fino y líquido) y aspecto general (ligero, denso y muy denso). Tras el análisis discriminativo la *Colada* fue evaluada mediante una prueba hedónica aplicada a 80 consumidores no entrenados.

Los resultados del estudio permitieron establecer que el proceso digestivo tuvo un efecto positivo sobre las propiedades antioxidantes de las muestras de lactosuero y *Colada*, basado en mayores valores de ABTS y FRAP presentes en la fracción bioaccesible, junto con incrementos en los polifenoles totales. Además, el pretratamiento de las células Caco-2 con la fracción bioaccesible redujo significativamente la generación de ROS, medida mediante el ensayo de diclorofluoresceína. Por otra parte, durante la digestión *in vitro* se produjeron cambios sustanciales en el perfil de ácidos grasos, representados por la baja en el contenido de ácidos grasos saturados y el aumento en los ácidos grasos poliinsaturados. El perfil proteico, examinado por SDS-PAGE y cromatografía de exclusión molecular en la fracción bioaccesible mostraron que la mayor parte de las proteínas fueron digeridas durante la fase intestinal. El análisis de NanoLC-MS/MS reveló 506 péptidos con actividad biológica reportada, 18 de ellos con potencial actividad antioxidante originados a partir de las proteínas del suero; se detectaron tambien 16 péptidos de la cebada con potenciales propiedades antioxidantes. Los minerales alcanzaron alta bioaccesibilidad y biodisponibilidad en las células Caco-2, llegando incluso a superar notablemente los valores reportados.

En conclusión, el lactosuero dulce ecuatoriano es un subproducto de la industria quesera que debe ser empleado en la formulación de alimentos a los que les confiere mejoras sustanciales en cuanto a su valor nutricional, además de ser buena fuente de compuestos con actividad biológica descrita. Además, las bebidas a base de suero como la *Colada* que aquí se expone, podrían ser una forma efectiva de reutilizar este subproducto a bajo costo, mitigando así la contaminación ambiental que su vertido genera y permitiendo el aprovechamiento de un alimento con altas propiedades nutricionales y antioxidantes que puede ser empleado en la lucha contra la desnutrición crónica infantil de la zona.

Referencias

Aarak, K. E., Rigby, N. M., Kirkhus, B., Salt, L. J., Sahlstrøm, S., Bengtsson, G. B., Vegarud, G. E., & Mackie, A. R. (2013). The impact of meal composition on the release of fatty acids from salmon during in vitro gastrointestinal digestion. *Food & Function*, *4*(12), 1819-1826. https://doi.org/10.1039/C3FO60346F

Abd El-Salam, M. H., El-Shibiny, S., & Salem, A. (2009). Factors Affecting the Functional Properties of Whey Protein Products: A Review. *Food Reviews International*, *25*(3), 251-270. https://doi.org/10.1080/87559120902956224

Abrahamse, E., Thomassen, G. G. M., Renes, I. B., Wierenga, P. A., & Hettinga, K. A. (2022). Gastrointestinal Protein Hydrolysis Kinetics: Opportunities for Further Infant Formula Improvement. *Nutrients*, *14*(7), Article 7. https://doi.org/10.3390/nu14071512

Abril Bonett, J. E., de Sousa Geraldino, P., Cardoso, P. G., de Freitas Coelho, F., & Duarte, W. F. (2020). Isolation of freshwater microalgae and outdoor cultivation using cheese whey as substrate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *29*, 101799. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101799

Agualongo, L., Aucatoma, D., Sagnay, D., Santillan, N., & Jácome, C. (2022). El suero de leche, subproducto de la industria de queso: Composición, recuperación de proteínas y aplicaciones. *Journal of Agro-industry Sciences*, *4*(1), Article 1. https://doi.org/10.17268/JAIS.2022.002

Akbarian, M., Khani, A., Eghbalpour, S., & Uversky, V. N. (2022). Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1445. https://doi.org/10.3390/ijms23031445

Alais, C. (1985). *Ciencia De La Leche—Principios De Tecnica Lechera* (2da.). Reverté, S.A. https://idoc.pub/documents/alais-charles-ciencia-de-la-leche-principios-de-tecnica-lecherapdf-on23emjz9yl0

Alam, M. K., Rana, Z. H., Islam, S. N., & Akhtaruzzaman, M. (2020). Comparative assessment of nutritional composition, polyphenol profile, antidiabetic and antioxidative properties of selected edible wild plant species of Bangladesh. *Food Chemistry*, *320*, 126646. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126646

Albayrak, N., & Yang, S.-T. (2002). Immobilization of beta-galactosidase on fibrous matrix by polyethyleneimine for production of galacto-oligosaccharides from lactose. *Biotechnology Progress*, *18*(2), 240-251. https://doi.org/10.1021/bp010167b

Alonso, B. (2014). *Biodisponibilidad y aspectos analíticos: Fortalezas y debilidades*. *65*(1). http://www.alanrevista.org/ediciones/2015/suplemento-1/art-111/

Alothman, M., Hogan, S. A., Hennessy, D., Dillon, P., Kilcawley, K. N., O'Donovan, M., Tobin, J., Fenelon, M. A., & O'Callaghan, T. F. (2019). The "Grass-Fed" Milk Story: Understanding the Impact of Pasture Feeding on the Composition and Quality of Bovine Milk. *Foods*, *8*(8), Article 8. https://doi.org/10.3390/foods8080350

Alvarado Carrasco, C., & Guerra, M. (2010). Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *Anales Venezolanos de Nutrición*, *23*(1), 45-50.

Álvarez, E., & Paredes. (2016). *"Elaboración y Comercialización de Productos Alimenticios a base de proteína de suero de leche, diseñados para la Población Infantil de la Provincia del Guayas"* [Tesis de Maestría, Escuela Superior Politécnica del Litoral]. https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/36304/1/D-P12834.pdf

Amigo, L., Martínez-Maqueda, D., & Hernández-Ledesma, B. (2020a). In Silico and In Vitro Analysis of Multifunctionality of Animal Food-Derived Peptides. *Foods*, *9*(8), Article 8. https://doi.org/10.3390/foods9080991

Amigo, L., Martínez-Maqueda, D., & Hernández-Ledesma, B. (2020b). In Silico and In Vitro Analysis of Multifunctionality of Animal Food-Derived Peptides. *Foods*, *9*(8), 991. https://doi.org/10.3390/foods9080991

Anankanbil, S., Larsen, M. K., Weisbjerg, M. R., & Wiking, L. (2018). *Efectos de la variación en la composición de ácidos grasos y triglicéridos sobre el comportamiento de fusión en la grasa de la leche*. *71*(2), 4-9. https://doi.org/10.25968/MSI.2018.2

Andersen, J. H., Jenssen, H., & Gutteberg, T. J. (2003). Lactoferrin and lactoferricin inhibit Herpes simplex 1 and 2 infection and exhibit synergy when combined with acyclovir. *Antiviral Research*, *58*(3), 209-215. https://doi.org/10.1016/S0166-3542(02)00214-0

Andersen, J. H., Osbakk, S. A., Vorland, L. H., Traavik, T., & Gutteberg, T. J. (2001). Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human cytomegalovirus into human fibroblasts. *Antiviral Research*, *51*(2), 141-149. https://doi.org/10.1016/S0166-3542(01)00146-2

Anon. (2001). *Reference Manual For U.S. whey and lactose products*. U.S. Dairy Export Council. http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf

Aranda, Planells, & Llopis. (2000). *Magnesio Scientific Communication: Art o Technique? 41*(1), 91-100. https://doi.org/10.30827/ars

Arce-Méndez, J. R., Thompson-Vicente, E., & Calderón-Villaplana, S. (2016). Incorporación de la proteína del suero lácteo en un queso fresco. *Agronomía Mesoamericana*, *27*(1), 61-71. https://doi.org/10.15517/am.v27i1.21878

Arias, J. (2019). *Potencial energético del biogás de la co-digestión del suero lácteo y el estiercol bovino* [Tesis, UDLA]. https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/10889/1/UDLA-EC-TIAM-2019-12.pdf

Arranz, E., Corrochano, A., Shanahan, C., Villalva, M., Jaime, L., Santoyo, S., Callanan, M., Murphy, E., & Giblin, L. (2019). Antioxidant activity and characterization of whey protein-based beverages: Effect of shelf life and gastrointestinal transit on bioactivity. *INNOVATIVE FOOD SCIENCE & EMERGING TECHNOLOGIES*, *57*. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102209

Arts, M. J. T. J., Haenen, G. R. M. M., Voss, H.-P., & Bast, A. (2001). Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. *Food and Chemical Toxicology*, *39*(8), 787-791. https://doi.org/10.1016/S0278-6915(01)00020-5

Ashraf, A., Mudgil, P., Palakkott, A., Iratni, R., Gan, C.-Y., Maqsood, S., & Ayoub, M. A. (2021). Molecular basis of the anti-diabetic properties of camel milk through profiling of its bioactive peptides on dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) and insulin receptor activity. *Journal of Dairy Science*, *104*(1), 61-77. https://doi.org/10.3168/jds.2020-18627

Astudillo, L., & Sánchez, A. (2019). *"Extracción de Almidón a partir del banano (plátano) de categoría II (Musa paradisiaca) en estado verde, para la elaboración de colada instantánea fortificada y utilización de su fibra para balanceado de ganado porcino."* [Tesis, Universidad de Cuenca]. http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/33521/1/Trabajo%20de%20titulaci%C3%B3n.pdf

Athira, S., Mann, B., Sharma, R., Pothuraju, R., & Bajaj, R. K. (2021). Preparation and characterization of iron-chelating peptides from whey protein: An alternative approach for chemical iron fortification. *Food Research International*, *141*, 110133. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110133

Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, *494*, 161-172. https://doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010

Baba, W. N., Mudgil, P., Kamal, H., Kilari, B. P., Gan, C.-Y., & Maqsood, S. (2021). Identification and characterization of novel α-amylase and α-glucosidase inhibitory

peptides from camel whey proteins. *Journal of Dairy Science*, *104*(2), 1364-1377. https://doi.org/10.3168/jds.2020-19271

Báez, J., Fernández-Fernández, A. M., Tironi, V., Bollati-Fogolín, M., Añón, M. C., & Medrano-Fernández, A. (2021). Identification and characterization of antioxidant peptides obtained from the bioaccessible fraction of α-lactalbumin hydrolysate. *Journal of Food Science*, *86*(10), 4479-4490. https://doi.org/10.1111/1750-3841.15918

Bagheri, L., Madadlou, A., Yarmand, M., & Mousavi, M. E. (2014). Potentially bioactive and caffeine-loaded peptidic sub-micron and nanoscalar particles. *Journal of Functional Foods*, *6*, 462-469. https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.11.012

Baldasso, C., Barros, T. C., & Tessaro, I. C. (2011). Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination*, *278*(1), 381-386. https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.05.055

Bamdad, F., Bark, S., Kwon, C. H., Suh, J.-W., & Sunwoo, H. (2017). Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Peptides Released from β-Lactoglobulin by High Hydrostatic Pressure-Assisted Enzymatic Hydrolysis. *Molecules*, *22*(6), Article 6. https://doi.org/10.3390/molecules22060949

Barbé, F., Ménard, O., Le Gouar, Y., Buffière, C., Famelart, M.-H., Laroche, B., Le Feunteun, S., Dupont, D., & Rémond, D. (2013). The heat treatment and the gelation are strong determinants of the kinetics of milk proteins digestion and of the peripheral availability of amino acids. *Food Chemistry*, *136*(3-4), 1203-1212. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.022

Barboza, G. D. de, Guizzardi, S., & Talamoni, N. T. de. (2015). Molecular aspects of intestinal calcium absorption. *World Journal of Gastroenterology*, *21*(23), 7142-7154. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i23.7142

Barea-Álvarez, M., Delgado-Andrade, C., Haro, A., Olalla, M., Seiquer, I., & Rufián-Henares, J. Á. (2016). Subtropical fruits grown in Spain and elsewhere: A comparison of mineral profiles. *Journal of Food Composition and Analysis*, *48*, 34-40. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.02.001

Barile, D., Tao, N., Lebrilla, C. B., Coisson, J.-D., Arlorio, M., & German, J. B. (2009). Permeate from cheese whey ultrafiltration is a source of milk oligosaccharides. *International dairy journal / published in association with the International Dairy Federation*, *19*(9), 524-530. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.03.008

Barone, G., Moloney, C., O'Regan, J., Kelly, A., & O'Mahony, J. (2020). Chemical composition, protein profile and physicochemical properties of whey protein

concentrate ingredients enriched in alpha-lactalbumin. *JOURNAL OF FOOD COMPOSITION AND ANALYSIS*, *92*. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103546

Barth, C. A., & Behnke, U. (1997). [Nutritional physiology of whey and whey components]. *Die Nahrung*, *41*(1), 2-12. https://doi.org/10.1002/food.19970410103

Bastidas, M. (2010). *Las memorias de mi Ecuador chiquito: Guía docente para trabajar las fiestas cívicas y tradicionales del Ecuador a través del bloque de experiencia mundo social, cultural y natural, dirigida a primero de básica* [Tesis, Universidad Politécnica Salesiana]. https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13913/6/UPS-QT01573.pdf

Berkhout, B., van Wamel, J. L. B., Beljaars, L., Meijer, D. K. F., Visser, S., & Floris, R. (2002). Characterization of the anti-HIV effects of native lactoferrin and other milk proteins and protein-derived peptides. *Antiviral Research*, *55*(2), 341-355. https://doi.org/10.1016/S0166-3542(02)00069-4

Biernbaum, E. N., Gnezda, A., Akbar, S., Franklin, R., Venturelli, P. A., & McKillip, J. L. (2021). Lactoferrin as an antimicrobial against Salmonella enterica and Escherichia coli O157:H7 in raw milk. *JDS Communications*, *2*(3), 92-97. https://doi.org/10.3168/jdsc.2020-0030

Blanca Hernández-Ledesma, Dávalos, A., Bartolomé, B., & Amigo, L. (2005). Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from α-Lactalbumin and β-Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(3), 588-593. https://doi.org/10.1021/jf048626m

Bojsen, A., Buesa, J., Montava, R., Kvistgaard, A., Kongsbak, M., Petersen, T., Heegaard, C., & Rasmussen, J. (2007). Inhibitory activities of bovine macromolecular whey proteins on rotavirus infections in vitro and in vivo. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*, *90*(1), 66-74. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72609-7

Borges, T. H., Serna, A., López, L. C., Lara, L., Nieto, R., & Seiquer, I. (2019). Composition and Antioxidant Properties of Spanish Extra Virgin Olive Oil Regarding Cultivar, Harvest Year and Crop Stage. *Antioxidants*, *8*(7), Article 7. https://doi.org/10.3390/antiox8070217

Bouzerzour, K., Morgan, F., Cuinet, I., Bonhomme, C., Jardin, J., Le Huërou-Luron, I., & Dupont, D. (2012). *In vivo* digestion of infant formula in piglets: Protein digestion kinetics and release of bioactive peptides. *British Journal of Nutrition*, *108*(12), 2105-2114. https://doi.org/10.1017/S000711451200027X

Brandelli, A., Daroit, D., & Correa, A. (2015a). Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *FOOD RESEARCH INTERNATIONAL*, *73*, 149-161. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.016

Brandelli, A., Daroit, D., & Correa, A. (2015b). Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *FOOD RESEARCH INTERNATIONAL*, *73*, 149-161. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.016

Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., … Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, *14*(4), Article 4. https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1

Broersen, K. (2020). Milk Processing Affects Structure, Bioavailability and Immunogenicity of β-lactoglobulin. *Foods*, *9*(7), Article 7. https://doi.org/10.3390/foods9070874

Brożek, O. M., Kiełczewska, K., & Bohdziewicz, K. (2022). Physicochemical and Sensory Properties with Special Emphasis on Thermal Characteristics of Whey Butter from Gouda Cheese Production Compared to Milk Butter. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, *72*(4), 407-419. https://doi.org/10.31883/pjfns/155838

Bruni, N., Capucchio, M. T., Biasibetti, E., Pessione, E., Cirrincione, S., Giraudo, L., Corona, A., & Dosio, F. (2016). Antimicrobial Activity of Lactoferrin-Related Peptides and Applications in Human and Veterinary Medicine. *Molecules*, *21*(6), Article 6. https://doi.org/10.3390/molecules21060752

Buchanan, D., Martindale, W., Romeih, E., & Hebishy, E. (2023). Recent advances in whey processing and valorisation: Technological and environmental perspectives. *International Journal of Dairy Technology*, *76*(2), 291-312. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12935

Buggy, A. K., McManus, J. J., Brodkorb, A., Carthy, N. M., & Fenelon, M. A. (2017). Stabilising effect of α-lactalbumin on concentrated infant milk formula emulsions heat treated pre- or post-homogenisation. *Dairy Science & Technology*, *96*(6), 845-859. https://doi.org/10.1007/s13594-016-0306-1

Burd, N. A., & Phillips, S. M. (2010). Fast whey protein and the leucine trigger. *Nutrafoods*, *9*(4), 7-11. https://doi.org/10.1007/BF03223343

Bustos, E. (2018). *Análisis Gastronómico de la Colada de Churos (Ampullariidae) en la ciudad de Ibarra, Provincia de Imbabura*.

http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/40205/1/TESIS-COLADA-DE-CHUROS.pdf

Caldwell, G. (2016). *Mastering Basic Cheesemaking: The Fun and Fundamentals of Making Cheese at Home* (Primera, Vol. 1). New Society Publishers. https://books.google.co.ve/books?hl=es&id=04jICgAAQBAJ&q=Salud#v=onepage&q=suero&f=false

Cantón, E. (2016). *ESTUDIO DEL DISEÑO DE UNA PLANTA DE PROCESADO PARA EL APROVECHAMIENTO DE LACTOSUERO DE QUESERÍA*. 90.

Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *24*(8), 1415-1422. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001

Cataldi, T. R., Angelotti, M., D'Erchia, L., Altieri, G., & Di Renzo, G. C. (2003). Ion-exchange chromatographic analysis of soluble cations, anions and sugars in milk whey. *European Food Research and Technology*, *216*(1), 75-82. https://doi.org/10.1007/s00217-002-0598-7

Cedeño, M. M., Tamayo, L. D. Y., & Ramírez-Cárdenas, L. (2018). Elaboración de una bebida utilizando subproductos de la industria láctea. *Enfoque UTE*, *9*(2), 59-69. https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v9n2.295

Cervantes, L., Tello, M., & Moreno, Á. (2018). *La reutilización del lacto suero: Una forma de disminuir los impactos ambientales y obtener energía alternativa* (Vol. 1). https://www.researchgate.net/publication/332554062_La_reutilizacion_del_lacto_suero_Una_forma_de_disminuir_los_impactos_ambientales_y_obtener_energia_alternativa

Çetinkaya, A. (2021). A Research on Determination of Some Properties of Butter Made from Creams Extracted from Whey and Milk. *European Journal of Agriculture and Food Sciences*, *3*(4), Article 4. https://doi.org/10.24018/ejfood.2021.3.4.321

Chacón, L. (2017). Proteínas del lactosuero:Usos, relación con la salud y bioactividades. *Redalyc.org*, *42*, 8.

Chamata, Y., Jackson, K. G., Watson, K. A., & Jauregi, P. (2021). Whey-Derived Peptides at the Heart of the COVID-19 Pandemic. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(21), Article 21. https://doi.org/10.3390/ijms222111662

Chanput, W., Nakai, S., & Theerakulkait, C. (2010). Introduction of New Computer Softwares for Classification and Prediction Purposes of Bioactive Peptides: Case Study in

Antioxidative Tripeptides. *International Journal of Food Properties*, *13*(5), 947-959. https://doi.org/10.1080/10942910902927102

Chatterton, D. E. W., Smithers, G., Roupas, P., & Brodkorb, A. (2006). Bioactivity of β-lactoglobulin and α-lactalbumin—Technological implications for processing. *International Dairy Journal*, *16*(11), 1229-1240. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.001

Chauvet, L., Ménard, O., Le Gouar, Y., Henry, G., Jardin, J., Hennetier, M., Croguennec, T., Van Audenhaege, M., Dupont, D., Lemaire, M., Le Huërou-Luron, I., & Deglaire, A. (2023). Protein ingredient quality of infant formulas impacts their structure and kinetics of proteolysis under in vitro dynamic digestion. *Food Research International*, *169*, 112883. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112883

Chavan, M., Yogesh, G., Harmalkat, M., & Waghmare, R. (2018). *Development of non-dairy fermented probiotic drink based on germinated and ungerminated cereals and legume*. *91*, 339-344. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.070

Chen, G. Q., Qu, Y., Gras, S. L., & Kentish, S. E. (2023). Separation Technologies for Whey Protein Fractionation. *Food Engineering Reviews*. https://doi.org/10.1007/s12393-022-09330-2

Chen, Y., Liu, W., Xue, J., Yang, J., Chen, X., Shao, Y., Kwok, L., Bilige, M., Mang, L., & Zhang, H. (2014). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of Lactobacillus helveticus strains from traditional fermented dairy foods and antihypertensive effect of fermented milk of strain H9. *Journal of Dairy Science*, *97*(11), 6680-6692. https://doi.org/10.3168/jds.2014-7962

Chourasia, R., Phukon, L. C., Abedin, M. M., Padhi, S., Singh, S. P., & Rai, A. K. (2022). Whey valorization by microbial and enzymatic bioprocesses for the production of nutraceuticals and value-added products. *Bioresource Technology Reports*, *19*, 101144. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101144

Cintineo, H. P., Arent, M. A., Antonio, J., & Arent, S. M. (2018). Effects of Protein Supplementation on Performance and Recovery in Resistance and Endurance Training. *Frontiers in Nutrition*, *5*. https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00083

Clare, D. A., & Swaisgood, H. E. (2000). Bioactive Milk Peptides: A Prospectus1. *Journal of Dairy Science*, *83*(6), 1187-1195. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74983-6

Comar, C. L., Nold, M. M., & Wasserman, R. H. (1956). The influence of amino acids and other organic compounds on the gastrointestinal absorption of calcium 45 and strontium

89 in the rat. *The Journal of Nutrition*, *59*(3), 371-383. https://doi.org/10.1093/jn/59.3.371

Considine, T., Flanagan, J., Loveday, S. M., & Ellis, A. (2020). Chapter 14—Interaction between milk proteins and micronutrients. En M. Boland & H. Singh (Eds.), *Milk Proteins (Third Edition)* (pp. 537-571). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815251-5.00014-1

Coronado H, M., Vega y León, S., Gutiérrez T, R., Vázquez F, M., & Radilla V, C. (2015). Antioxidantes: Perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, *42*(2), 206-212. https://doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014

Corrochano, A., Arranz, E., De Noni, I., Stuknytė, M., Ferraretto, A., Kelly, P. M., Buckin, V., & Giblin, L. (2018). Intestinal health benefits of bovine whey proteins after simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, *49*, 526-535. https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.08.043

Corrochano, A. R., Ferraretto, A., Arranz, E., Stuknytė, M., Bottani, M., O'Connor, P. M., Kelly, P. M., De Noni, I., Buckin, V., & Giblin, L. (2019). Bovine whey peptides transit the intestinal barrier to reduce oxidative stress in muscle cells. *Food Chemistry*, *288*, 306-314. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.009

Corrochano, A. R., Sariçay, Y., Arranz, E., Kelly, P. M., Buckin, V., & Giblin, L. (2019). Comparison of antioxidant activities of bovine whey proteins before and after simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Dairy Science*, *102*(1), 54-67. https://doi.org/10.3168/jds.2018-14581

Corrochano, Buckin, V., Kelly, P. M., & Giblin, L. (2018). Invited review: Whey proteins as antioxidants and promoters of cellular antioxidant pathways. *Journal of Dairy Science*, *101*(6), 4747-4761. https://doi.org/10.3168/jds.2017-13618

Cortez Latorre, J. D. (2018). *Lechería e industria quesera en la República del Ecuador* [Universidad Nacional del Litoral]. https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/1162/TFI.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Costa, C. E., Carvalho, P., & Domingues, L. (2022). Strategic combination of different promoters in lactose metabolisation and host chassis selection for high bioethanol titres from dairy wastes. *Bioresource Technology Reports*, *19*, 101131. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101131

Crawford. (2011). *Equilibrio entre el sodio y el potasio*. https://www.elsevier.es/es-revista-nursing-20-pdf-S021253821170293X

Crowley, S. V., Dowling, A. P., Caldeo, V., Kelly, A. L., & O'Mahony, J. A. (2016). Impact of α-lactalbumin:β-lactoglobulin ratio on the heat stability of model infant milk formula protein systems. *Food Chemistry*, *194*, 184-190. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.077

De boer, R. (2014). Reuse. En *From Milk By-Products to Milk Ingredients* (1era., pp. 97-111). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/9781118598634.ch4

Deeth, H., & Bansal, N. (2019). Chapter 1 - Whey Proteins: An Overview. En H. C. Deeth & N. Bansal (Eds.), *Whey Proteins* (pp. 1-50). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00001-1

Del Castillo, R., & Lagarriga, J. (2004). *Productos Lácteos Tecnología* (UPC, Vol. 1). Barcelona : Edicions UPC. https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.3/36810/9788498802610.pdf

Devries, M. C., McGlory, C., Bolster, D. R., Kamil, A., Rahn, M., Harkness, L., Baker, S. K., & Phillips, S. M. (2018). Protein leucine content is a determinant of shorter- and longer-term muscle protein synthetic responses at rest and following resistance exercise in healthy older women: A randomized, controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *107*(2), 217-226. https://doi.org/10.1093/ajcn/nqx028

Dinika, I., Verma, D. K., Balia, R., Utama, G. L., & Patel, A. R. (2020). Potential of cheese whey bioactive proteins and peptides in the development of antimicrobial edible film composite: A review of recent trends. *Trends in Food Science & Technology*, *103*, 57-67. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.017

Domínguez-Puerto, R., Valle-Guadarrama, S., Guerra-Ramírez, D., & Hahn-Schlam, F. (2018). Purification and concentration of cheese whey proteins through aqueous two phase extraction. *CyTA - Journal of Food*, *16*(1), 452-459. https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1420100

Dragone, G., Mussatto, S. I., Oliveira, J. M., & Teixeira, J. A. (2009). Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chemistry*, *112*(4), 929-935. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.005

Drucker, D. J., & Nauck, M. A. (2006). The incretin system: Glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet (London, England)*, *368*(9548), 1696-1705. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69705-5

Du, Q., Wang, S., Lyu, F., Liu, J., & Ding, Y. (2021). The interfacial covalent bonding of whey protein hydrolysate and pectin under high temperature sterilization: Effect on emulsion

stability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *206*, 111936. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111936

Dubeau, S., Samson, G., & Tajmir-Riahi, H.-A. (2010). Dual effect of milk on the antioxidant capacity of green, Darjeeling, and English breakfast teas. *Food Chemistry*, *122*(3), 539-545. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.005

Eckert, E., Bamdad, F., & Chen, L. (2014). Metal solubility enhancing peptides derived from barley protein. *Food Chemistry*, *159*, 498-506. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.061

Eisele, T., Stressler, T., Kranz, B., & Fischer, L. (2013). Bioactive peptides generated in an enzyme membrane reactor using Bacillus lentus alkaline peptidase. *European Food Research and Technology*, *236*(3), 483-490. https://doi.org/10.1007/s00217-012-1894-5

En Tay, R. R., Agatha, T., Somang, G., Yuliarti, O., & Lin Tan, E. L. (2022). Structuring wheat flour-based crackers using whey protein isolate. *International Dairy Journal*, *128*, 105314. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105314

Erdmann, K., Cheung, B. W. Y., & Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *19*(10), 643-654. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.11.010

Escobar, E. (2002). Hypertension and coronary heart disease. *Journal of Human Hypertension*, *16*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1001345

Fang, T., & Guo, M. (2019). Physicochemical, texture properties, and microstructure of yogurt using polymerized whey protein directly prepared from cheese whey as a thickening agent. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*, *102*(9), 7884-7894. https://doi.org/10.3168/jds.2018-16188

FAO. (2022). *Dairy Market Review – Emerging trends and outlook 2022*. https://www.fao.org/3/cc3418en/cc3418en.pdf

Farnaud, S., & Evans, R. W. (2003). Lactoferrin—A multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*, *40*(7), 395-405. https://doi.org/10.1016/S0161-5890(03)00152-4

Fernández. (2017). *Evaluation of Antioxidant, Antiglycant and ACE-Inhibitory Activity in Enzymatic Hydrolysates of α-Lactalbumin*. https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=73449

Fernández-Fernández, A. M., Dumay, E., López-Pedemonte, T., & Medrano-Fernandez, A. (2018). Bioaccessibility and Cell Metabolic Activity Studies of Antioxidant Low Molecular Weight Peptides Obtained by Ultrafiltration of α-Lactalbumin Enzymatic Hydrolysates. *Food and Nutrition Sciences*, *9*(9), Article 9. https://doi.org/10.4236/fns.2018.99077

Fernández-Regatillo, M. M. (1987). *Principios básicos para la fabricación de quesos*. Madrid : Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Servicio de Extensión Agraria, D.L. 1987. https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1987_13.pdf

Ferreiro, T., & Rodríguez-Otero, J. L. (2018). Evolution and distribution of phospholipids in cheese and whey during the manufacturing of fresh cheese from cows' milk. *International Journal of Dairy Technology*, *71*(3), 820-823. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12499

Ferrín, C. (2019). *Efecto del suero de leche en diferentes niveles para la alimentación de porcinos de raza Yorkshire en etapas de crecimiento y engorde* [ESPE]. http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/21411/2/T-ESPE-003047.pdf

FitzGerald, R. J., Murray, B. A., & Walsh, D. J. (2004). Hypotensive Peptides from Milk Proteins. *The Journal of Nutrition*, *134*(4), 980S-988S. https://doi.org/10.1093/jn/134.4.980S

Foegeding, E. A., Davis, J. P., Doucet, D., & McGuffey, M. K. (2002). Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, *13*(5), 151-159. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00111-5

Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, *226*(1), 497-509. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5

Fordtran, J. S., Rector, F. C., & Carter, N. W. (1968). The mechanisms of sodium absorption in the human small intestine. *Journal of Clinical Investigation*, *47*(4), 884-900. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC297237/

Francis, & Wiley. (2000). *Food Science and Technology* (2da., Vol. 4). Wiley. https://books.google.co.ve/books?id=qOdUAAAAMAAJ

Fuchs, F. D., & Whelton, P. K. (2020). High Blood Pressure and Cardiovascular Disease. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *75*(2), 285-292. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14240

Gambacorta, N., Caputo, L., Quintieri, L., Monaci, L., Ciriaco, F., & Nicolotti, O. (2022). Rational Discovery of Antiviral Whey Protein-Derived Small Peptides Targeting the

SARS-CoV-2 Main Protease. *Biomedicines*, *10*(5), Article 5. https://doi.org/10.3390/biomedicines10051067

Gantner, V. (2015). The overall and fat composition of milk of various species. *Mljekarstvo*, 223-231. https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2015.0401

García, C., González, L., Castañeda, A., Contreras, E., & Ayala, A. (2019). Capacidad antioxidante de un concentrado de proteínas de lactosuero hidrolizadas por fermentación con Lactobacillus casei Shirota enriquecido con selenio inorgánico. *FCB*, *4*(4), 147-154.

García-Garibay, M., Jiménez-Guzmán, J., & Hernández-Sánchez, H. (2008). Whey Proteins: Bioengineering and Health. En G. F. Gutiérrez-López, G. V. Barbosa-Cánovas, J. Welti-Chanes, & E. Parada-Arias (Eds.), *Food Engineering: Integrated Approaches* (pp. 415-430). Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75430-7_31

García-Montoya, I. A., Cendón, T. S., Arévalo-Gallegos, S., & Rascón-Cruz, Q. (2012). Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1820*(3), 226-236. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.018

Gauthier, S. F., Pouliot, Y., & Saint-Sauveur, D. (2006). Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*, *16*(11), 1315-1323. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.014

Geng, L., Li, M., Zhang, G., & Ye, L. (2022). Barley: A potential cereal for producing healthy and functional foods. *Food Quality and Safety*, *6*, fyac012. https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyac012

Ghaly, A. E., & Kamal, M. A. (2004). Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research*, *38*(3), 631-644. https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.10.019

Glass, L., & Hedrick, T. I. (1977). Nutritional Composition of Sweet- and Acid-type Dry Wheys. II. Vitamin, Mineral, and Calorie Contents1. *Journal of Dairy Science*, *60*(2), 190-196. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(77)83853-8

Gómez Soto, J. A., & Sánchez Toro, Ó. J. (2019). Production of galactooligosaccharides: Alternative for the use of whey. A review. *Ingeniería y Desarrollo*, *37*(1), 129-157. https://doi.org/10.14482/inde.37.1.637

González, D. (2019). *OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO PRODUCTIVO DEL QUESO FRESCO DE CABRA A NIVEL ARTESANAL EN LA REGIÓN SEMIÁRIDA DEL ESTADO LARA*.

http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/20560/1/TESIS%20DOCTORAL%20DEOKIE%20GONZALEZ%20%28CTA%29%202019.pdf

González-Torres, I., González, P., Cobas, N., Barrios, J. C., Vázquez, L., Purriños, L., Franco, D., Domínguez, R., & Lorenzo-Rodriguez, J. M. (2020). Influencia de la alimentación líquida con suero de leche en el perfil de ácidos grasos del chorizo gallego. *Informacion Tecnica Economica Agraria*, *117*(1), 19-31. https://doi.org/10.12706/itea.2020.012

Goode, K., Bowen, J., Akhtar, N., Robbins, P., & Fryer, P. (2013). The effect of temperature on adhesion forces between surfaces and model foods containing whey protein and sugar. *JOURNAL OF FOOD ENGINEERING*, *118*(4), 371-379. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.03.016

Goulart, A. J., Bassan, J. C., Barbosa, O. A., Marques, D. P., Silveira, C. B., Santos, A. F., Garrido, S. S., Resende, F. A., Contiero, J., & Monti, R. (2014). Transport of amino acids from milk whey by Caco-2 cell monolayer after hydrolytic action of gastrointestinal enzymes. *Food Research International*, *63*, 62-70. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.037

Goulas, A., Tzortzis, G., & Gibson, G. R. (2007). Development of a process for the production and purification of α- and β-galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *International Dairy Journal*, *17*(6), 648-656. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.08.010

Goulding, D. A., Fox, P. F., & O'Mahony, J. A. (2020). Chapter 2 - Milk proteins: An overview. En M. Boland & H. Singh (Eds.), *Milk Proteins (Third Edition)* (pp. 21-98). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815251-5.00002-5

Grandison, A. S., Ford, G. D., Owen, A. J., & Millard, D. (1984). Chemical composition and coagulating properties of renneted Friesian milk during the transition from winter rations to spring grazing. *Journal of Dairy Research*, *51*(1), 69-78. https://doi.org/10.1017/S0022029900023335

Grimley, H., Grandison, A., & Lewis, M. (2009). Changes in milk composition and processing properties during the spring flush period. *Dairy Science & Technology*, *89*(3), 405-416. https://doi.org/10.1051/dst/2009016

Gu, F., Liang, S., Zhu, S., Liu, J., & Sun, H.-Z. (2021). Multi-omics revealed the effects of rumen-protected methionine on the nutrient profile of milk in dairy cows. *Food Research International*, *149*, 110682. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110682

Guefai, F. Z., Martínez-Rodríguez, A., Grindlay, G., Mora, J., & Gras, L. (2022). Elemental bioavailability in whey protein supplements. *Journal of Food Composition and Analysis*, *112*, 104696. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104696

Guevara, L., & León, R. (2019). *Aprovechamiento del lactosuero dulce en la elaboración de un alimento enriquecido con Hordeum vulgare y Passiflora edulis* [Universidad de Guayaquil]. http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/46769/1/BINGQ-GS-19P78.pdf

Guimarães Drummond E Silva, F., Miralles, B., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Iglesias, A. H., Reyes Reyes, F. G., & Netto, F. M. (2017). Influence of protein-phenolic complex on the antioxidant capacity of flaxseed (Linum usitatissimum L.) product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(4), 800-809. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04639

Guinee, T. P. (2021). Effect of high-temperature treatment of milk and whey protein denaturation on the properties of rennet–curd cheese: A review. *International Dairy Journal*, *121*, 105095. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105095

Guo, B., Hu, X., Wu, J., Chen, R., Dai, T., Liu, Y., Luo, S., & Liu, C. (2021). Soluble starch/whey protein isolate complex-stabilized high internal phase emulsion: Interaction and stability. *Food Hydrocolloids*, *111*, 106377. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106377

Gutiérrez-Cortés, C., Suarez, H., Buitrago, G., Nero, L. A., & Todorov, S. D. (2018). Enhanced Bacteriocin Production by Pediococcus pentosaceus 147 in Co-culture With Lactobacillus plantarum LE27 on Cheese Whey Broth. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2952. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02952

Hall. (1970). Seasonal and regional variations in the fatty acid composition of milk fat. *Dairy Industries*, *35*, 20-24. https://doi.org/10.5555/19701407010

Hall, & Lehmann. (1944). Experiments on the practicability of increasing calcium absorption with protein derivatives. *Biochemical Journal*, *38*(1), 117-119. https://doi.org/10.1042/bj0380117

Haque, E., Chand, R., & Kapila, S. (2008). Biofunctional Properties of Bioactive Peptides of Milk Origin. *Food Reviews International*, *25*(1), 28-43. https://doi.org/10.1080/87559120802458198

Harasym, J., & Oledzki, R. (2014). Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. *Nutrition*, *30*(5), 511-517. https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.08.019

Haro, A., Trescastro, A., Lara, L., Fernández-Fígares, I., Nieto, R., & Seiquer, I. (2020). Mineral elements content of wild growing edible mushrooms from the southeast of Spain. *Journal of Food Composition and Analysis*, *91*, 103504. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103504

Hati, S., Patel, N., Sakure, A., & Mandal, S. (2018). Influence of Whey Protein Concentrate on the Production of Antibacterial Peptides Derived from Fermented Milk by Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *24*(1), 87-98. https://doi.org/10.1007/s10989-017-9596-2

Hausjell, J., Miltner, M., Herzig, C., Limbeck, A., Saracevic, Z., Saracevic, E., Weissensteiner, J., Molitor, C., Halbwirth, H., & Spadiut, O. (2019). Valorisation of cheese whey as substrate and inducer for recombinant protein production in E. coli HMS174(DE3). *Bioresource Technology Reports*, *8*, 100340. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100340

He, X., Luan, F., Yang, Y., Wang, Z., Zhao, Z., Fang, J., Wang, M., Zuo, M., & Li, Y. (2020). Passiflora edulis: An Insight Into Current Researches on Phytochemistry and Pharmacology. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 2-11. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00617

He, Z., Yuan, B., Zeng, M., Tao, G., & Chen, J. (2015). Effect of simulated processing on the antioxidant capacity and in vitro protein digestion of fruit juice-milk beverage model systems. *Food Chemistry*, *175*, 457-464. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.007

Heck, J. M. L., Valenberg, H. J. F. van, Dijkstra, J., & Hooijdonk, A. C. M. van. (2009). Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. *Journal of Dairy Science*, *92*(10), 4745-4755. https://doi.org/10.3168/jds.2009-2146

Hernández-Ledesma, B. (2002). *Caracterización y bioactividad de péptidos obtenidos a partir de proteínas lácteas mediante hidrólisis enzimática y procesos fermentativos* [Tesis Doctoral, Complutense de Madrid]. https://digital.csic.es/handle/10261/101499

Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., & Recio, I. (2004). Release of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides by simulated gastrointestinal digestion of infant formulas. *International Dairy Journal*, *14*(10), 889-898. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.02.011

Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Recio, I., & Bartolomé, B. (2007). ACE-inhibitory and radical-scavenging activity of peptides derived from beta-lactoglobulin f(19-25).

Interactions with ascorbic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(9), 3392-3397. https://doi.org/10.1021/jf063427j

Hernández-Ledesma, B., García-Nebot, M. J., Fernández-Tomé, S., Amigo, L., & Recio, I. (2014). Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. *International Dairy Journal*, *38*(2), 82-100. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.11.004

Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., & Gómez-Ruiz, J. Á. (2011). Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant Research*, *101*(1), 196-204. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.040

Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Recio, I., & Amigo, L. (2006). Effect of β-lactoglobulin hydrolysis with thermolysin under denaturing temperatures on the release of bioactive peptides. *Journal of Chromatography A*, *1116*(1), 31-37. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.006

Hernández-Nieto, R. (2002). *Contributions To Statistical Analysis: The Coefficients of Proportional Variance, Content Validity and Kappa* (CreateSpace Independent Publishing Platform, Vol. 1). CreateSpace Independent Publishing Platform, 2002. http://www.revencyt.ula.ve/storage/repo/ArchivoDocumento/cipo/v23/articulo10.pdf

Herreman, L., Nommensen, P., Pennings, B., & Laus, M. C. (2020). Comprehensive overview of the quality of plant- And animal-sourced proteins based on the digestible indispensable amino acid score. *Food Science & Nutrition*, *8*(10), 5379-5391. https://doi.org/10.1002/fsn3.1809

Herrera-Ponce, A. L., Alarcón-Rojo, A. D., Salmeron, I., Rodríguez-Figueroa, J. C., Herrera-Ponce, A. L., Alarcón-Rojo, A. D., Salmeron, I., & Rodríguez-Figueroa, J. C. (2019). Efectos fisiológicos de los péptidos bioactivos derivados de las proteínas del lactosuero en la salud: Una revisión. *Revista chilena de nutrición*, *46*(2), 205-214. https://doi.org/10.4067/s0717-75182019000200205

Hill, T. R., Verlaan, S., Biesheuvel, E., Eastell, R., Bauer, J. M., Bautmans, I., Brandt, K., Donini, L. M., Maggio, M., Mets, T., Seal, C. J., Wijers, S. L., Sieber, C., Cederholm, T., & Aspray, T. J. (2019). A Vitamin D, Calcium and Leucine-Enriched Whey Protein Nutritional Supplement Improves Measures of Bone Health in Sarcopenic Non-Malnourished Older Adults: The PROVIDE Study. *Calcified Tissue International*, *105*(4), 383-391. https://doi.org/10.1007/s00223-019-00581-6

Hirayama, K., Akashi, S., Furuya, M., & Fukuhara, K. (1990). Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and frit-FAB LC/MS.

Biochemical and Biophysical Research Communications, *173*(2), 639-646. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)80083-X

Houde, M., Khodaei, N., & Karboune, S. (2018). Assessment of interaction of vanillin with barley, pea and whey proteins: Binding properties and sensory characteristics. *LWT*, *91*, 133-142. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.022

Huanca, W. (2017). *"FortalecimientodelasMipymesyOrganizaciones Empresariales Regionales" ELABORACIÓN DE QUESOS*. https://www.perucamaras.org.pe/pdf/bv/46-Elaboracion_Quesos_Region_Puno.pdf

Huertas Méndez, N. D. J., Vargas Casanova, Y., Gómez Chimbi, A. K., Hernández, E., Leal Castro, A. L., Melo Diaz, J. M., Rivera Monroy, Z. J., & García Castañeda, J. E. (2017). Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Antimicrobial Activity against E. coli ATCC 11775, S. maltophilia ATCC 13636 and S. enteritidis ATCC 13076. *Molecules*, *22*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/molecules22030452

Iadecola, C., & Davisson, R. L. (2008). Hypertension and cerebrovascular dysfunction. *Cell Metabolism*, *7*(6), 476-484. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.03.010

INEC. (2021). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua 2020*. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2020/Presentacion%20ESPAC%202020.pdf

INEC. (2023). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC 2022*. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2022/PPT_%20ESPAC_%202022_04.pdf

INEN. (2011). *Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2594:2011 Suero de leche Líquido :Requisitos*. https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/2594.pdf

Innocente, N., Corradini, C., Blecker, C., & Paquot, M. (1998). Dynamic Surface Properties of the Proteose-Peptone Fraction of Bovine Milk. *Journal of Dairy Science*, *81*(7), 1833-1839. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75753-4

Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. (1997). Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. En *Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride* (p. 432). National Academies Press (US). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK109825/ doi: 10.17226/5776

Iskandar, M. M., Dauletbaev, N., Kubow, S., Mawji, N., & Lands, L. C. (2013). Whey protein hydrolysates decrease IL-8 secretion in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated respiratory epithelial cells by affecting LPS binding to Toll-like receptor 4. *The British Journal of Nutrition*, *110*(1), 58-68. https://doi.org/10.1017/S0007114512004655

Jacquot, A., Gauthier, S. F., Drouin, R., & Boutin, Y. (2010). Proliferative effects of synthetic peptides from β-lactoglobulin and α-lactalbumin on murine splenocytes. *International Dairy Journal*, *20*(8), 514-521. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.02.013

Jalao, I. F. (2020). *Influencia de la matriz alimentaria y el procesado en la estabilidad, bioaccesibilidad y metabolismo de compuestos fenólicos naturales en un modelo dinámico de digestión gastrointestinal y fermentación colónica* [Tesis Doctoral, Complutense de Madrid]. https://docta.ucm.es/entities/publication/ed5073bb-266e-4bb0-bf35-555fb5cfe6b5

Jobara, K., Kaido, T., Hori, T., Iwaisako, K., Endo, K., Uchida, Y., & Uemoto, S. (2014). Whey-hydrolyzed peptide-enriched immunomodulating diet prevents progression of liver cirrhosis in rats. *Nutrition*, *30*(10), 1195-1207. https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.02.005

Jones, A. O. L., Fox, M. R. S., & Fry, B. E. Jr. (1985). In vitro assessment of zinc binding to protein foods as a potential index of zinc bioavailability. Comparison of in vitro and in vivo data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *33*(6), 1123-1128. https://doi.org/10.1021/jf00066a026

Jung, H., Jung, D., Lee, J., Ki, W., Lee, J.-M., Kim, E.-M., Nam, M. S., & Kim, K. K. (2022). Bioactive peptides in the pancreatin-hydrolysates of whey protein support cell proliferation and scavenge reactive oxygen species. *Animal Cells and Systems*, *26*(5), 232-242. https://doi.org/10.1080/19768354.2022.2130425

Kadyan, S., & Pradhan, D. (2020). Antifungal Lactic Acid Bacteria (LAB): Potential Use in Food Systems. En *Novel Strategies to Improve Shelf-Life and Quality of Foods* (1era., Vol. 1, p. 348). Apple Academic Press. https://doi.org/10.1201/9781003010272

Kamau, S. M., Cheison, S. C., Chen, W., Liu, X.-M., & Lu, R.-R. (2010). Alpha-Lactalbumin: Its Production Technologies and Bioactive Peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*(2), 197-212. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00100.x

Kankanamge, R., Jeewanthi, C., Paik, H., Kim, M., Lee, N., Kim, S., & Yoon, Y. (2014). Characteristics of whey protein hydrolysates from cheese whey, favors on various food

application. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, *20*(4), 503-509. https://doi.org/10.2298/CICEQ130221032J

Kannel, W. B., Sorlie, P., Castelli, W. P., & McGee, D. (1980). Blood pressure and survival after myocardial infarction: The Framingham study. *The American Journal of Cardiology*, *45*(2), 326-330. https://doi.org/10.1016/0002-9149(80)90654-2

Karbasi, M., & Askari, G. (2021). Modification of whey protein microgel particles with mono- oligo- and polysaccharides through the Maillard reaction: Effects on structural and techno-functional properties. *Food Structure*, *28*, 100184. https://doi.org/10.1016/j.foostr.2021.100184

Kareb, O., & Aïder, M. (2019). Whey and Its Derivatives for Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Functional Foods: A Critical Review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *11*(2), 348-369. https://doi.org/10.1007/s12602-018-9427-6

Kasapcopur, E., Mohammed, A. M., & Colakoglu, A. S. (2021). Effects of differences in whey composition on the physicochemical properties of whey butter. *International Journal of Dairy Technology*, *74*(3), 535-546. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12782

Kaur, R., Panwar, D., & Panesar, P. S. (2020). Chapter 13—Biotechnological approach for valorization of whey for value-added products. En M. R. Kosseva & C. Webb (Eds.), *Food Industry Wastes (Second Edition)* (Segunda, Vol. 2, pp. 275-302). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817121-9.00013-9

Kaur, S., Huppertz, T., & Vasiljevic, T. (2022). Actinidin-induced hydrolysis of milk proteins: Effect on antigenicity. *LWT*, *161*. Scopus. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113294

Keba, A., Hailu, M., Teshome, G., & Agaza, B. (2018). *Development of Beverages from Traditional Whey and Natural Fruit Juices* (Kibrom Birhane and Abebe Kirub). https://n9.cl/74cb5

Kelly, P. M. (2022). Whey Powder, Demineralized Whey Powder and Delactosed Whey. En P. L. H. McSweeney & J. P. McNamara (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Third Edition)* (pp. 174-185). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00162-8

Kerasioti, E., Stagos, D., Tzimi, A., & Kouretas, D. (2016). Increase in antioxidant activity by sheep/goat whey protein through nuclear factor-like 2 (Nrf2) is cell type dependent. *Food and Chemical Toxicology*, *97*, 47-56. https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.022

Kilara, A., & Panyam, D. (2003). Peptides From Milk Proteins and Their Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *43*(6), 607-633. https://doi.org/10.1080/10408690390251138

Kim, D.-J., Kang, M.-J., Choi, J.-A., Na, D.-S., Kim, J.-B., Na, C.-S., & Park, J.-H. (2016). Anti-Helicobacter pylori activity of crude N-acetylneuraminic acid isolated from glycomacropeptide of whey. *Laboratory Animal Research*, *32*(2), 99-104. https://doi.org/10.5625/lar.2016.32.2.99

Kim, J., Kim, H. K., Kim, S., Imm, J.-Y., & Whang, K.-Y. (2015). Whey Protein Concentrate Hydrolysate Prevents Bone Loss in Ovariectomized Rats. *Journal of Medicinal Food*, *18*(12), 1349-1356. https://doi.org/10.1089/jmf.2015.3441

Kim, & Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*, *2*(1), 1-9. https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.01.003

Kitts, D., & Weiler, K. (2003). Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. *Current Pharmaceutical Design*, *9*(16), 1309-1323. https://doi.org/10.2174/1381612033454883

Knob, A., Izidoro, S. C., Lacerda, L. T., Rodrigues, A., & de Lima, V. A. (2020). A novel lipolytic yeast Meyerozyma guilliermondii: Efficient and low-cost production of acid and promising feed lipase using cheese whey. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *24*, 101565. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101565

Kodjoe, E. (2022). Low sodium intake and cardiovascular disease mortality among adults with hypertension. *International Journal of Cardiology Cardiovascular Risk and Prevention*, *15*, 200158. https://doi.org/10.1016/j.ijcrp.2022.200158

Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, *16*(9), 945-960. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012

Kotha, R. R., Tareq, F. S., Yildiz, E., & Luthria, D. L. (2022). Oxidative Stress and Antioxidants—A Critical Review on In Vitro Antioxidant Assays. *Antioxidants*, *11*(12), Article 12. https://doi.org/10.3390/antiox11122388

Kramer, J. K. G., & Zhou, J. (2001). Conjugated linoleic acid and octadecenoic acids: Extraction and isolation of lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *103*(9), 594-600. https://doi.org/10.1002/1438-9312(200109)103:9<594::AID-EJLT5942>3.0.CO;2-R

Kresic, G., Lelas, V., Herceg, Z., & Rezek, A. (2006). Effects of high pressure on functionality of whey protein concentrate and whey protein isolate. *LAIT*, *86*(4), 303-315. https://doi.org/10.1051/lait:2006012

Lacroix, I. M. E., & Li-Chan, E. C. Y. (2014). Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity from pepsin-treated bovine whey proteins. *Peptides*, *54*, 39-48. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.01.002

Lacroix, I. M. E., Meng, G., Cheung, I. W. Y., & Li-Chan, E. C. Y. (2016). Do whey protein-derived peptides have dual dipeptidyl-peptidase IV and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities? *Journal of Functional Foods*, *21*, 87-96. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.038

Lamothe, S., Guérette, C., Dion, F., Sabik, H., & Britten, M. (2019). Antioxidant activity of milk and polyphenol-rich beverages during simulated gastrointestinal digestion of linseed oil emulsions. *Food Research International*, *122*, 149-156. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.068

Lands, L. C., Grey, V. L., & Smountas, A. A. (1999). Effect of supplementation with a cysteine donor on muscular performance. *Journal of Applied Physiology*, *87*(4), 1381-1385. https://doi.org/10.1152/jappl.1999.87.4.1381

Larsen, M. K., Nielsen, J. H., Butler, G., Leifert, C., Slots, T., Kristiansen, G. H., & Gustafsson, A. H. (2010). Milk quality as affected by feeding regimens in a country with climatic variation. *Journal of Dairy Science*, *93*(7), 2863-2873. https://doi.org/10.3168/jds.2009-2953

Layman, D. K., Lönnerdal, B., & Fernstrom, J. D. (2018). Applications for α-lactalbumin in human nutrition. *Nutrition Reviews*, *76*(6), 444-460. https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy004

Leeb, E., Götz, A., Letzel, T., Cheison, S. C., & Kulozik, U. (2015). Influence of denaturation and aggregation of β-lactoglobulin on its tryptic hydrolysis and the release of functional peptides. *Food Chemistry*, *187*, 545-554. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.034

León-López, A., Pérez-Marroquín, X. A., Campos-Lozada, G., Campos-Montiel, R. G., & Aguirre-Álvarez, G. (2020). Characterization of Whey-Based Fermented Beverages Supplemented with Hydrolyzed Collagen: Antioxidant Activity and Bioavailability. *Foods*, *9*(8), Article 8. https://doi.org/10.3390/foods9081106

Lesgards, J.-F. (2023). Benefits of Whey Proteins on Type 2 Diabetes Mellitus Parameters and Prevention of Cardiovascular Diseases. *Nutrients*, *15*(5), Article 5. https://doi.org/10.3390/nu15051294

Li, H. Y., Yang, H. G., Wu, H. M., Yao, Q. Q., Zhang, Z. Y., Meng, Q. S., Fan, L. L., Wang, J. Q., & Zheng, N. (2021). Inhibitory effects of lactoferrin on pulmonary inflammatory

processes induced by lipopolysaccharide by modulating the TLR4-related pathway. *Journal of Dairy Science*, *104*(7), 7383-7392. https://doi.org/10.3168/jds.2020-19232

Li, S., Ye, A., & Singh, H. (2019). Seasonal variations in composition, properties, and heat-induced changes in bovine milk in a seasonal calving system. *Journal of Dairy Science*, *102*(9), 7747-7759. https://doi.org/10.3168/jds.2019-16685

Li, X., Feng, C., Hong, H., Zhang, Y., Luo, Z., Wang, Q., Luo, Y., & Tan, Y. (2022a). Novel ACE inhibitory peptides derived from whey protein hydrolysates: Identification and molecular docking analysis. *Food Bioscience*, *48*, 101737. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101737

Li, X., Feng, C., Hong, H., Zhang, Y., Luo, Z., Wang, Q., Luo, Y., & Tan, Y. (2022b). Novel ACE inhibitory peptides derived from whey protein hydrolysates: Identification and molecular docking analysis. *Food Bioscience*, *48*, 101737. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101737

Li-Chan, E. C. Y. (2004). 2 - Properties of proteins in food systems: An introduction. En R. Y. Yada (Ed.), *Proteins in Food Processing* (pp. 2-26). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1533/9781855738379.2

Lin, H.-M., Deng, S.-G., Huang, S.-B., Li, Y.-J., & Song, R. (2016). The effect of ferrous-chelating hairtail peptides on iron deficiency and intestinal flora in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*(8), 2839-2844. https://doi.org/10.1002/jsfa.7452

Ling, C.-J., Chen, X.-F., Xu, J.-Y., Wang, G.-P., Wang, Y., Sun, Y., Li, Y.-L., Wan, Z.-X., Tong, X., Hidayat, K., Zhu, W.-Z., Qin, L.-Q., & Yang, J. (2022). Whey protein hydrolysates alleviated weight gain and improved muscle in middle-aged obese mice induced by a high-fat diet. *Journal of Functional Foods*, *97*, 105241. https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105241

López-Sobaler, A. M., Larrosa, M., Salas-González, M. D., Lorenzo-Mora, A. M., Loria-Kohen, V., Aparicio, A., López-Sobaler, A. M., Larrosa, M., Salas-González, M. D., Lorenzo-Mora, A. M., Loria-Kohen, V., & Aparicio, A. (2022). Impacto de la vitamina D en la salud. Dificultades y estrategias para alcanzar las ingestas recomendadas. *Nutrición Hospitalaria*, *39*(SPE3), 30-34. https://doi.org/10.20960/nh.04307

Lu, C.-H., Lin, Y.-F., Lin, J.-J., & Yu, C.-S. (2012). Prediction of Metal Ion–Binding Sites in Proteins Using the Fragment Transformation Method. *PLOS ONE*, *7*(6), e39252. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039252

Ma, J., Stevens, J. E., Cukier, K., Maddox, A. F., Wishart, J. M., Jones, K. L., Clifton, P. M., Horowitz, M., & Rayner, C. K. (2009). Effects of a protein preload on gastric emptying,

glycemia, and gut hormones after a carbohydrate meal in diet-controlled type 2 diabetes. *Diabetes Care*, *32*(9), 1600-1602. https://doi.org/10.2337/dc09-0723

Machado, M., Cangas, L., Jaya, K., & Mosquera, M. (2020). El uso de la medicina ancestral como alternativa al uso indebido de fármacos químicos. *Dilemas contemporáneos: Educación, Política y Valores*. https://doi.org/10.46377/dilemas.v33i1.2140

Mada, S. B., Abaya, P. C., James, D. B., Abarshi, M. M., & Tanko, M. S. (2020). Milk-derived bioactive peptides with antiosteoporotic effect: A mini review. *FUDMA JOURNAL OF SCIENCES*, *4*(3), Article 3. https://doi.org/10.33003/fjs-2020-0403-277

Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., & Xavier Malcata, F. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, *40*(10), 1197-1211. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.005

Madureira, A. R., Tavares, T., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2010). Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science*, *93*(2), 437-455. https://doi.org/10.3168/jds.2009-2566

Maes, W., Van Camp, J., Vermeirssen, V., Hemeryck, M., Ketelslegers, J. M., Schrezenmeir, J., Van Oostveldt, P., & Huyghebaert, A. (2004). Influence of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells. *Regulatory Peptides*, *118*(1-2), 105-109. https://doi.org/10.1016/j.regpep.2003.11.005

Maestre, R., Douglass, J. D., Kodukula, S., Medina, I., & Storch, J. (2013). Alterations in the intestinal assimilation of oxidized PUFAs are ameliorated by a polyphenol-rich grape seed extract in an in vitro model and Caco-2 cells. *The Journal of Nutrition*, *143*(3), 295-301. https://doi.org/10.3945/jn.112.160101

Magan, J., O'Callaghan, T., Zheng, J., Zhang, L., Mandal, R., Hennessy, D., Fenelon, M., Wishart, D., Kelly, A., & McCarthy, N. (2019). Impact of Bovine Diet on Metabolomic Profile of Skim Milk and Whey Protein Ingredients. *METABOLITES*, *9*(12). https://doi.org/10.3390/metabo9120305

Maikanov, B. S., & Auteleyeva, L. T. (2016). Amino-Acid Composition Of A Cow Milk From The Farms That Are Adjacent To Zones Of A Falling Of Rocket Carrier «Proton-M». *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, *7*(3), 2285-2292.

Mann, B., Athira, S., Sharma, R., Kumar, R., & Sarkar, P. (2019). *Bioactive Peptides from Whey Proteins* (pp. 519-547). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00015-1

Mann, B., Kumari, A., Kumar, R., Sharma, R., Prajapati, K., Mahboob, S., & Athira, S. (2015a). Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-MYSORE*, *52*(6), 3235-3241. https://doi.org/10.1007/s13197-014-1361-3

Mann, B., Kumari, A., Kumar, R., Sharma, R., Prajapati, K., Mahboob, S., & Athira, S. (2015b). Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(6), 3235-3241. https://doi.org/10.1007/s13197-014-1361-3

MAPA. (2022). *Estadísticas Lacteas mensuales resultados noviembre 2022* (NIPO: 003201040). https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/industrias_lacteas_mensual_diciembre_2021-noviembre_2022_tcm30-640894.pdf

Martin, M., Hagemann, D., Henle, T., & Deussen, A. (2018). The angiotensin converting enzyme-inhibitory effects of the peptide isoleucine-tryptophan after oral intake via whey hydrolysate in men. *Journal of Hypertension*, *36*, e220. https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000539622.35704.22

Martín-del-Campo, S. T., Martínez-Basilio, P. C., Sepúlveda-Álvarez, J. C., Gutiérrez-Melchor, S. E., Galindo-Peña, K. D., Lara-Domínguez, A. K., & Cardador-Martínez, A. (2019). Production of Antioxidant and ACEI Peptides from Cheese Whey Discarded from Mexican White Cheese Production. *Antioxidants*, *8*(6), Article 6. https://doi.org/10.3390/antiox8060158

Martínez, A., & Martínez, D. V. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutr. Hosp.*, *21*(2:1), 1-14. https://doi.org/PMID: 16771069

Martínez- Valverde, I., Periago, M. J., & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, *50*(1), 5-18. https://doi.org/PMID: 11048566

Martínez-Navarrete, N., Camacho, M. M., Martínez-Lahuerta, J., Martínez-Monzó, J., & Fito, P. (2002). Iron deficiency and iron fortified foods—A review. *Food Research International*, *35*(2), 225-231. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00189-2

Maurmayr, A., Pegolo, S., Malchiodi, F., Bittante, G., & Cecchinato, A. (2018). Milk protein composition in purebred Holsteins and in first/second-generation crossbred cows from Swedish Red, Montbeliarde and Brown Swiss bulls. *Animal*, *12*(10), 2214-2220. https://doi.org/10.1017/S1751731117003640

Mazorra-Manzano, M., & Moreno-Hernandez, J. (2019). Properties and options for the valorization of whey from the artisanal cheese industry. *CIENCIAUAT*, *14*(1), 133-144. https://doi.org/10.29059/cienciauat.v14i1.1134

Mehansho, H. (2006). Iron Fortification Technology Development: New Approaches 1. *The Journal of Nutrition*, *136*(4), 1059-1063. https://doi.org/10.1093/jn/136.4.1059

Mehra, R., Marnila, P., & Korhonen, H. (2006). Milk immunoglobulins for health promotion. *International Dairy Journal*, *16*(11), 1262-1271. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.003

Melnik, B. C., John, S. M., & Schmitz, G. (2013). Milk is not just food but most likely a genetic transfection system activating mTORC1 signaling for postnatal growth. *Nutrition Journal*, *12*(1), 103. https://doi.org/10.1186/1475-2891-12-103

Mesías, M., Seiquer, I., & Navarro, M. P. (2013). Iron nutrition in adolescence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *53*(11), 1226-1237. https://doi.org/10.1080/10408398.2011.564333

Meza, P. F. Z., Sepúlveda-V, J. U., & Ciro-V, H. J. (2023). Effect of the addition of stabilizers on physicochemical, antioxidant and sensory properties of a beverage made with hydrolyzed sweet whey permeate enriched with agraz (Vaccinium meridionale Swartz) and cape gooseberry (Physalis peruviana L) pulp. *Ingeniería y Competitividad*, *25*(1), Article 1. https://doi.org/10.25100/iyc.v25i1.12055

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., … Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—An international consensus. *Food & Function*, *5*(6), 1113-1124. https://doi.org/10.1039/c3fo60702j

Minj, S., & Anand, S. (2020). Whey Proteins and Its Derivatives: Bioactivity, Functionality, and Current Applications. *Dairy*, *1*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/dairy1030016

Minkiewicz, P., Iwaniak, A., & Darewicz, M. (2019). BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(23), Article 23. https://doi.org/10.3390/ijms20235978

Mistry, N., Drobni, P., Näslund, J., Sunkari, V. G., Jenssen, H., & Evander, M. (2007). The anti-papillomavirus activity of human and bovine lactoferricin. *Antiviral Research*, *75*(3), 258-265. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.03.012

Mohamed, R. S., Marrez, D. A., Salem, S. H., Zaghloul, A. H., Ashoush, I. S., Farrag, A. R. H., & Abdel-Salam, A. M. (2019). Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant effects of green sprouts juice and functional dairy micronutrients against streptozotocin-induced oxidative stress and diabetes in rats. *Heliyon*, *5*(2), e01197. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01197

Molero, M., Flores-Rondon, C., Leal-Ramirez, M., & Jose Brinez-Zambrano, W. (2017). Sensory Evaluation of Probiotic Fermented Beverges Based on Whey. *Revista Cientifica-Facultad De Ciencias Veterinarias*, *27*(2), 70-77.

Molero-Méndez, M., Castro-Albornoz, G., & Briñez-Zambrano, W. (2017). Evaluación fisicoquímica del lactosuero obtenido de la producción de queso blanco aplicando un método artesanal. *Revista Científica*, *XXVII*(3), 149-153. https://doi.org/Corpus ID: 210001100

Mollea, C., Marmo, L., Bosco, F., Mollea, C., Marmo, L., & Bosco, F. (2013). Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry. En *Food Industry*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/53159

Montesdeoca, R., & Piloso, K. (2020). Evaluación fisicoquímica del lactosuero obtenido del queso fresco pasteurizado producido en el taller de procesos lácteos en la Espam «MFL». *Revista Científica de Ciencia y Tecnología El Higo*, *10*(1), 2-10. https://doi.org/10.5377/elhigo.v10i1.9921

Monti, L., Donati, E., Zambrini, A. V., & Contarini, G. (2018). Application of membrane technologies to bovine Ricotta cheese exhausted whey (scotta). *International Dairy Journal*, *85*, 121-128. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.05.007

Moon, J., Ratliff, K., Blumkaitis, J., Harty, P., Zabriskie, H., Stecker, R., Currier, B., Jagim, A., Jager, R., Purpura, M., & Kerksick, C. (2020). Effects of daily 24-gram doses of rice or whey protein on resistance training adaptations in trained males. *JOURNAL OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SPORTS NUTRITION*, *17*(1). https://doi.org/10.1186/s12970-020-00394-1

Moreno, W. (2020). *Producción de biogás utilizando biomasa residual pecuaria con fibra vegetal y enriquecida con lactosuero como alternativa para mitigar los gases de efecto invernadero* [Universidad Técnica de Ambato]. https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/31451/1/008%20Tesis%20maestr%c3%adas%20Cambio%20Clim%c3%a1tico%20-%20Walter%20Moreno%20.pdf

Moreno-Expósito, L., Illescas-Montes, R., Melguizo-Rodríguez, L., Ruiz, C., Ramos-Torrecillas, J., & de Luna-Bertos, E. (2018). Multifunctional capacity and therapeutic

potential of lactoferrin. *Life Sciences*, *195*, 61-64. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.01.002

Morrin, S. T., Buck, R. H., Farrow, M., & Hickey, R. M. (2021). Milk-derived anti-infectives and their potential to combat bacterial and viral infection. *Journal of Functional Foods*, *81*, 104442. https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104442

Mulet-Cabero, A., Torcello-Gomez, A., Saha, S., Mackie, A., Wilde, P., & Brodkorb, A. (2020). Impact of caseins and whey proteins ratio and lipid content on in vitro digestion and ex vivo absorption. *FOOD CHEMISTRY*, *319*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126514

Muleya, M., F. Bailey, E., & H. Bailey, E. (2024). A comparison of the bioaccessible calcium supplies of various plant-based products relative to bovine milk. *Food Research International*, *175*, 113795. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113795

Mullally, M. M., Meisel, H., & FitzGerald, R. J. (1997). Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine beta-lactoglobulin. *FEBS Letters*, *402*(2-3), 99-101. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(96)01503-7

Muncan, J., Kovacs, Z., Pollner, B., Ikuta, K., Ohtani, Y., Terada, F., & Tsenkova, R. (2021). Near infrared aquaphotomics study on common dietary fatty acids in cow's liquid, thawed milk. *Food Control*, *122*, 107805. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107805

Murakami, M., Tonouchi, H., Takahashi, R., Kitazawa, H., Kawai, Y., Negishi, H., & Saito, T. (2004). Structural Analysis of a New Anti-Hypertensive Peptide (β-Lactosin B) Isolated from a Commercial Whey Product. *Journal of Dairy Science*, *87*(7), 1967-1974. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70013-2

Muset, G., & Castells, M. (2017). *Valorización del lactosuero* (1era.). Ediciones INTI. https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1104612/1/lactosuero.pdf

Nabuco, H. C. G., Tomeleri, C. M., Fernandes, R. R., Sugihara Junior, P., Venturini, D., Barbosa, D. S., Deminice, R., Sardinha, L. B., & Cyrino, E. S. (2019). Effects of pre- or post-exercise whey protein supplementation on oxidative stress and antioxidant enzymes in older women. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, *29*(8), 1101-1108. https://doi.org/10.1111/sms.13449

Nagaoka, S., Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi, K., Kanamaru, Y., Tadashi, K., & Kuwata, T. (2001). Identification of Novel Hypocholesterolemic Peptides Derived

from Bovine Milk β-Lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *281*(1), 11-17. https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4298

Nath, A., Mondal, S., Kanjilal, T., Chakraborty, S., Curcio, S., & Bhattacharjee, C. (2015). Synthesis and functionality of proteinacious nutraceuticals from casein whey—A clean and safe route of valorization of dairy waste. *Chemical Engineering Research and Design*, *97*, 192-207. https://doi.org/10.1016/j.cherd.2015.03.017

Neelima, Sharma, R., Rajput, Y. S., & Mann, B. (2013). Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: A review. *Dairy Science & Technology*, *93*(1), 21-43. https://doi.org/10.1007/s13594-012-0095-0

Nielsen, S. D., Beverly, R. L., Qu, Y., & Dallas, D. C. (2017). Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. *Food Chemistry*, *232*, 673-682. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.056

Niseteo, T., Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D., & Budeč, M. (2012). Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition. *Food Chemistry*, *134*(4), 1870-1877. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.095

Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2013). Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk protein-derived dipeptides and hydrolysates. *Peptides*, *39*, 157-163. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.11.016

Nongonierma, A. B., O'Keeffe, M. B., & FitzGerald, R. J. (2016). Milk Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides. En P. L. H. McSweeney & J. A. O'Mahony (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects* (pp. 417-482). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2_15

OCDE/FAO. (2021). *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2021-2030*. https://www.fao.org/3/cb5332es/cb5332es.pdf

OEC. (2020). *Suero y otros productos lácteos | OEC*. OEC - The Observatory of Economic Complexity. https://oec.world/es/profile/hs/whey

OECD/FAO. (2016). *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2016-2025* (OECD Publishing, Ed.). http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-es

Oftedal, O. T. (2013). Origin and Evolution of the Major Constituents of Milk. En P. L. H. McSweeney & P. F. Fox (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins:*

Basic Aspects, 4th Edition (pp. 1-42). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6_1

Ohinata, K., Inui, A., Asakawa, A., Wada, K., Wada, E., & Yoshikawa, M. (2002). Albutensin A and complement C3a decrease food intake in mice. *Peptides*, *23*(1), 127-133. https://doi.org/10.1016/s0196-9781(01)00588-5

O'Keeffe, M. B., & FitzGerald, R. J. (2014). Antioxidant effects of enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate on cultured human endothelial cells. *International Dairy Journal*, *36*(2), 128-135. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.01.013

Olsen, T. H., Yesiltas, B., Marin, F. I., Pertseva, M., García-Moreno, P. J., Gregersen, S., Overgaard, M. T., Jacobsen, C., Lund, O., Hansen, E. B., & Marcatili, P. (2020). AnOxPePred: Using deep learning for the prediction of antioxidative properties of peptides. *Scientific Reports*, *10*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41598-020-78319-w

Olvera-Rosales, L. B., Cruz-Guerrero, A. E., García-Garibay, J. M., Gómez-Ruíz, L. C., Contreras-López, E., Guzmán-Rodríguez, F., & González-Olivares, L. G. (2022). Bioactive peptides of whey: Obtaining, activity, mechanism of action, and further applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-31. https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2079113

Onwulata, C., & Huth, P. (Eds.). (2008). *Whey processing, functionality and health benefits* (1st ed). Wiley-Blackwell. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9780813803845

Ortega-Pérez, R., Espinoza-Villavicencio, J. L., Palacios-Mechetnov, E., Palacios-Espinosa, A., Arjona-López, O., Murillo-Amador, B., & Rivera-Acuña, F. (2013). Perfil de ácidos grasos en leche de vacas Chinampas (Bos taurus) alimentadas con forraje fresco de matorral sarcocaulescente o heno de alfalfa. *Archivos de medicina veterinaria*, *45*(1), 45-51. https://doi.org/10.4067/S0301-732X2013000100008

Osorio-González, C. S., Gómez-Falcon, N., Brar, S. K., & Ramírez, A. A. (2022). Cheese Whey as a Potential Feedstock for Producing Renewable Biofuels: A Review. *Energies*, *15*(18), Article 18. https://doi.org/10.3390/en15186828

Oyama, M., Van Hung, T., Yoda, K., He, F., & Suzuki, T. (2017). A novel whey tetrapeptide IPAV reduces interleukin-8 production induced by TNF-α in human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Functional Foods*, *35*, 376-383. https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.001

Ozel, B., McClements, D. J., Arikan, C., Kaner, O., & Oztop, M. H. (2022). Challenges in dried whey powder production: Quality problems. *Food Research International*, *160*, 111682. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111682

Ozorio, L., Matsubara, N. K., da Silva-Santos, J. E., Henry, G., Le Gouar, Y., Jardin, J., Mellinger-Silva, C., Cabral, L. M. C., & Dupont, D. (2020a). Gastrointestinal digestion enhances the endothelium-dependent vasodilation of a whey hydrolysate in rat aortic rings. *Food Research International*, *133*, 109188. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109188

Ozorio, L., Matsubara, N. K., da Silva-Santos, J. E., Henry, G., Le Gouar, Y., Jardin, J., Mellinger-Silva, C., Cabral, L. M. C., & Dupont, D. (2020b). Gastrointestinal digestion enhances the endothelium-dependent vasodilation of a whey hydrolysate in rat aortic rings. *Food Research International*, *133*, 109188. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109188

Ozorio, L., Mellinger-Silva, C., Cabral, L. M. C., Jardin, J., Boudry, G., & Dupont, D. (2020). The Influence of Peptidases in Intestinal Brush Border Membranes on the Absorption of Oligopeptides from Whey Protein Hydrolysate: An Ex Vivo Study Using an Ussing Chamber. *Foods (Basel, Switzerland)*, *9*(10), E1415. https://doi.org/10.3390/foods9101415

Ozorio, L., Silva, L. P., Prates, M. V., Bloch, C., Takeiti, C. Y., Gomes, D. M., da Silva-Santos, J. E., Deliza, R., Brígida, A. I. S., Furtado, A., Mellinger-Silva, C., & Cabral, L. M. C. (2019). Whey hydrolysate-based ingredient with dual functionality: From production to consumer's evaluation. *Food Research International*, *122*, 123-128. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.060

Ozturk, B., & McClements, D. J. (2016). Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. *Current Opinion in Food Science*, *7*, 1-6. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.008

Palma, J. M., & Seiquer, I. (2020). To Be or Not to Be… An Antioxidant? That Is the Question. *Antioxidants*, *9*(12), 1234. https://doi.org/10.3390/antiox9121234

Pandey, Kapila, R., & Kapila, S. (2018). Osteoanabolic activity of whey-derived anti-oxidative (MHIRL and YVEEL) and angiotensin-converting enzyme inhibitory (YLLF, ALPMHIR, IPA and WLAHK) bioactive peptides. *Peptides*, *99*, 1-7. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.11.004

Pandey, S., Maharana, J., Li, X. X., Woodruff, T. M., & Shukla, A. K. (2020). Emerging Insights into the Structure and Function of Complement C5a Receptors. *Trends in Biochemical Sciences*, *45*(8), 693-705. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.04.004

Panghal, A., Patidar, R., Jaglan, S., Chhikara, N., Khatkar, S. K., Gat, Y., & Sindhu, N. (2018). Whey valorization: Current options and future scenario – a critical review. *Nutrition & Food Science*, *48*(3), 520-535. https://doi.org/10.1108/NFS-01-2018-0017

Pantako, O. T., & Amiot, J. (2001). The effects of α-lactalbumin and whey protein concentrate on α-amino acids, calcium and phosphorus levels in blood and gastrointestinal tract of rats. *INRA, EDP Sciences, 2001*, *41*(3), 227-238. https://doi.org/10.1051/rnd:2001126

Pardillos, M. C. (2020). *Estudio de mercado 2020* (p. 6). https://www.icex.es/icex/GetDocumento?dDocName=DOC2020851677&rendition=AlternateWeb&urlNoAcceso=/icex/es/registro/iniciar-sesion/index.html?urlDestino=https://www.icex.es:443/icex/es/navegacion-principal/todos-nuestros-servicios/informacion-de-mercados/sectores/agroalimentarios/documentos/DOC2020851677.html&site=icexES#:~:text=Pese%20a%20su%20bajo%20consumo,925%20kilos%20de%20este%20producto.

Park, E., Paik, H.-D., & Lee, S.-M. (2018). Combined effects of whey protein hydrolysates and probiotics on oxidative stress induced by an iron-overloaded diet in rats. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *69*(3), 298-307. https://doi.org/10.1080/09637486.2017.1354977

Parra, R. (2009). Lactosuero: Importancia en la industria de alimentos. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*, *62*(62), 4967-4982. https://doi.org/10.15446/rfnam

Pasqualetti, V., Locato, V., Fanali, C., Mulinacci, N., Cimini, S., Morgia, A. M., Pasqua, G., & De Gara, L. (2021). Comparison between In Vitro Chemical and Ex Vivo Biological Assays to Evaluate Antioxidant Capacity of Botanical Extracts. *Antioxidants*, *10*(7), Article 7. https://doi.org/10.3390/antiox10071136

Pastoriza, S., Delgado-Andrade, C., Haro, A., & Rufián-Henares, J. A. (2011). A physiologic approach to test the global antioxidant response of foods. The GAR method. *Food Chemistry*, *129*(4), 1926-1932. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.009

Paterson, A. H. J. (2022). Production and Uses of Lactose. En P. L. H. McSweeney, J. A. O'Mahony, & A. L. Kelly (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry: Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents* (4ta., Vol. 3, pp. 105-124). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-92585-7_4

Pauletti, M. S., Sbodio, O. A., Tercero, E. J., & Costa, S. C. (2005). Desuerado de coágulos de leche formados por enzima coagulante y glucono-d-lactona. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, *5*(1), 35-41.

Peighambardoust, S. H., Karami, Z., Pateiro, M., & Lorenzo, J. M. (2021). A Review on Health-Promoting, Biological, and Functional Aspects of Bioactive Peptides in Food Applications. *Biomolecules*, *11*(5), Article 5. https://doi.org/10.3390/biom11050631

Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Hunziker, P., & von Fellenberg, R. (1999). Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α-lactalbumin molecule. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1426*(3), 439-448. https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00165-2

Pelletier, Barker, Hakes, & Zopf. (2004). *Methods for producing salyloligosacchardes in adary source* (Patent USOO6706497B2). https://patentimages.storage.googleapis.com/1e/95/9a/d0b43249c139bb/US6706497.pdf (U.S. PATENT DOCUMENTS)

Peralta. (2018). *Fisiología de la nutrición* (2.ª ed., Vol. 1). El Manual Moderno. https://www.untumbes.edu.pe/bmedicina/libros/Libros10/libro119.pdf

Pérez Ríos, M., & Ruano, A. (2004). Vitaminas y salud. *Offarm*, *23*(8), 96-106.

Pérez-Gago, M. B., Serra, M., & Río, M. A. del. (2006). Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrate-based edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, *39*(1), 84-92. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.08.002

Pérez-Torres, A. (2022). Mundo vegetal y enfermedad renal crónica: ¿riesgo o beneficio? *Enfermería Nefrológica*, *25*(2), 110-112. https://doi.org/10.37551/52254-28842022011

Peters, T. (1985). Serum Albumin. En C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, & F. M. Richards (Eds.), *Advances in Protein Chemistry* (Vol. 37, pp. 161-245). Academic Press. https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60065-0

Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T., & Korhonen, H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: Concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*, *67*(1), 53-64. https://doi.org/10.1017/S0022029999003982

Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T., & Korhonen, H. (1998). Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Bovine Milk Proteins. *International Dairy Journal*, *8*(4), 325-331. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00048-X

Pineda, A. M. R. (2019). *Estudio de las interacciones supramoleculares entre compuestos fenólicos y proteínas salivales y su relación con la astringencia* [Tesis Doctoral,

Universidad de Salamanca]. https://gredos.usal.es/bitstream/handle/10366/140790/REDUCIDA_Estudio%20de%20las%20interacciones%20supramoleculares.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Pinterits, A., & Arntfield, S. D. (2007). The effect of limited proteolysis on canola protein gelation. *Food Chemistry*, *102*(4), 1337-1343. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.025

Pires, A. F., Marnotes, N. G., Rubio, O. D., Garcia, A. C., & Pereira, C. D. (2021). Dairy By-Products: A Review on the Valorization of Whey and Second Cheese Whey. *Foods*, *10*(5), Article 5. https://doi.org/10.3390/foods10051067

Plaisancié, P., Boutrou, R., Estienne, M., Henry, G., Jardin, J., Paquet, A., & Léonil, J. (2015). β-Casein(94-123)-derived peptides differently modulate production of mucins in intestinal goblet cells. *The Journal of Dairy Research*, *82*(1), 36-46. https://doi.org/10.1017/S0022029914000533

Poljsak, B., Kovač, V., & Milisav, I. (2021). Antioxidants, Food Processing and Health. *Antioxidants*, *10*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/antiox10030433

Poveda, E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista Chilena de Nutrición*, *40*(4), 397-403. https://doi.org/10.4067/S0717-75182013000400011

Power, O., Fernández, A., Norris, R., Riera, F. A., & FitzGerald, R. J. (2014). Selective enrichment of bioactive properties during ultrafiltration of a tryptic digest of β-lactoglobulin. *Journal of Functional Foods*, *9*, 38-47. https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.002

Prabhu, G. (2006). *U.S. Whey proteins in processed meats*. Edited by Annie Bienvenue and Antonella da Camara. https://www.thinkusadairy.org/resources-and-insights/resources-and-insights/application-and-technical-materials/us-whey-protein-and-lactose-products-in-processed-meats

Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, *110*, 48-68. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018

Priyadarshini, R., Marshall Raj, G., & Shewade, D. (2016). Chromatography—The essence of bioanalysis. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, *3*(1), 366-377.

Priyashantha, H., Lundh, Å., Höjer, A., Bernes, G., Nilsson, D., Hetta, M., Saedén, K. H., Gustafsson, A. H., & Johansson, M. (2021). Composition and properties of bovine milk:

A study from dairy farms in northern Sweden; Part II. Effect of monthly variation. *Journal of Dairy Science*, *104*(8), 8595-8609. https://doi.org/10.3168/jds.2020-19651

Rako, A., Tudor Kalit, M., Kalit, S., Soldo, B., & Ljubenkov, I. (2018). Nutritional characteristics of Croatian whey cheese (Bračka skuta) produced in different stages of lactation. *LWT*, *96*, 657-662. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.024

Ramírez, J. S., Solís, C. A., Vélez, C. A., Ramírez, J. S., Solís, C. A., & Vélez, C. A. (2018). Tecnología de membranas: Obtención de proteínas de lactosuero. *Entre Ciencia e Ingeniería*, *12*(24), 52-59. https://doi.org/10.31908/19098367.3815

Ramos, G. L. de P. A., Guimarães, J. T., Pimentel, T. C., da Cruz, A. G., de Souza, S. L. Q., & Vendramel, S. M. R. (2021). Chapter 19 - Whey: Generation, recovery, and use of a relevant by-product. En R. Bhat (Ed.), *Valorization of Agri-Food Wastes and By-Products* (pp. 391-414). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824044-1.00030-1

Ramos, Ó., Pereira, R. N. C., Rodrigues, R. M. M., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Malcata, F. X. (2015). *Whey and Whey Powders: Production and Uses*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00747-9

Raven, A. M., Lengemann, F. W., & Wasserman, R. H. (1960). Studies of the Effect of Lysine on the Absorption of Radiocalcium and Radiostrontium by the Rat. *The Journal of Nutrition*, *72*(1), 29-36. https://doi.org/10.1093/jn/72.1.29

Rengel dos Passos, F., Lopes Maestre, K., Florêncio da Silva, B., Rodrigues, A. C., Contini Triques, C., Alves Garcia, H., Fagundes-Klen, M. R., Antonio da Silva, E., & Fiorese, M. L. (2021). Production of a synbiotic composed of galacto-oligosaccharides and Saccharomyces boulardii using enzymatic-fermentative method. *Food Chemistry*, *353*, 129486. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129486

Revillion, J. P. de P., Brandelli, A., & Ayub, M. A. Z. (2003). Production of yeast extract from whey using Kluyveromyces marxianus. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *46*, 121-128. https://doi.org/10.1590/S1516-89132003000100017

Reyes, F., García, A., & De Hernández, A. (2002). *Efecto de la tecnología quesera sobre la composición del suero lácteo*. *2*(2). https://www.redalyc.org/pdf/904/Resumenes/Abstract_90420206_2.pdf

Reyes Herrera, Á. L., & Vergara Baldovino, E. D. (2016). Automatización del proceso de elaboración de queso /. *http://biblioteca.utb.edu.co/notas/tesis/0069407.pdf*. https://repositorio.utb.edu.co/handle/20.500.12585/1240

Ribeiro, A. C., & Ribeiro, S. D. A. (2010). Specialty products made from goat milk. *Small Ruminant Research*, *89*(2), 225-233. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.048

Ricci-Cabello, I., Olalla Herrera, M., & Artacho, R. (2012). Possible role of milk-derived bioactive peptides in the treatment and prevention of metabolic syndrome. *Nutrition Reviews*, *70*(4), 241-255. https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00448.x

Rincón-Pabón, D., Urazán-Hernández, Y., & Gonzalez-Santamaria, J. (2019). [Prevalence and sociodemographic factors associated with iron deficiency anemia in pregnant women of Colombia (secondary analysis of the ENSIN 2010)]. *Nutricion Hospitalaria*, *36*(1), 87-95. https://doi.org/10.20960/nh.1895

Rival, S. G., Boeriu, C. G., & Wichers, H. J. (2001). Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(1), 295-302. https://doi.org/10.1021/jf0003911

Robalino, J. (2017). *Obtención de ácido láctico a partir de suero de leche mediante un proceso biofermentativo utilizando un cultivo mesófilo homofermentativo* [Escuela Politécnica Nacional]. https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/17484/1/CD-7984.pdf

Rocchetti, G., & O'Callaghan, T. F. (2021). Application of metabolomics to assess milk quality and traceability. *Current Opinion in Food Science*, *40*, 168-178. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.04.005

Rocha-Mendoza, D., Kosmerl, E., Krentz, A., Zhang, L., Badiger, S., Miyagusuku-Cruzado, G., Mayta-Apaza, A., Giusti, M., Jiménez-Flores, R., & García-Cano, I. (2021). Invited review: Acid whey trends and health benefits. *Journal of Dairy Science*, *104*(2), 1262-1275. https://doi.org/10.3168/jds.2020-19038

Rodríguez-Basantes, A. I., Abad-Basantes, C. A., Pérez-Martínez, A., Diéguez-Santana, K., Rodríguez-Basantes, A. I., Abad-Basantes, C. A., Pérez-Martínez, A., & Diéguez-Santana, K. (2020). Elaboración de una bebida a base de suero lácteo y pulpa de Theobroma grandiflorum. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *18*(2), 166-175. https://doi.org/10.18684/bsaa(18)166-175

Rodríguez-Hernández, G., Rentería-Monterrubio, A. L., Rodríguez-Figueroa, J. C., & Chávez-Martínez, A. (2014). Biopéptidos en la leche y sus derivados: Funcionamiento y beneficios a la salud. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, *1*(3), 281-294.

Rodríguez-Pérez, C., Pimentel-Moral, S., & Ochando-Pulido, J. (2019). 4—New Trends and Perspectives in Functional Dairy-Based Beverages. En A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Milk-Based Beverages* (pp. 95-138). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815504-2.00004-9

Roldán, N. R., Jiménez, M., Cervantes-García, D., Marín, E., & Salinas, E. (2016). Glycomacropeptide administration attenuates airway inflammation and remodeling associated to allergic asthma in rat. *Inflammation Research*, *65*(4), 273-283. https://doi.org/10.1007/s00011-015-0913-y

Romero Betancourt, J. C. (2020). *Efecto de la proteína láctea bovina sobre la calidad fisicoquímica y tecnológica de los quesos frescos. Revisión bibliográfica* [Tesis, Nacional de Chimborazo]. http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/7395/2/8.1.%20TESIS%20FINAL_JENNIFER%20ROMERO%20.pdf

Rullier, B., Axelos, M. A. V., Langevin, D., & Novales, B. (2010). β-Lactoglobulin aggregates in foam films: Effect of the concentration and size of the protein aggregates. *Journal of Colloid and Interface Science*, *343*(1), 330-337. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.11.015

Sabeena Farvin, K. H., Baron, C. P., Nielsen, N. S., Otte, J., & Jacobsen, C. (2010). Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2 – Characterisation of peptide fractions. *Food Chemistry*, *123*(4), 1090-1097. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.029

Sadat, L., Cakir-Kiefer, C., N'Negue, M.-A., Gaillard, J.-L., Girardet, J.-M., & Miclo, L. (2011). Isolation and identification of antioxidative peptides from bovine α-lactalbumin. *International Dairy Journal*, *21*(4), 214-221. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.011

Salazar, D. M., Naranjo, M., Pérez, L. V., Valencia, A. F., Acurio, L. P., Gallegos, L. M., Alvarez, F. C., Amancha, P. I., Valencia, M. P., Rodriguez, C. A., & Arancibia, M. Y. (2017). Development of newly enriched bread with quinoa flour and whey. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *77*, 012018. https://doi.org/10.1088/1755-1315/77/1/012018

Sánchez, P. A. G. (2016). *"Estudio microbiológico del suero de queso fresco pasteurizado de los productores lácteos del cantón mejía de las parroquias Güitig y Puichig."* [Tesis, Universidad Tecnológica Equinoccial]. http://190.15.133.181/bitstream/123456789/16646/1/67408_1.pdf

Sandoval-Cuellar, C. E., de Jesus Perea-Flores, M., & Quintanilla-Carvajal, M. X. (2020). In-vitro digestion of whey protein- and soy lecithin-stabilized High Oleic Palm Oil emulsions. *Journal of Food Engineering*, *278*, 109918. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.109918

Sanhueza, J. (2015). Los ácidos grasos dietarios y su relación con la salud. *Nutrición Hospitalaria*, *3*, 1362-1375. https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.3.9276

Sarney, D. B., Hale, C., Frankel, G., & Vulfson, E. N. (2000). A novel approach to the recovery of biologically active oligosaccharides from milk using a combination of enzymatic treatment and nanofiltration. *Biotechnology and Bioengineering*, *69*(4), 461-467. https://doi.org/10.1002/1097-0290(20000820)69:4<461::AID-BIT13>3.0.CO;2-L

Saseta, C. F. (2007). *Efecto de la adición de fitasa sobre la biodisponibilidad mineral in vitro en papillas infantiles* [Tesis Doctoral, Universidad de Murcia]. https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/11062/FrontelaSaseta.pdf?sequence=1

Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, *101*(2), 492-501. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.006

Saxena, A., Tripathi, B. P., Kumar, M., & Shahi, V. K. (2009). Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. *Advances in Colloid and Interface Science*, *145*(1), 1-22. https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.07.004

Scheers, N. (2013). Regulatory Effects of Cu, Zn, and Ca on Fe Absorption: The Intricate Play between Nutrient Transporters. *Nutrients*, *5*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/nu5030957

Schmid, M. (2013). Properties of Cast Films Made from Different Ratios of Whey Protein Isolate, Hydrolysed Whey Protein Isolate and Glycerol. *MATERIALS*, *6*(8), 3254-3269. https://doi.org/10.3390/ma6083254

Schmitt, C., Bovay, C., Vuilliomenet, A.-M., Rouvet, M., Bovetto, L., Barbar, R., & Sanchez, C. (2009). Multiscale Characterization of Individualized β-Lactoglobulin Microgels Formed upon Heat Treatment under Narrow pH Range Conditions. *Langmuir*, *25*(14), 7899-7909. https://doi.org/10.1021/la900501n

Schönfeldt, H. C., Pretorius, B., & Hall, N. (2016). Bioavailability of Nutrients. En B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 401-406). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00068-4

Schuchardt, J. P., & Hahn, A. (2017). Intestinal Absorption and Factors Influencing Bioavailability of Magnesium-An Update. *Current Nutrition and Food Science*, *13*(4), 260-278. https://doi.org/10.2174/1573401313666170427162740

Schuck, P. (2002). Spray drying of dairy products: State of the art. *Le Lait*, *82*(4), 375-382. https://doi.org/10.1051/lait:2002017

SCPM. (2016). *Estudio de mercado «Sector de la leche en el Ecuador»*. https://www.scpm.gob.ec/sitio/wp-content/uploads/2019/03/VP-ESTUDIO-DE-LA-LECHE.pdf

Seiquer, I., Aspe, T., Vaquero, P., & Navarro, P. (2001). Effects of heat treatment of casein in the presence of reducing sugars on calcium bioavailability: In vitro and in vivo assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(2), 1049-1055. https://doi.org/10.1021/jf001008v

Seiquer, I., Rueda, A., Olalla, M., & Cabrera-Vique, C. (2015a). Assessing the bioavailability of polyphenols and antioxidant properties of extra virgin argan oil by simulated digestion and Caco-2 cell assays. Comparative study with extra virgin olive oil. *Food Chemistry*, *188*, 496-503. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.006

Seiquer, I., Rueda, A., Olalla, M., & Cabrera-Vique, C. (2015b). Assessing the bioavailability of polyphenols and antioxidant properties of extra virgin argan oil by simulated digestion and Caco-2 cell assays. Comparative study with extra virgin olive oil. *Food Chemistry*, *188*, 496-503. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.006

Setiowati, A. D., Wijaya, W., & Van der Meeren, P. (2020). Whey protein-polysaccharide conjugates obtained via dry heat treatment to improve the heat stability of whey protein stabilized emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, *98*, 150-161. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.011

Shahidi, F., & Zhong, Y. (2008). Bioactive Peptides. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, *91*(4), 914-931. https://doi.org/10.1093/jaoac/91.4.914

Shelke, P. A., Sabikhi, L., Khetra, Y., Ganguly, S., & Baig, D. (2022). Effect of skim milk addition and heat treatment on characteristics of cow milk Ricotta cheese manufactured from Cheddar cheese whey. *LWT*, *162*. Scopus. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113405

Shestakov, A., Jenssen, H., Nordström, I., & Eriksson, K. (2012). Lactoferricin but not lactoferrin inhibit herpes simplex virus type 2 infection in mice. *Antiviral Research*, *93*(3), 340-345. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.01.003

Shilpashree, B. G., Arora, S., Kapila, S., & Sharma, V. (2020). Whey protein-iron or zinc complexation decreases pro-oxidant activity of iron and increases iron and zinc bioavailability. *LWT*, *126*, 109287. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109287

Siener, R., & Hesse, A. (1995). Influence of a mixed and a vegetarian diet on urinary magnesium excretion and concentration. *British Journal of Nutrition*, *73*(5), 783-790. https://doi.org/10.1079/BJN19950081

SIIPRO. (2015). *Plan Estratégico Integral de Agroforestal, Pesca y Acuicultura en el Ecuador*. https://servicios.produccion.gob.ec/siipro/consultorias.html

Silva, M. F., Fornari, R. C. G., Mazutti, M. A., de Oliveira, D., Padilha, F. F., Cichoski, A. J., Cansian, R. L., Di Luccio, M., & Treichel, H. (2009). Production and characterization of xantham gum by Xanthomonas campestris using cheese whey as sole carbon source. *Journal of Food Engineering*, *90*(1), 119-123. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.010

Silveira, S. T., Martínez-Maqueda, D., Recio, I., & Hernández-Ledesma, B. (2013). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in β-lactoglobulin. *Food Chemistry*, *141*(2), 1072-1077. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.056

Simonson, M., Boirie, Y., & Guillet, C. (2020). Protein, amino acids and obesity treatment. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, *21*(3), 341-353. https://doi.org/10.1007/s11154-020-09574-5

Singh, A., Ahmad, N., Varadarajan, A., Vikram, N., Singh, T. P., Sharma, S., & Sharma, P. (2021). Lactoferrin, a potential iron-chelator as an adjunct treatment for mucormycosis – A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *187*, 988-998. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.156

Singh, U., Kaur, D., Mishra, V., & Krishania, M. (2022). Combinatorial approach to prepare antioxidative protein hydrolysate from corn gluten meal with dairy whey: Preparation, kinetics, nutritional study and cost analysis. *LWT*, *153*, 112437. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112437

Sinha, R., Radha, C., Prakash, J., & Kaul, P. (2007). Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chemistry*, *101*(4), 1484-1491. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.021

Sipola, M., Finckenberg, P., Santisteban, J., Korpela, R., Vapaatalo, H., & Nurminen, M. (2001). Long-term intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*, *52*(4), 745-754. https://doi.org/PMID: 11785770

Skibsted, L. H. (2016). Mineral nutrient interaction: Improving bioavailability of calcium and iron. *Food Science and Biotechnology*, *25*(5), 1233-1241. https://doi.org/10.1007/s10068-016-0196-2

Smith, Bowden Davies, K. A., Stevenson, E. J., & West, D. J. (2020). The Clinical Application of Mealtime Whey Protein for the Treatment of Postprandial Hyperglycaemia for

People With Type 2 Diabetes: A Long Whey to Go. *Frontiers in Nutrition, 7*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2020.587843

Smith, T., Gerard, P., & Drake, M. (2015). Effect of temperature and concentration on benzoyl peroxide bleaching efficacy and benzoic acid levels in whey protein concentrate. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, 98*(11), 7614-7627. https://doi.org/10.3168/jds.2015-9890

Smith, T. J., Foegeding, E. A., & Drake, M. A. (2016). Flavor and Functional Characteristics of Whey Protein Isolates from Different Whey Sources. *Journal of Food Science, 81*(4), C849-857. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13248

Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins—From 'gutter-to-gold'. *International Dairy Journal, 18*(7), 695-704. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.008

Sobenes, J., & Alegre, R. (2015). Producão de goma xantana por X. Campestris ATCC 13951 utilizando soro de queijo desproteinado. *Revista ION, 28*(2), 69-77. https://doi.org/10.18273/revion.v28n2-2015006

Solarte, V. (2016). *Péptidos derivados de lactoferricina bovina como agentes anticancerígenos contra el carcinoma de células escamosas de la cavidad oral* [Universidad Nacional de Colombia]. https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/57777/victoralfonsosolartedavid.2016.pdf?isAllowed=y&sequence=1

Spellman, D., O'Cuinn, G., & FitzGerald, R. (2005). Physicochemical and sensory characteristics of whey protein hydrolysates generated at different total solids levels. *JOURNAL OF DAIRY RESEARCH, 72*(2), 138-143. https://doi.org/10.1017/S0022029904000688

Spellman, D., O'Cuinn, G., & FitzGerald, R. J. (2009). Bitterness in Bacillus proteinase hydrolysates of whey proteins. *Food Chemistry, 114*(2), 440-446. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.067

Splechtna, B., Nguyen, T.-H., & Haltrich, D. (2007). Comparison between Discontinuous and Continuous Lactose Conversion Processes for the Production of Prebiotic Galacto-oligosaccharides Using β-Galactosidase from Lactobacillus reuteri. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*(16), 6772-6777. https://doi.org/10.1021/jf070643z

Sprenger, Morgan, Berrocal, & Braun. (2010). *Oligosaccharide mixture Oligosaccharidmischung Mélange d'oligosaccharides* (European Patent Office Patent EP 1 988 786 B2). https://data.epo.org/publication-

server/document?iDocId=6057582&iFormat=0 (WO-A-00/33854 WO-A-01/42263 WO-A-98/43494 WO-A-03/059924 WO-A-2004/002495 WO-A-2005/000040 WO-A-2005/039597 WO-A1-2005/003329 WO-A1-2006/087391 WO-A1-2007/101675)

Stone, M. S., Martyn, L., & Weaver, C. M. (2016). Potassium Intake, Bioavailability, Hypertension, and Glucose Control. *Nutrients*, *8*(7), 444. https://doi.org/10.3390/nu8070444

Swaisgood, H. E. (1989). Structural Changes in Milk Proteins. En C. A. Barth & E. Schlimme (Eds.), *Milk Proteins: Nutritional, Clinical, Functional and Technological Aspects* (pp. 192-210). Steinkopff. https://doi.org/10.1007/978-3-642-85373-9_30

Szwajkowska, M., Wolanciuk, A., Barłowska, J., Król, J., & Litwińczuk, Z. (2011). *Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumers' immune system – a review*. https://publisherspanel.com/api/files/view/36672.pdf

Tadapaneni, R. K., Banaszewski, K., Patazca, E., Edirisinghe, I., Cappozzo, J., Jackson, L., & Burton-Freeman, B. (2012). Effect of High-Pressure Processing and Milk on the Anthocyanin Composition and Antioxidant Capacity of Strawberry-Based Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(23), 5795-5802. https://doi.org/10.1021/jf2035059

Tallapragada, P., & Rayavarapu, B. (2019). 5—Recent Trends and Developments in Milk-Based Beverages. En A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Milk-Based Beverages* (pp. 139-172). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815504-2.00005-0

Tamargo, A., Cueva, C., Silva, M., Molinero, N., Miralles, B., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2022). Gastrointestinal co-digestion of wine polyphenols with glucose/whey proteins affects their bioaccessibility and impact on colonic microbiota. *Food Research International*, *155*. Scopus. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111010

Tejada, F. (2008). Alteraciones del equilibrio del Potasio: Hipopotasemia. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, *2*(3), 129-133.

Teniza, O. (2008). *Estudio del suero de queso de leche de vaca y propuesta para el reuso del mismo* [Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional]. https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/8662/1/Tesis%20de%20Grado%20Ogilver.pdf

Teza, H., Boonmanunt, S., Unwanatham, N., Thadanipon, K., Limpijankit, T., Pattanaprateep, O., Pattanateepapon, A., McKay, G. J., Attia, J., & Thakkinstian, A. (2023). Evaluation

of transitions from early hypertension to hypertensive chronic kidney disease, coronary artery disease, stroke and mortality: A Thai real-world data cohort. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *10*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2023.1170010

Thissen, J. P., Pucilowska, J. B., & Underwood, L. E. (1994). Differential regulation of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein-1 messenger ribonucleic acids by amino acid availability and growth hormone in rat hepatocyte primary culture. *Endocrinology*, *134*(3), 1570-1576. https://doi.org/10.1210/endo.134.3.7509741

Thompson, J. L., & Manore, M. M. (2008). *Nutrición* (Addison Wesley, Vol. 1). Pearson Educación. https://books.google.co.ve/books?id=UQrnPgAACAAJ

Tienstra, P. A., van Riel, J. A. M., Mingorance, M. D., & Olieman, C. (1992). Assessment of the capabilities of capillary zone electrophoresis for the determination of hippuric and orotic acid in whey. *Journal of Chromatography A*, *608*(1), 357-361. https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)87143-V

Timby, N., Hernell, O., Vaarala, O., Melin, M., Lönnerdal, B., & Domellöf, M. (2015). Infections in Infants Fed Formula Supplemented With Bovine Milk Fat Globule Membranes. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *60*(3), 384-389. https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000624

Tonolo, F., Fiorese, F., Moretto, L., Folda, A., Scalcon, V., Grinzato, A., Ferro, S., Arrigoni, G., Bindoli, A., Feller, E., Bellamio, M., Marin, O., & Rigobello, M. P. (2020). Identification of New Peptides from Fermented Milk Showing Antioxidant Properties: Mechanism of Action. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *9*(2), 117. https://doi.org/10.3390/antiox9020117

Torres-Llanez, M. de J., Vallejo-Cordoba, B., & González-Córdova, A. F. (2005). Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, *55*(2), 111-117.

Trujillo, J. (2019). La colada morada: Antropología de la culinaria ritual ecuatoriana. *Revista Anales*, *1*(377), Article 377.

Tsermoula, P., Khakimov, B., Nielsen, J. H., & Engelsen, S. B. (2021). WHEY - The waste-stream that became more valuable than the food product. *Trends in Food Science & Technology*, *118*, 230-241. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.025

Tunick, M. H., & Van Hekken, D. L. (2017). Fatty Acid Profiles of In Vitro Digested Processed Milk. *Foods*, *6*(11), Article 11. https://doi.org/10.3390/foods6110099

Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2012). Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. *Journal of Food Science*, *77*(1), R11-R24. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x

Urtasun, N., Hirsch, D. B., Baieli, M. F., Miranda, M. V., Cascone, O., & Wolman, F. J. (2018). *Valorización del suero del queso: Un desafío para la cromatografía a escala industrial*. https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/86987

Valiente, M. L., Salinas Ruiz, F., & Verdejo González, M. A. (2001). Los fármacos opioides en atención primaria. *Medicina Integral*, *38*(3), 116-126.

Vanden Braber, N., Vergara, L., Rossi, Y., Aminahuel, C., Mauri, A., Cavaglieri, L., & Montenegro, M. (2020). Effect of microencapsulation in whey protein and water-soluble chitosan derivative on the viability of the probiotic Kluyveromyces marxianus VM004 during storage and in simulated gastrointestinal conditions. *LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY*, *118*. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108844

Vargas Villalobos, O., Cambronero Castro, O., & Elizondo Salazar, J. A. (2017). Suplementación con hidroxianálogo de metionina: Efecto sobre el desempeño productivo en vacas lecheras. *Agronomía Mesoamericana*, *28*(3), 643. https://doi.org/10.15517/ma.v28i3.26897

Vegarud, G. E., Langsrud, T., & Svenning, C. (2000). Mineral-binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics. *British Journal of Nutrition*, *84*(S1), 91-98. https://doi.org/10.1017/S0007114500002300

Veisseyre, R. 10725. (1988). *Lactología técnica: Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche*. Zaragoza : Acribia. http://biblioteca.fvet.uba.ar/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=23

Verardo, V., Gómez-Caravaca, A. M., Arráez-Román, D., & Hettinga, K. (2017). Recent Advances in Phospholipids from Colostrum, Milk and Dairy By-Products. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(1), Article 1. https://doi.org/10.3390/ijms18010173

Villareal, K. (2014). *La colada Morada como producto gastronómico tradicional en el desarrollo del turismo cultural en el cantón Quito* [Universidad Tecnológica Equinoccial]. http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/11161/1/58809_1.pdf

Vivanco-Maroto, S. M., Santos-Hernández, M., Sanchón, J., Picariello, G., Recio, I., & Miralles, B. (2022). In vitro digestion of milk proteins including intestinal brush border membrane peptidases. Transepithelial transport of resistant casein domains. *Food Research International*, *157*, 111238. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111238

Von Oesen, T., Treblin, M., Staudacher, A., Clawin-Rädecker, I., Martin, D., Hoffmann, W., Schrader, K., Bode, K., Zink, R., Rohn, S., & Fritsche, J. (2023). Determination and evaluation of whey protein content in matured cheese via liquid chromatography. *LWT*, *174*, 114347. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114347

Wada, Y., & Lönnerdal, B. (2015). Bioactive peptides released by in vitro digestion of standard and hydrolyzed infant formulas. *Peptides*, *73*, 101-105. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.09.005

Walstra, P. (2018). *Dairy Science And Technology*. https://www.iberlibro.com/9781498767385/Dairy-Science-Technology-2Ed-2018-1498767389/plp

Walters, M. E., Esfandi, R., & Tsopmo, A. (2018). Potential of Food Hydrolyzed Proteins and Peptides to Chelate Iron or Calcium and Enhance their Absorption. *Foods*, *7*(10), Article 10. https://doi.org/10.3390/foods7100172

Wang, Cai, M., Zeng, H., Zhao, H., Zhang, M., & Yang, Z. (2022). Preparation, Characterization and Iron Absorption by Caco-2 Cells of the Casein Peptides-Iron Chelate. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *28*(4), 116. https://doi.org/10.1007/s10989-022-10423-z

Wang, J., Aalaei, K., Skibsted, L. H., & Ahrné, L. M. (2023). Calcium bioaccessibility increased during gastrointestinal digestion of α-lactalbumin and β-lactoglobulin. *Food Research International*, *164*, 112415. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112415

Wang, X., Ai, T., Meng, X. L., Zhou, J., & Mao, X. Y. (2014). In vitro iron absorption of α-lactalbumin hydrolysate-iron and β-lactoglobulin hydrolysate-iron complexes. *Journal of Dairy Science*, *97*(5), 2559-2566. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7461

Watson, L. E., Phillips, L. K., Wu, T., Bound, M. J., Checklin, H., Grivell, J., Jones, K. L., Horowitz, M., & Rayner, C. K. (2019). Title: Differentiating the effects of whey protein and guar gum preloads on postprandial glycemia in type 2 diabetes. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, *38*(6), 2827-2832. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.12.014

Weber, F. (1990). *El desuerado del coágulo*. http://www.ediciones-omega.es/tecnologia-vinicola-y-alimentaria/610-el-queso-978-84-282-0838-3.html

Wen-qiong, W., Yun-chao, W., Xiao-feng, Z., Rui-xia, G., & Mao-lin, L. (2019). Whey protein membrane processing methods and membrane fouling mechanism analysis. *Food Chemistry*, *289*, 468-481. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.086

Wickramasinghe, U., & Dekermendjian, H. (2021). *Dairy Market Review*. https://www.fao.org/3/cb7982en/cb7982en.pdf

Wojtas, E., Zachwieja, A., Piksa, E., Zielak-Steciwko, A. E., Szumny, A., & Jarosz, B. (2020). Effect of Soy Lecithin Supplementation in Beef Cows before Calving on Colostrum Composition and Serum Total Protein and Immunoglobulin G Concentrations in Calves. *Animals*, *10*(5), Article 5. https://doi.org/10.3390/ani10050765

Wu, G., Hui, X., Gong, X., Tran, K. N., Stipkovits, L., Mohan, M. S., Brennan, M. A., & Brennan, C. S. (2021). Functionalization of bovine whey proteins by dietary phenolics from molecular-level fabrications and mixture-level combinations. *Trends in Food Science & Technology*, *110*, 107-119. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.072

Wu, T., Little, T. J., Bound, M. J., Borg, M., Zhang, X., Deacon, C. F., Horowitz, M., Jones, K. L., & Rayner, C. K. (2016). A Protein Preload Enhances the Glucose-Lowering Efficacy of Vildagliptin in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, *39*(4), 511-517. https://doi.org/10.2337/dc15-2298

Xie, Y., Peng, X., Li, Z., Wang, J., Li, M., Xiao, S., & Zhang, S. (2022). Production and fermentation characteristics of antifungal peptides by synergistic interactions with Lactobacillus paracasei and Propionibacterium freudenii in supplemented whey protein formulations. *LWT*, *164*, 113632. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113632

Xu, L., Gong, Y., Gern, J., & Lucey, J. (2020). Influence of whey protein hydrolysis in combination with dextran glycation on immunoglobulin E binding capacity with blood sera obtained from patients with a cow milk protein allergy. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*, *103*(2), 1141-1150. https://doi.org/10.3168/jds.2019-17187

Xu, R., Liu, N., Xu, X., & Kong, B. (2011). Antioxidative effects of whey protein on peroxide-induced cytotoxicity. *Journal of Dairy Science*, *94*(8), 3739-3746. https://doi.org/10.3168/jds.2010-3891

Xu, T., Chen, J., Yang, K., Qiao, W., Zhao, J., & Chen, L. (2022). Quantitative Determination of Whey Protein to Casein Ratio in Infant Formula Milk Powder. *FRONTIERS IN CHEMISTRY*, *10*. https://doi.org/10.3389/fchem.2022.872251

Xu, W., Tang, Y., Yang, Y., Wang, G., & Zhou, S. (2020). Establishment of a stable complex formed from whey protein isolate and chitosan and its stability under environmental stresses. *International Journal Of Biological Macromolecules*, *165*(Parte B), 2823-2833. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.130

Yadav, J. S. S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, *33*(6, Part 1), 756-774. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002

Yamauchi, Usui, Yunden, & Takenaka. (2003). *Caracterización de la β-lactotensina, un péptido bioactivo derivado de la β-lactoglobulina bovina, como agonista de la neurotensina*. https://doi.org/10.1271/bbb.67.940

Ye, A., & Singh, H. (2000). Influence of calcium chloride addition on the properties of emulsions stabilized by whey protein concentrate. *Food Hydrocolloids*, *14*(4), 337-346. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(00)00010-2

Ye, A., Wang, X., Lin, Q., Han, J., & Singh, H. (2020). Dynamic gastric stability and in vitro lipid digestion of whey-protein-stabilised emulsions: Effect of heat treatment. *Food Chemistry*, *318*, 126463. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126463

Yi, J., & Ding, Y. (2014). Dual Effects of Whey Protein Isolates on the Inhibition of Enzymatic Browning and Clarification of Apple Juice. *CZECH JOURNAL OF FOOD SCIENCES*, *32*(6), 601-609. https://doi.org/10.17221/69/2014-CJFS

Yin, X., Fu, X., Cheng, H., Wusigale, & Liang, L. (2020). α-Tocopherol and naringenin in whey protein isolate particles: Partition, antioxidant activity, stability and bioaccessibility. *Food Hydrocolloids*, *106*, 105895. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105895

Yoon, Y.-C., An, S.-I., Jeong, A.-R., Han, S.-E., Kim, M.-H., & Lee, C.-K. (2010). Characteristics of Whey Protein (WPC-30) Hydrolysate from Cheese Whey. *Journal of Animal Science and Technology*, *52*(5), 435-440. https://doi.org/10.5187/JAST.2010.52.5.435

Zaman, Q. U., Sahar, A., Sameen, A., Ahmad, M. H., Muhammad, N., Huma, N., Afzal, M. F., Khalid, W., & Al-Farga, A. (2023). Development and Storage Stability of Whey Sugarcane Based Functional Beverage. *International Journal of Food Properties*, *26*(1), 752-763. https://doi.org/10.1080/10942912.2023.2183170

Zandona, E., Blažić, M., & Režek Jambrak, A. (2021). Whey Utilisation: Sustainable Uses and Environmental Approach. *Food Technology and Biotechnology*, *59*(2), 147-161. https://doi.org/10.17113/ftb.59.02.21.6968

Zang, Z., Chou, S., Tian, J., Lang, Y., Shen, Y., Ran, X., Gao, N., & Li, B. (2021). Effect of whey protein isolate on the stability and antioxidant capacity of blueberry anthocyanins: A mechanistic and in vitro simulation study. *Food Chemistry*, *336*, 127700. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127700

Zhang, Q.-X., Wu, H., Ling, Y.-F., & Lu, R.-R. (2013). Isolation and identification of antioxidant peptides derived from whey protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and Q-TOF MS. *Journal of Dairy Research*, *80*(3), 367-373. https://doi.org/10.1017/S0022029913000320

Zhao, L., Wang, X., Tian, Q., & Mao, X. (2016). Effect of casein to whey protein ratios on the protein interactions and coagulation properties of low-fat yogurt. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*, *99*(10), 7768-7775. https://doi.org/10.3168/jds.2015-10794

Zhao, Y., Weaver, A., Fellner, V., Payne, R., & Kim, S. (2014). Amino acid fortified diets for weanling pigs replacing fish meal and whey protein concentrate: Effects on growth, immune status, and gut health. *JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY*, *5*. https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-57

Zhao, Z., Corredig, M., & Gaygadzhiev, Z. (2019). Determination of the whey protein index in milk protein concentrates. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*, *102*(9), 7760-7764. https://doi.org/10.3168/jds.2019-16547

Zhao, Z., Li, H., Zhao, M., & Li, Q. (2018). Structural and surface properties of whey protein from buffalo milk as influenced by exopolysaccharide. *International Journal Of Food Properties*, *20*(S3), S2323-S2331. https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1347673

Zhao, Z., Liu, N., Wang, C., Cheng, J., & Guo, M. (2021). Proteomic analysis of differentially expressed whey proteins in Saanen goat milk from different provinces in China using a data-independent acquisition technique. *Journal Of Dairy Science*, *104*(10), 10513-10527. https://doi.org/10.3168/jds.2020-19877

Zong, X., Cao, X., Wang, H., Zhao, J., Lu, Z., Wang, F., & Wang, Y. (2019). Porcine lactoferrin-derived peptide LFP-20 modulates immune homoeostasis to defend lipopolysaccharide-triggered intestinal inflammation in mice. *British Journal of Nutrition*, *121*(11), 1255-1263. https://doi.org/10.1017/S0007114519000485

Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, *114*(1), 310-316. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033