

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del grado Académico de
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**OBTENCIÓN DE UN INGREDIENTE BIOACTIVO MEDIANTE
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA PROTEÍNA TOTAL DEL
SUERO LÁCTEO: CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y
APLICACIÓN ALIMENTARIA**

Agustina Eberhardt

Director de Tesis: Dr. Guillermo A Sihufe
Co-Director de Tesis: Dr. Enrique J Mammarella

Grupo de Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, Instituto de Desarrollo
Tecnológico para la Industria Química (INTEC-UNL-CONICET)

-2025-

AGRADECIMIENTOS

El camino recorrido hasta la finalización de esta Tesis ha sido un desafío lleno de aprendizajes, esfuerzo y acompañamiento. Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a quienes, de una u otra manera, han sido parte de este proceso:

Al **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)**, por la beca otorgada, que hizo posible la realización de este trabajo.

A la **Universidad Nacional del Litoral (UNL)**, la **Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**, y al **Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC)**, por el espacio de formación y por brindarme los recursos necesarios para llevar adelante esta investigación.

A mis **directores de Tesis**, por confiar en mí, por aceptar acompañarme en este desafío académico y por los conocimientos compartidos a lo largo de este proceso.

En especial, a **Guille**, por su acompañamiento constante, su compromiso, su enorme paciencia y su valiosa guía en cada etapa del trabajo. Gracias por confiar en mí más de lo que yo misma lo hice, y por ver en mí el potencial que muchas veces no supe reconocer. Su dedicación y cercanía fueron pilares fundamentales para la concreción de este trabajo.

Al **Grupo de Ingeniería en Alimentos y Biotecnología**, por hacerme sentir parte desde el primer día. A cada uno de sus integrantes, por su generosidad, compañerismo y por compartir sus conocimientos. En particular, a **Richard**, por haber acompañado de cerca las distintas instancias del proceso, junto a mis directores de Tesis; a **Fer**, por estar siempre presente, colaborando y por hacerse cargo de las experiencias durante mi licencia por maternidad, asumiendo esa tarea con generosidad y compromiso; y a **Dani, Barbi y Nacho**, por su aporte en experiencias puntuales a lo largo de este trabajo.

A **Facundo**, por su gran ayuda en las experiencias de análisis sensorial y por dedicar su tiempo de manera desinteresada.

A **Yanina y Mariana**, por su colaboración en las determinaciones de citotoxicidad y citoprotección.

A mis compañeras: **Nadia, Jesi, Bren, Flor y Emi**, por hacer más llevadero el día a día. Gracias por los momentos compartidos, por las charlas, los consejos y la contención en los momentos difíciles. También a **Robin**, mi excompañero de oficina, por hacer más alegres las mañanas compartidas y por sus consejos.

A mi **familia**, por su acompañamiento y apoyo incondicional a lo largo de todo este camino. En especial, a **mis padres**, por su enorme ayuda y dedicación en el cuidado de Mateo, que me

permitió contar con el tiempo y la tranquilidad necesarios para concluir esta Tesis. Gracias por su amor y por estar siempre.

A mis **amigos**, por estar siempre presentes, celebrando cada logro y sosteniéndome en los momentos más difíciles.

A mi **comunidad de iglesia**, por ser un espacio de fortaleza espiritual y de crecimiento personal, donde siempre encontré contención y aliento para seguir adelante.

A **Rodri** y **Mateo**, quienes son y serán siempre mi mayor fuente de inspiración, motivación, mi sostén y mi mayor alegría. Gracias por la paciencia, el amor y la comprensión en cada etapa de este proceso.

Mateo, esta Tesis también es para vos, con la esperanza de que te animes siempre a soñar en grande y a luchar por todo lo que desees.

A todos aquellos que, de una u otra manera, han formado parte de este camino, **¡gracias!**

APORTES CIENTÍFICOS-TECNOLÓGICOS

Artículos publicados en revistas científicas:

- Eberhardt, A., López, E. C., Ceruti, R. J., Marino, F., Mammarella, E. J., Manzo, R. M., & Sihufe, G. A. (2019). Influence of the degree of hydrolysis on the bioactive properties of whey protein hydrolysates using Alcalase®. *International Journal of Dairy Technology*, 72(4), 573-584. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12606>
- Eberhardt, A., López, E. C., Marino, F., Mammarella, E. J., Manzo, R. M., & Sihufe, G. A. (2021). Whey protein hydrolysis with microbial proteases: determination of kinetic parameters and bioactive properties for different reaction conditions. *International Journal of Dairy Technology*, 74(3), 489-504. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12795>
- López, E. C., Eberhardt, A., Marino, F., Mammarella, E. J., Sihufe, G. A., & Manzo, R. M. (2022). Physicochemical characterisation of ACE-inhibitory and antioxidant peptides from Alcalase® whey protein hydrolysates using fractionation strategies. *International Journal of Dairy Technology*, 75(3), 538-552. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12872>
- Eberhardt, A., Niizawa, I., López, E., Rossi, Y., Montenegro, M., Mammarella, E., Manzo, R., & Sihufe, G. (2024). Production of whey protein ingredients with improved bioactivity based on single and sequential enzymatic hydrolysis reactions. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*. <https://doi.org/10.1007/s43393-024-00318-z>

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| LISTA ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS..... | 8 |
| RESUMEN..... | 10 |
| ABSTRACT | 12 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 15 |
| 1.1. La industria láctea en Argentina | 15 |
| 1.2. El lactosuero: caracterización | 16 |
| 1.3. Aprovechamiento del lactosuero | 18 |
| 1.4. Las proteínas del lactosuero | 19 |
| 1.4.1. <i>Importancia de las proteínas del lactosuero</i> | 21 |
| 1.5. Hidrólisis de proteínas | 24 |
| 1.5.1. <i>Proceso de hidrólisis enzimática</i> | 26 |
| 1.5.2. <i>Proteasas: enzimas clave en la hidrólisis de proteínas</i> | 28 |
| 1.6. Caracterización de hidrolizados de proteínas..... | 30 |
| 1.7. Hidrolizados enzimáticos como ingredientes funcionales | 31 |
| 2. OBJETIVOS DEL TRABAJO | 35 |
| 2.1. Objetivo general | 35 |
| 2.2. Objetivos específicos | 35 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 37 |
| 3.1. OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO | 37 |
| 3.1.A. Protocolo general del proceso de hidrólisis enzimática..... | 37 |
| 3.1.B. Experiencias preliminares | 40 |
| 3.1.C. Obtención de los ingredientes funcionales | 41 |
| 3.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS OBTENIDOS | 42 |
| 3.2.A. Caracterización de los WPHs obtenidos en experiencias preliminares..... | 43 |
| 3.2.A.1. <i>Grado de hidrólisis y cinética de hidrólisis enzimática</i> | 43 |
| 3.2.A.2. <i>Perfil peptídico</i> | 44 |
| 3.2.A.3. <i>Índice de hidrofobicidad</i> | 45 |
| 3.2.A.4. <i>Actividad antihipertensiva</i> | 46 |
| 3.2.A.5. <i>Actividad antioxidante</i> | 49 |
| 3.2.B. Caracterización de los ingredientes funcionales | 51 |
| 3.2.B.1. <i>Determinación de las propiedades fisicoquímicas</i> | 51 |
| ❖ <i>Grado de hidrólisis</i> | 51 |
| ❖ <i>Potencial zeta</i> | 51 |
| ❖ <i>Distribución de tamaño molecular</i> | 52 |
| ❖ <i>Electroforesis</i> | 52 |
| ❖ <i>Perfil peptídico</i> | 54 |
| ❖ <i>Índice de hidrofobicidad</i> | 54 |

| | |
|--|------------|
| ❖ Perfil de aminoácidos libres..... | 54 |
| 3.2.B.2. Determinación de la composición | 57 |
| ❖ Contenido de proteínas y humedad..... | 57 |
| ❖ Contenido de materia grasa | 57 |
| ❖ Contenido de carbono | 58 |
| ❖ Contenido de cationes | 58 |
| 3.2.B.3. Determinación de las propiedades funcionales | 59 |
| ❖ Solubilidad | 59 |
| ❖ Estabilidad térmica | 60 |
| ❖ Viscosidad..... | 60 |
| ❖ Capacidad de absorción de aceite..... | 62 |
| ❖ Capacidad emulsionante..... | 62 |
| ❖ Capacidad espumante..... | 64 |
| ❖ Propiedad gelificante | 64 |
| 3.2.B.4. Determinación de las propiedades bioactivas | 66 |
| ❖ Citotoxicidad y citoprotección..... | 66 |
| ❖ Actividad antihipertensiva..... | 67 |
| ❖ Actividad antioxidante..... | 67 |
| ❖ Actividad antimicrobiana..... | 67 |
| ❖ Capacidad quelante de calcio | 69 |
| 3.3. INCORPORACIÓN DE LOS INGREDIENTES EN UNA MATRIZ ALIMENTARIA..... | 71 |
| 3.3.A. Formulación de postres lácteos | 71 |
| 3.3.B. Análisis sensorial de las formulaciones de postres lácteos | 73 |
| 3.3.B.1. Análisis Sensorial Descriptivo Cuantitativo (QDA®) | 73 |
| 3.3.B.2. Caracterización sensorial basada en consumidores..... | 74 |
| ❖ Aceptabilidad (Overall Liking)..... | 74 |
| ❖ Intención de Compra..... | 75 |
| 3.3.C. Sinéresis de las formulaciones de postres lácteos | 76 |
| 3.3.D. Propiedades bioactivas de las formulaciones de postres lácteos | 76 |
| 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 76 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 78 |
| 4.1. EXPERIENCIAS PRELIMINARES DE OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE WPHS | 78 |
| 4.1.A. Obtención de hidrolizados..... | 78 |
| 4.1.B. Caracterización de hidrolizados..... | 81 |
| 4.1.B.1. Grado de hidrólisis y cinética de hidrólisis enzimática | 81 |
| ❖ Grado de hidrólisis..... | 81 |
| ❖ Cinética de hidrólisis enzimática..... | 88 |
| 4.1.B.2. Perfil peptídico | 93 |
| 4.1.B.3. Índice de hidrofobicidad..... | 96 |
| 4.1.B.4. Actividad antihipertensiva | 99 |
| 4.1.B.5. Actividad antioxidante..... | 103 |
| 4.2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS INGREDIENTES FUNCIONALES | 107 |
| 4.2.A. Obtención de los ingredientes funcionales..... | 107 |

| | |
|---|------------|
| 4.2.B. Caracterización de los ingredientes funcionales | 107 |
| 4.2.B.1. Determinación de las propiedades fisicoquímicas | 107 |
| ❖ <i>Grado de hidrólisis.....</i> | <i>107</i> |
| ❖ <i>Potencial zeta</i> | <i>109</i> |
| ❖ <i>Distribución de tamaño molecular.....</i> | <i>110</i> |
| ❖ <i>Electroforesis</i> | <i>111</i> |
| ❖ <i>Perfil peptídico</i> | <i>112</i> |
| ❖ <i>Índice de hidrofobicidad.....</i> | <i>113</i> |
| ❖ <i>Perfil de aminoácidos libres.....</i> | <i>115</i> |
| 4.2.B.2. Determinación de la composición | 118 |
| ❖ <i>Contenido de materia grasa, proteínas y humedad</i> | <i>118</i> |
| ❖ <i>Contenido de carbono</i> | <i>119</i> |
| ❖ <i>Contenido de cationes</i> | <i>119</i> |
| 4.2.B.3. Determinación de las propiedades funcionales..... | 120 |
| ❖ <i>Solubilidad</i> | <i>120</i> |
| ❖ <i>Estabilidad térmica.....</i> | <i>123</i> |
| ❖ <i>Viscosidad.....</i> | <i>126</i> |
| ❖ <i>Capacidad de absorción de aceite.....</i> | <i>131</i> |
| ❖ <i>Capacidad emulsionante.....</i> | <i>133</i> |
| ❖ <i>Capacidad espumante.....</i> | <i>135</i> |
| ❖ <i>Propiedad gelificante</i> | <i>140</i> |
| 4.2.B.4. Determinación de las propiedades bioactivas | 142 |
| ❖ <i>Citotoxicidad y citoprotección.....</i> | <i>143</i> |
| ❖ <i>Actividad antihipertensiva.....</i> | <i>147</i> |
| ❖ <i>Actividad antioxidante.....</i> | <i>149</i> |
| ❖ <i>Actividad antimicrobiana.....</i> | <i>153</i> |
| ❖ <i>Capacidad quelante de calcio</i> | <i>158</i> |
| | |
| 4.3. INCORPORACIÓN DE LOS INGREDIENTES EN UNA MATRIZ ALIMENTARIA..... | 163 |
| 4.3.A. Análisis sensorial de las formulaciones de postres lácteos..... | 164 |
| 4.3.A.1. Análisis Sensorial Descriptivo Cuantitativo (QDA®) | 165 |
| 4.3.A.2. Caracterización sensorial basada en consumidores..... | 168 |
| ❖ <i>Aceptabilidad.....</i> | <i>168</i> |
| ❖ <i>Intención de Compra.....</i> | <i>170</i> |
| 4.3.B. Sinéresis de formulaciones de postres lácteos..... | 171 |
| 4.3.C. Propiedades bioactivas de formulaciones de postres lácteos..... | 172 |
| ❖ <i>Actividad antihipertensiva.....</i> | <i>172</i> |
| ❖ <i>Actividad antioxidante.....</i> | <i>174</i> |
| | |
| 5. CONCLUSIONES | 179 |
| | |
| 6. BIBLIOGRAFÍA..... | 182 |
| | |
| 7. ANEXOS..... | 202 |

LISTA ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| Abreviatura | Definición |
|--------------------|--|
| α -LA | Alfa-lactoalbúmina |
| β -LG | Beta-lactoglobulina |
| AAH | Actividad antihipertensiva |
| AAM | Actividad antimicrobiana |
| AAO | Actividad antioxidante |
| ABTS | Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico |
| ABTS* ⁺ | Radical ABTS (ABTS en su forma oxidada) |
| ALC | Alcalase® 2.4L, preparado enzimático comercial |
| BFS | Buffer fosfato de sodio |
| BSA | Albúmina de suero bovina |
| Ca-CC | Capacidad quelante de calcio |
| Caco-2/TC7 | Células de carcinoma intestinal humano |
| CE | Capacidad emulsionante |
| CF | Capacidad espumante |
| CSH | Control de proteínas de suero sin hidrolizar |
| D | Porcentaje de disminución de color del radical ABTS* ⁺ a 734 nm |
| DCC | Diseño compuesto central |
| DH | Grado de hidrólisis |
| E.C | <i>Escherichia coli</i> |
| E.F | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| ECA | Enzima convertidora de angiotensina I |
| EE | Estabilidad de la emulsión |
| FC | Formulación de postre lácteo utilizado como muestra control |
| FLA | Flavourzyme® 500L, preparado enzimático comercial |
| FWPC-80 | Formulación de postre lácteo que contiene WPC-80 |
| FWPH-A | Formulación de postre lácteo que contiene WPH-A |
| FWPH-AF | Formulación de postre lácteo que contiene WPH-AF |
| HA | Hidrofobicidad alta |
| HB | Hidrofobicidad baja |
| HHL | Hipuril-L-histidil-L-leucina |
| HM | Hidrofobicidad media |
| IEC-18 | Células de epitelio intestinal de ratas |
| L.M | <i>Listeria monocytogenes</i> |

| Abreviatura | Definición |
|---------------------|--|
| MEN | Menadiona |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol |
| P.A | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| PD | Proteína desnaturalizada |
| QDA | Análisis sensorial descriptivo cuantitativo |
| Relación E/S | Relación porcentual entre la cantidad de enzima empleada respecto del sustrato disponible |
| RSM | Método de superficie de respuesta |
| S | Solubilidad |
| S.A | <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> |
| TC | Carbono total |
| TEAC | Capacidad antioxidante equivalente de Trolox |
| TIC | Carbono inorgánico total |
| TOC | Carbono orgánico total |
| Trolox | Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico |
| TT | 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina |
| WP | Proteínas del suero lácteo |
| WPC | Concentrado de proteínas de suero lácteo |
| WPC-80 | Concentrado de proteínas de suero lácteo con 80% (m/m) de proteína |
| WPH | Hidrolizado de proteínas de suero lácteo |
| WPH-A | Hidrolizado de proteínas de suero lácteo obtenido por hidrólisis enzimática con Alcalase® 2.4L como ingrediente potencialmente funcional |
| WPH-AF | Hidrolizado de proteínas de suero lácteo obtenido por hidrólisis mediante combinación enzimática secuencial, primero con Alcalase® 2.4L y luego con Flavourzyme® 500L, como ingrediente potencialmente funcional |
| WPHs ALC | Hidrolizados de proteínas de suero lácteo obtenido por hidrólisis enzimática con Alcalase® 2.4L en experiencias preliminares |
| WPHs FLA | Hidrolizados de proteínas de suero lácteo obtenido por hidrólisis enzimática con Flavourzyme® 500L en experiencias preliminares |
| WPI | Aislado de proteínas de suero lácteo |

RESUMEN

La industria láctea argentina es un pilar fundamental del sector agroindustrial, con la producción de quesos como principal destino de la leche procesada. Este proceso genera grandes volúmenes de lactosuero, un subproducto históricamente considerado un residuo de alto impacto ambiental debido a su elevada carga orgánica. Sin embargo, en las últimas décadas, el lactosuero ha sido revalorizado como una fuente de proteínas de alto valor biológico con aplicaciones crecientes en la industria alimentaria.

Las proteínas del lactosuero (WP) poseen un perfil nutricional destacado y presentan propiedades funcionales y bioactivas de interés. En particular, los péptidos generados a partir de su hidrólisis han demostrado, en numerosos estudios, que poseen actividades antioxidantes, antihipertensivas, antimicrobianas e inmunomoduladoras, entre otras. La hidrólisis enzimática es la estrategia más utilizada para la obtención de estos péptidos y, según estudios previos, mejora además la digestibilidad y reduce la alergenicidad de las proteínas. Sin embargo, este proceso enfrenta desafíos en la selección de las preparaciones enzimáticas y las condiciones fisicoquímicas que favorezcan la bioactividad, además de la necesidad de mitigar la aparición de algunas características indeseadas como el desarrollo de sabor amargo asociado a péptidos hidrofóbicos y a la posible acumulación de cenizas.

El aprovechamiento integral del lactosuero a través de la producción de ingredientes bioactivos representa una oportunidad estratégica para la industria láctea. Su valorización no solo contribuye a minimizar el impacto ambiental, sino que también permite el desarrollo de productos de mayor valor agregado, en línea con la creciente demanda de alimentos funcionales. En este contexto, el presente trabajo se centra en la obtención y caracterización de hidrolizados proteicos a partir de concentrado de proteínas de suero lácteo (WPC-80), utilizando proteasas comerciales con el objetivo de obtener ingredientes que puedan ser incorporados en matrices alimentarias de consumo masivo.

Inicialmente, para evaluar la hidrólisis enzimática del WPC-80, se emplearon Alcalase® (ALC) y Flavourzyme® (FLA) por separado, analizando las condiciones del proceso en función de la concentración de sustrato, el pH y la relación enzima/sustrato. A partir de los resultados obtenidos, se seleccionó la hidrólisis con ALC para la obtención de un potencial ingrediente funcional (WPH-A) y se diseñó un proceso de hidrólisis secuencial con ALC seguida de FLA para generar un segundo ingrediente (WPH-AF).

En una segunda etapa, ambos ingredientes fueron caracterizados exhaustivamente para determinar sus propiedades fisicoquímicas, composición química, funcionalidad y bioactividad. Los resultados indicaron que ambos tratamientos modificaron significativamente la estructura

de las proteínas del suero, reduciendo el punto isoeléctrico y promoviendo su degradación, lo que generó compuestos con hidrofobicidad baja a media en comparación con el WPC-80. Desde el punto de vista funcional, los hidrolizados mejoraron parámetros tales como la solubilidad y la estabilidad térmica, redujeron la viscosidad y aumentaron la capacidad de absorción de aceite en comparación con el WPC-80. No obstante, la hidrólisis enzimática afectó negativamente la capacidad emulsionante y espumante, así como la propiedad gelificante. En la comparación de ambos ingredientes, WPH-AF presentó una mayor absorción de aceite y una menor viscosidad que WPH-A, reflejando el impacto del tipo de hidrólisis en la funcionalidad final del ingrediente.

En cuanto a las propiedades bioactivas, ambos hidrolizados fueron seguros (no citotóxicos) en las condiciones ensayadas, y mostraron efecto citoprotector frente a estrés oxidativo inducido. Además, evidenciaron una bioactividad superior a la del WPC-80, con mayores actividades antihipertensiva, antioxidante y antimicrobiana, lo que confirma que la hidrólisis enzimática potencia la funcionalidad biológica del potencial ingrediente. Los compuestos responsables de la bioactividad antihipertensiva y antioxidante se mantuvieron estables luego de efectuar tratamientos térmicos, reforzando su posible aplicación en la industria alimentaria. Asimismo, ambos hidrolizados mostraron capacidad quelante de calcio, lo que sugiere su posible aplicación en productos destinados a la fortificación mineral.

En la última etapa del estudio, los hidrolizados fueron incorporados en postres lácteos para evaluar su impacto en las propiedades sensoriales y bioactivas del producto final. Los ensayos confirmaron que su inclusión incrementó significativamente las actividades antihipertensiva y antioxidante (determinadas *in vitro*) de la matriz alimentaria. Entre las formulaciones, aquella que contenía WPH-A se destacó por lograr un equilibrio entre bioactividad y aceptación sensorial, además de ser tecnológicamente más sencilla, ya que su obtención requiere una única etapa enzimática.

Los resultados obtenidos confirman que la hidrólisis enzimática del concentrado de proteínas de suero permite la generación de ingredientes con propiedades funcionales y bioactivas mejoradas, con potencial aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales. La estabilidad de la bioactividad en una matriz láctea y su impacto positivo en la aceptación sensorial respaldan la factibilidad de empleo de estos ingredientes en la industria. Futuros estudios deberían centrarse en evaluar su estabilidad frente a la digestión gastrointestinal *in vitro* y, eventualmente, validar sus efectos mediante estudios *in vivo*, además de poner énfasis en algunas metodologías que permitan evaluar un posible escalado del proceso. En este contexto, la presente investigación contribuye a la valorización del lactosuero como materia prima, promoviendo su transformación en productos de alto valor agregado y abriendo nuevas posibilidades en la industria de alimentos funcionales y nutracéuticos.

ABSTRACT

The dairy industry of Argentina is a fundamental pillar of the agroindustrial sector, with cheese production being the main destination for processed milk. This process generates large volumes of whey, a byproduct historically considered a waste with high environmental impact due to its high organic load. However, in recent decades, whey has been revalued as a source of proteins of high biological value with growing applications in the food industry.

Whey proteins (WP) have an outstanding nutritional profile and exhibit functional and bioactive properties of interest. In particular, numerous studies have shown that the peptides generated from their hydrolysis have antioxidant, antihypertensive, antimicrobial, and immunomodulatory activities, among others. Enzymatic hydrolysis is the most used strategy to obtain these peptides, and according to previous studies, it also improves digestibility and reduces the allergenicity of proteins. However, this process faces challenges in the selection of enzyme preparations and physicochemical conditions that improve bioactivity, as well as the need to mitigate the appearance of undesirable characteristics such as the development of bitter flavor associated with hydrophobic peptides and the potential accumulation of ash.

The comprehensive use of whey through the production of bioactive ingredients represents a strategic opportunity for the dairy industry. Its valorization not only helps to minimize the environmental impact but also allows the development of higher-value products, aligning with the growing demand for functional foods. In this context, the present study focuses on the obtaining and characterization of protein hydrolysates from whey protein concentrate (WPC-80), using commercial proteases to obtain ingredients that can be incorporated into food matrices for mass consumption.

Initially, to evaluate the enzymatic hydrolysis of WPC-80, Alcalase® (ALC) and Flavourzyme® (FLA) were used separately, analyzing the process conditions based on substrate concentration, pH, and enzyme/substrate ratio. Based on the results obtained, hydrolysis with ALC was selected for the production of a potential functional ingredient (WPH-A), and a sequential hydrolysis process was designed using ALC followed by FLA to generate a second ingredient (WPH-AF).

In the second phase, both ingredients were thoroughly characterized to determine their physicochemical properties, chemical composition, functionality, and bioactivity. The results indicated that both treatments significantly modified the structure of whey proteins, reducing the isoelectric point and promoting their degradation, generating compounds with low to medium hydrophobicity compared to WPC-80. From a functional perspective, hydrolysates improved parameters such as solubility and thermal stability, reduced viscosity, and increased oil absorption capacity compared to WPC-80. However, enzymatic hydrolysis negatively affected the

emulsifying and foaming capacities, as well as the gelling properties. Comparing both ingredients, WPH-AF exhibited higher oil absorption and lower viscosity than WPH-A, reflecting the impact of the type of hydrolysis on the final functionality of the ingredient.

Regarding bioactive properties, both hydrolysates were safe (non-cytotoxic) under the conditions tested and demonstrated a cytoprotective effect against induced oxidative stress. Moreover, they exhibited superior bioactivity compared to WPC-80, with higher antihypertensive, antioxidant, and antimicrobial activities, confirming that enzymatic hydrolysis improves the biological functionality of the potential ingredient. The compounds responsible for antihypertensive and antioxidant bioactivity remained stable after thermal treatments, which reinforces their potential application in the food industry. Furthermore, both hydrolysates exhibited calcium-chelating capacity, which suggests their potential application in products intended for mineral fortification.

In the final phase of the study, the hydrolysates were incorporated into dairy desserts to evaluate their impact on the sensory and bioactive properties of the final product. The tests confirmed that their inclusion significantly increased the antihypertensive and antioxidant activities (*in vitro* determination) of the food matrix. Among the formulations, the one containing WPH-A stood out for achieving a balance between bioactivity and sensory acceptance, in addition to being technologically simpler since its production requires only a single enzymatic step.

The results obtained confirm that the enzymatic hydrolysis of whey protein concentrate allows the generation of ingredients with improved functional and bioactive properties, with potential applications in the development of functional foods. The stability of bioactivity in a dairy matrix and its positive impact on sensory acceptance support the feasibility of using these ingredients in the industry. Future studies should focus on evaluating their stability against *in vitro* gastrointestinal digestion and, eventually, validating their effects through *in vivo* studies, in addition to emphasizing methodologies that allow scaling the process. In this context, the present research contributes to the valorization of whey as a raw material, promoting its transformation into products with high-added value and opening new possibilities in the industry of functional and nutraceutical foods.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La industria láctea en Argentina

La industria láctea constituye uno de los sectores más importantes de la economía, tanto a nivel nacional como regional. La producción primaria de leche se concentra en la región central del país, donde el 85% de las unidades productivas se localizan en las provincias de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires. En el año 2022, Santa Fe lideró en cantidad de tambos, concentrando el 35% de las unidades dedicadas a la producción primaria de leche ([Bolsa de Comercio de Rosario, 2023](#)). En 2023, la producción total de leche en el país alcanzó los 11.325,6 millones de litros, con Córdoba y Santa Fe como los principales productores, aportando el 35,6% y el 32,2%, respectivamente ([OCLA, 2023](#)).

El principal destino de la producción lechera en Argentina es la industria quesera. Según datos del Observatorio de la Cadena Láctea Argentina (OCLA), en 2023 se destinó el 49,3% de la leche a la elaboración de quesos, mientras que el resto se utilizó para obtener leche en polvo (27%), leches fluidas (17,3%) y otros productos lácteos (6,4%). Específicamente, el 7,7% se empleó para la elaboración de quesos de pasta dura, el 21,8% para quesos de pasta semidura, el 17,8% para los de pasta blanda y el 2% en quesos de pasta muy blanda ([OCLA, 2023](#)). La elaboración de quesos requiere grandes volúmenes de leche y genera cantidades significativas de lactosuero. Se estima que, para producir 1 kg de queso, se necesitan aproximadamente 10 litros de leche y, en consecuencia, se generan hasta 9 litros de lactosuero ([Zhao et al., 2022](#)). Según estas proporciones y las estimaciones de 2023 del OCLA, en Argentina se producen alrededor de 13,8 millones de litros de lactosuero por día.

Históricamente, el lactosuero era considerado uno de los principales contaminantes de la industria láctea debido a su elevada carga orgánica y gran volumen ([Brandelli et al., 2015](#)). Con valores de demanda bioquímica y química de oxígeno, DBO y DQO, entre 27 y 60 g O₂/L y 50 y 102 g O₂/L, respectivamente, su vertido sin tratamiento representa un alto impacto ambiental, generando una contaminación equivalente a la de una población de 1.250.000 habitantes por cada 400.000 litros descartados ([Terán et al., 2010](#); [Yadav et al., 2015](#)). Sin embargo, en las últimas décadas, la percepción del lactosuero ha cambiado gracias a su notable revalorización. Este cambio se debe a la creciente necesidad de reducir desechos industriales, maximizar beneficios económicos y recuperar las proteínas de alto valor biológico que contiene ([Talamoni et al., 2023](#)). De esta manera, la transformación de este abundante subproducto lácteo no solo ofrece una solución ambiental, sino que también representa una oportunidad económica mediante el desarrollo de productos de mayor valor agregado ([Terán et al., 2010](#)).

1.2. El lactosuero: caracterización

Según el Código Alimentario Argentino, el suero, suero de lechería o lactosuero, se define como *“el líquido obtenido de la elaboración de quesos, ricota, manteca y/o caseína, que contiene componentes de alto valor nutricional propios de la leche”* (CAA, 2023). Este subproducto, caracterizado por su color amarillo verdoso y aspecto turbio (**Figura 1**), corresponde a la fracción líquida de la leche que no precipita durante la coagulación de la caseína en el proceso de fabricación de queso, obteniéndose tras la separación del coágulo (Terán *et al.*, 2010; Muset & Castells, 2017). Aunque puede derivar de diferentes tipos de leche, la bovina es su fuente más común (Yadav *et al.*, 2015).

El lactosuero contiene alrededor de un 94% de agua y un 6% de sólidos totales, que incluyen lactosa (4,5%), proteínas (0,8%), minerales (0,4%) y grasa (0,3%). Este subproducto conserva aproximadamente el 50% de los sólidos totales de la leche original, incluyendo el 25% de las proteínas, el 7% de la grasa, el 95% de la lactosa y el 50% de los minerales (Motta-Correa & Mosquera, 2015; Kilara & Vaghela, 2018). La **Figura 2** ilustra su composición aproximada, destacando su riqueza en nutrientes y su gran potencial para el desarrollo de productos de alto valor agregado. Esta composición puede variar dependiendo de factores como la estacionalidad de la leche, las prácticas de manejo de los animales (alimentación, sanidad y raza) y las condiciones del proceso de elaboración del queso. Entre estas condiciones se incluyen el tipo de tratamiento térmico aplicado a la leche, el uso de cloruro de calcio, los cultivos bacterianos empleados (mesófilos o termófilos), el tipo de coagulación (ácida, enzimática o mixta), el coagulante utilizado (microbiano, pepsina/quimosina, quimosina, entre otros) y los aditivos incorporados (Muset & Castells, 2017).

En función del método de fabricación, se distinguen dos tipos principales de suero: suero dulce y suero ácido. El **suero dulce**, generado como subproducto de quesos duros, semiduros y algunos quesos blandos, se obtiene mediante coagulación enzimática y presenta un pH entre 5,8 y 6,6. Por su parte, el **suero ácido**, con un pH que varía entre 4 y 5,2, se produce mediante coagulación mixta o láctica, con o sin la adición de ácidos orgánicos o minerales. En este caso, la fermentación de la lactosa en ácido láctico por cultivos bacterianos y el agregado de ácidos reducen el pH, lo que provoca la precipitación de la caseína (Muset & Castells, 2017; Zhao *et al.*, 2022). La principal diferencia entre estos dos tipos de lactosuero radica en su contenido mineral, el valor de acidez y las características de las fracciones proteicas presentes (Yadav *et al.*, 2015). El suero ácido presenta un mayor contenido mineral y acidez elevada, mientras que el dulce contiene una cantidad significativa de glicomacropéptido (GMP) y concentra entre 4 y 10 veces más aminoácidos libres (Muset & Castells, 2017; Zhao *et al.*, 2022). Cabe destacar que el suero dulce

es el tipo más comúnmente producido en la industria láctea (Yadav *et al.*, 2015). A continuación, se analizará el manejo del lactosuero desde una perspectiva global, nacional y regional.



Figura 1. Lactosuero generado durante la elaboración de queso en la Escuela Técnico Profesional N° 298 “Don Miguel Manfredi” (Franck, Santa Fe).

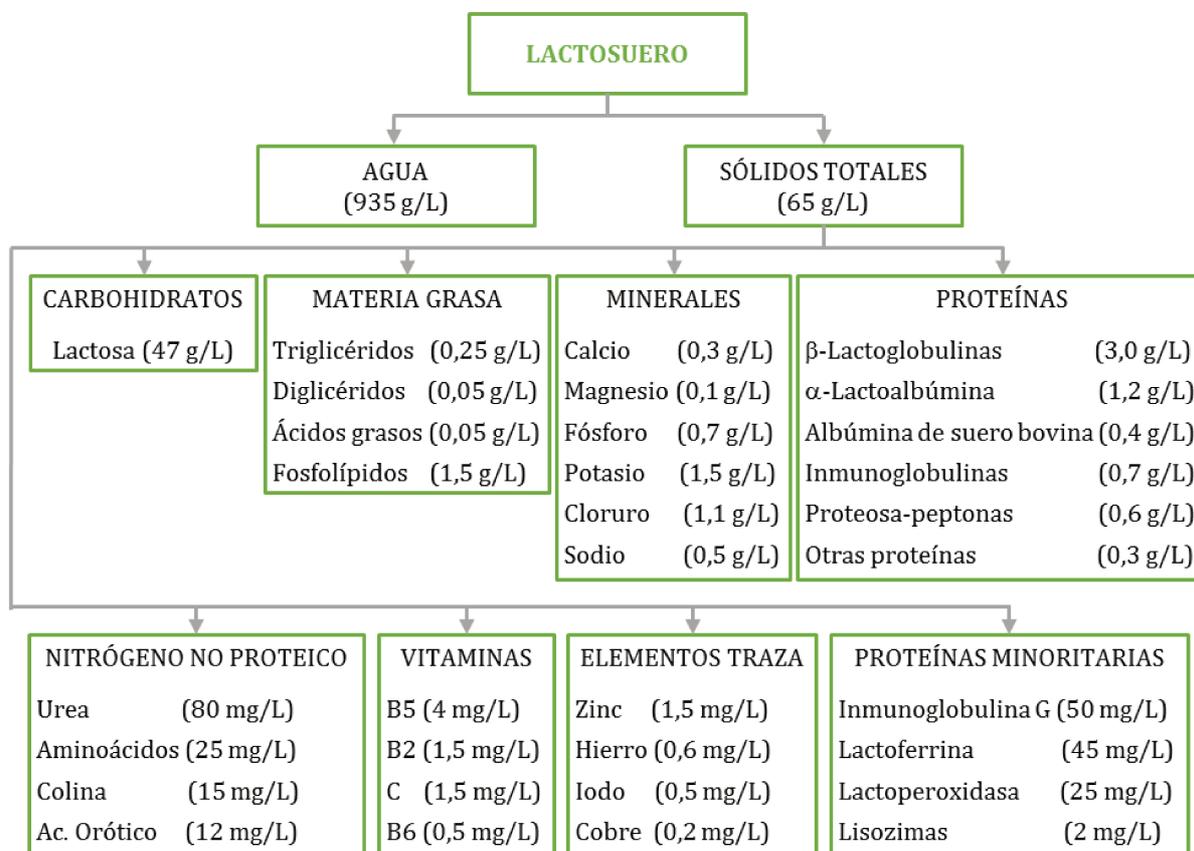


Figura 2. Composición aproximada de lactosuero de queso Gouda. Figura modificada de Muset & Castells (2017).

1.3. Aprovechamiento del lactosuero

A pesar de su alto valor nutricional, el lactosuero presenta limitaciones para su uso directo debido a su naturaleza perecedera y la elevada dilución de sus componentes. Para mejorar su aprovechamiento, se han implementado diversas tecnologías que permiten su transformación en productos de valor agregado, convirtiéndolo en una variedad de ingredientes alimentarios. Entre estas tecnologías, el calentamiento y secado, la ósmosis inversa y la desmineralización mediante resinas de intercambio iónico o electrodiálisis son métodos utilizados para concentrar y desmineralizar el lactosuero. Además, las tecnologías de separación por membrana, como ultrafiltración, microfiltración y diafiltración, se emplean para concentrar y aislar los componentes proteicos del suero (Brandelli *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2022). En particular, la ultrafiltración es ampliamente utilizada para la producción de concentrados de proteínas de suero (WPC) a partir de suero líquido. Este proceso permite retener y concentrar las proteínas y la grasa residual, mientras elimina la lactosa, los minerales y el agua a través de la corriente de permeado (Mestawet *et al.*, 2024).

Entre las alternativas de valorización del lactosuero como ingrediente alimentario se incluyen productos como suero en polvo no higroscópico (NHWP) y *fat filled* (FFWP), suero desmineralizado en diferentes grados (D40, D90), concentrados de proteínas de suero (WPC-35, WPC-60, WPC-80), permeado en polvo, lactosa de grado alimenticio, aislados de proteínas (WPI) e hidrolizados de proteínas (WPH) (Talamoni *et al.*, 2023). Algunos productos derivados del suero y sus composiciones aproximadas se presentan en la **Tabla 1**. Cabe señalar que, a medida que se avanza en la cadena de valor, los rendimientos disminuyen, mientras que los costos, la complejidad tecnológica y el valor de los productos aumentan significativamente (Muset & Castells, 2017).

Tabla 1. Composición aproximada de productos derivados del lactosuero.

| Producto | Proteína (%) | Lactosa (%) | Grasa (%) | Ceniza (%) | Humedad (%) |
|--------------------------------|--------------|-------------|-----------|------------|-------------|
| Suero dulce en polvo | 11,0–14,5 | 63,0–75,0 | 1,0–1,5 | 8,2–8,8 | 3,5–5,0 |
| Suero ácido en polvo | 11,0–13,5 | 61,0–70,0 | 0,5–1,5 | 9,8–12,3 | 3,5–5,0 |
| Suero en polvo desmineralizado | 11,0–15,0 | 70,0–80,0 | 0,5–1,8 | 1,0–7,0 | 3,0–4,0 |
| WPC-34 | 34,0–36,0 | 48,0–52,0 | 3,0–4,5 | 6,5–8,0 | 3,0–4,5 |
| WPC-80 | 80,0–82,0 | 4,0–8,0 | 4,0–8,0 | 3,0–4,0 | 3,5–4,5 |
| WPI | 90,0–92,0 | 0,5–1,0 | 0,5–1,0 | 2,0–3,0 | 4,5 |

Tabla adaptada de Yadav *et al.* (2015).

En Argentina, la industrialización del lactosuero comenzó a desarrollarse hacia finales de la década del 90 y principios del 2000. Entre las empresas pioneras se encuentran Arla Foods Ingredients S.A., Lácteos La Cristina S.A., Remotti S.A., Mafralac S.R.L. y Milkaut. Actualmente, aunque existen aproximadamente 700 industrias lácteas en el país, solo unas 22 se dedican a la elaboración de ingredientes de suero en polvo, según datos del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) (Talamoni *et al.*, 2023). Alrededor del 10% del lactosuero producido en el país se exporta en forma de productos en polvo. Del 90% restante, entre un 33-35% se emplea en la obtención de lactosa y derivados proteicos, un 4-5% se transforma en suero en polvo, y alrededor del 60% se utiliza como alimento animal o es desechado como efluente (Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable *et al.*, 2019). En la provincia de Santa Fe, las aplicaciones del lactosuero incluyen la elaboración de productos lácteos como ricota, alimentación de ganado bovino y porcino, venta como materia prima a empresas procesadoras, tratamiento como efluente y producción de derivados de mayor valor agregado (Terán *et al.*, 2010).

Las grandes industrias lácteas, gracias a su capacidad de inversión, están mejor posicionadas para implementar tecnologías avanzadas de procesamiento y obtener productos de mayor valor agregado. En contraste, las pequeñas y medianas empresas queseras enfrentan limitaciones económicas y tecnológicas, lo que las lleva a optar por soluciones de bajo costo, como el uso agropecuario o el descarte como efluente (Muset & Castells, 2017). Aunque nuestro país ha avanzado en la valorización del lactosuero, aún es necesario seguir explorando nuevas estrategias y tecnologías para maximizar su potencial (Terán *et al.*, 2010). En este contexto, las proteínas del lactosuero se presentan como un componente clave para su valorización, gracias a sus destacadas propiedades nutricionales, funcionales y bioactivas, las cuales serán descriptas a continuación.

1.4. Las proteínas del lactosuero

La leche bovina contiene aproximadamente un 3% de proteínas, de las cuales el 80% son caseínas y el 20% proteínas del suero. Estas últimas permanecen en el sobrenadante tras la precipitación de las caseínas durante la fabricación de queso (Krunić *et al.*, 2018). Las proteínas del lactosuero (WP) comprenden una mezcla de proteínas individuales con propiedades específicas, entre las que se incluyen β -lactoglobulina (β -LG), α -lactoalbúmina (α -LA), inmunoglobulinas (Ig), albúmina sérica bovina (BSA), fracción proteosa-peptona (PP), glicomacropéptido (GMP), lactoferrina (Lf) y lactoperoxidasa (LPO). La **Tabla 2** resume la composición y las propiedades fisicoquímicas de las proteínas mencionadas.

Tabla 2. Composición y propiedades fisicoquímicas de las principales proteínas del suero lácteo.

| Proteína | Concentración (g/L) | PM (kDa) | pI | WP (%) | AA |
|--------------|---------------------|-----------|---------|--------|---------|
| β -LG | 3,0-4,0 | 18,4 | 5,2 | 50-55 | 162 |
| α -LA | 1,5 | 14,2 | 4,7-5,1 | 20-25 | 123 |
| Ig | 0,6-0,9 | 150-1.000 | 5,5-8,3 | 10-15 | |
| BSA | 0,3-0,6 | 69 | 4,7-4,9 | 5-10 | 582 |
| Lf | 0,05 | 78 | 8,0 | 1-2 | 700 |
| LPO | 0,006 | 89 | 9,6 | 0,5 | 612 |
| GMP | 1,2-1,5 | 8,6 | 4,0-4,8 | 10-15 | 102-169 |
| PP | 0,5 | 4-20 | | 20-25 | 136 |

PM: peso molecular; pI: punto isoeléctrico, AA: residuos de aminoácidos. Tabla adaptada de [Mehra et al. \(2021\)](#).

La **β -lactoglobulina** es la principal proteína del suero bovino, constituyendo entre el 50-55% del total de las WP ([Mehra et al., 2021](#)). Es una proteína globular, soluble en agua, que generalmente se presenta como dímero (36,9 kDa) en condiciones de pH de la leche y como monómero a $\text{pH} < 3$ y > 8 ([Kilara & Vaghela, 2018](#)). Se destaca por sus propiedades emulsionantes y gelificantes; al calentarse, puede formar geles entre 70°C y 75°C, y agregados entre 78°C y 82°C ([Yadav et al., 2015](#); [Tsermoula et al., 2021](#)). Nutricionalmente, es rica en leucina (aminoácido clave para el anabolismo muscular), y cisteína, precursora del antioxidante intracelular glutatión ([Krunic et al., 2018](#); [Tsermoula et al., 2021](#)). Además, su capacidad de unión a moléculas hidrofóbicas facilita la biodisponibilidad de vitaminas liposolubles y lípidos ([Yadav et al., 2015](#)). Los fragmentos de β -LG generados mediante hidrólisis han demostrado diversas bioactividades, incluyendo actividad opioide, antihipertensiva, antimicrobiana, entre otras ([Krunic et al., 2018](#)).

La **α -lactoalbúmina** constituye alrededor del 20-25% de las WP ([Mehra et al., 2021](#)). Es una metaloproteína que contiene dos iones de calcio, lo que favorece su correcto plegamiento y estabilidad estructural ([Yadav et al., 2015](#); [Tsermoula et al., 2021](#)). Se considera la más termoestable entre las WP debido a su capacidad de renaturalización tras la desnaturalización térmica. Contiene un 63,2% de aminoácidos esenciales, especialmente lisina, cisteína y triptófano, este último precursor de serotonina, asociada con la reducción del estrés y la depresión ([Tsermoula et al., 2021](#); [Mehra et al., 2021](#)). Además, α -LA exhibe propiedades inmunomoduladoras, antibacterianas y antitumorales ([Yadav et al., 2015](#)).

Las **inmunoglobulinas** representan entre el 10-15% del total de las WP. Estas proteínas globulares glicosiladas incluyen IgG, IgA e IgM, siendo las IgG las más abundantes (85-90%)

(Yadav *et al.*, 2015; Tsermoula *et al.*, 2021). Su función principal es aglutinar bacterias, neutralizar toxinas e inactivar virus (Yadav *et al.*, 2015).

La **albúmina sérica bovina** constituye entre el 5-10% de las WP y proviene del suero sanguíneo (Kilara & Vaghela, 2018). Posee capacidad para unirse a iones metálicos y ácidos grasos (C₁₆ y C₁₈) (Mehra *et al.*, 2021). Se desnaturaliza a 64°C, de manera similar a la α -LA (62°C), pero precipita más rápidamente debido a la naturaleza reversible de la α -LA (Yadav *et al.*, 2015).

El **glicomacropéptido** (GMP), también conocido como caseinomacropéptido (CMP) en su forma no glicosilada, se genera durante la coagulación enzimática de la leche por acción de la quimosina sobre la κ -caseína (Mehra *et al.*, 2021). Es termoestable y forma parte de la fracción proteosa-peptona (Yadav *et al.*, 2015). Carece de fenilalanina, haciéndolo adecuado para personas con fenilcetonuria. Exhibe propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y prebióticas, además de contribuir a la salud ósea y oral (Kronic *et al.*, 2018; Mehra *et al.*, 2021).

La **fracción proteosa-peptona** está compuesta por proteínas que permanecen solubles en condiciones ácidas (pH 4,7) y de alta temperatura (95°C durante 20 min) (Yadav *et al.*, 2015). Entre sus componentes principales, la PP3, es una glicoproteína fosforilada con propiedades emulsionantes y antimicrobianas (Kilara & Vaghela, 2018; Mehra *et al.*, 2021).

La **lactoferrina** es una proteína minoritaria entre las WP, caracterizada por su termoestabilidad y resistencia a los ácidos (Yadav *et al.*, 2015). Se destaca por su capacidad de unión al hierro, contribuyendo a su disponibilidad. Posee propiedades antimicrobianas, antioxidantes, inmunomoduladoras y anticancerígenas. La hidrólisis de Lf genera lactoferrinas, péptidos con mayor actividad bacteriostática que la proteína nativa. Además, la **lactoperoxidasa** es una enzima clave en el sistema inmune de los mamíferos, proporcionando protección contra microorganismos invasores. Esta proteína minoritaria es conocida por sus propiedades antibacterianas (Tsermoula *et al.*, 2021). Las características únicas de cada una de las proteínas previamente mencionadas, destacan la importancia nutricional, funcional y bioactiva de las WP, posicionándolas como ingredientes clave para aplicaciones alimentarias y nutracéuticos.

1.4.1. Importancia de las proteínas del lactosuero

Desde el punto de vista **nutricional**, las WP son una fuente rica en aminoácidos esenciales y poseen un alto valor biológico gracias a su contenido de leucina, triptófano, lisina y aminoácidos azufrados. El perfil equilibrado de aminoácidos esenciales de las WP les confiere un valor nutricional comparable al de las proteínas del huevo (**Tabla 3**), posicionándolas como una fuente proteica de alta calidad (Parra Huertas, 2009). En comparación con otras proteínas, las WP se

destacan por su alto contenido de cisteína, un aminoácido clave que contribuye a aumentar los niveles de glutatión, antioxidante esencial y mediador de la función inmunológica y hepática. Además, presentan altas concentraciones de aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina), fundamentales para el mantenimiento de los tejidos y la nutrición muscular (Boland, 2011; Singh & Geetanjali, 2016; Zhao *et al.*, 2022). Según la puntuación de aminoácidos corregida por digestibilidad proteica (PDCAAS), con un valor máximo de 1, las WP tienen la mayor calidad nutricional (Dullius *et al.*, 2018). Su estructura compacta y esférica se disuelve fácilmente en condiciones ácidas, formando pequeños agregados solubles durante la digestión gástrica que permiten un rápido vaciamiento gástrico e hidrólisis intestinal (Zhao *et al.*, 2022). Además, las WP cuentan con el estatus GRAS (*Generally Recognized as Safe*) otorgado por la FDA (*Food and Drug Administration*) para su uso en alimentos (de Castro *et al.*, 2017).

Tabla 3. Composición de aminoácidos esenciales (g/100 g de proteína).

| Aminoácido | Lactosuero | Huevo |
|--------------|------------|-------|
| Treonina | 6,2 | 4,9 |
| Cisteína | 1,0 | 2,8 |
| Metionina | 2,0 | 3,4 |
| Valina | 6,0 | 6,4 |
| Leucina | 9,5 | 8,5 |
| Isoleucina | 5,9 | 5,2 |
| Fenilalanina | 3,6 | 5,2 |
| Lisina | 9,0 | 6,2 |
| Histidina | 1,8 | 2,6 |
| Triptófano | 1,5 | 1,6 |

Tabla adaptada de Parra Huertas (2009).

Desde una perspectiva **funcional**, las WP se caracterizan por su alta solubilidad, capacidad para formar geles, retener agua y estabilizar interfaces en espumas y emulsiones, atributos clave para su uso en alimentos (Boland, 2011; Zhao *et al.*, 2022). Por ejemplo, su capacidad gelificante resulta particularmente útil en productos cárnicos, lácteos y de panadería, donde contribuyen a lograr la textura deseada (Bacenetti *et al.*, 2018). El creciente interés en las WP debido a sus destacadas propiedades nutricionales y funcionales, ha impulsado la investigación en dirección a ampliar su uso como ingrediente alimentario (Jeewanthi *et al.*, 2015). Como resultado, las WP se han incorporado en alimentos como helados, yogures, fideos y tortas con el objetivo de sustituir

grasas, incrementar el contenido proteico y reemplazar parcialmente las harinas (Balivo *et al.*, 2023). Derivados como WPC-80 y WPI se emplean para mejorar la calidad de horneado, optimizar el rendimiento en quesos, estabilizar yogures y actuar como texturizantes en salsas y untables, entre otras aplicaciones (Yadav *et al.*, 2015). La funcionalidad de las WP puede potenciarse mediante procesos químicos, físicos y enzimáticos. Entre estos, la hidrólisis enzimática tiene gran valor debido a su capacidad para mejorar tanto las propiedades funcionales como las bioactivas, ampliando significativamente el potencial de las WP como ingredientes multifuncionales en la industria alimentaria (Jeewanthi *et al.*, 2015).

Desde un enfoque de las **propiedades bioactivas**, las WP son una fuente destacada de péptidos bioactivos, definidos como fragmentos específicos de proteínas que ejercen efectos positivos en diversas funciones o condiciones del cuerpo, pudiendo consecuentemente influir en la salud (Mann *et al.*, 2019). Estos péptidos han demostrado una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antihipertensivas, antidiabéticas, inmunomoduladoras, anticancerígenas, opioides, hipocolesterolémicas y capacidad quelante de cationes (Madureira *et al.*, 2010; Brandelli *et al.*, 2015; Patel, 2015; Zhao *et al.*, 2015). Aunque permanecen inactivos en su estado proteico nativo, su bioactividad aumenta significativamente al liberarse, exponiendo las regiones responsables de sus acciones biológicas (de Castro *et al.*, 2017; Mann *et al.*, 2019). Como se ilustra en la **Figura 3**, esta liberación puede lograrse mediante la hidrólisis enzimática en el tracto gastrointestinal, la fermentación con cultivos iniciadores proteolíticos o la proteólisis con enzimas derivadas de microorganismos o plantas (Mann *et al.*, 2019). Por ello, la hidrólisis enzimática con proteasas comerciales se presenta como una herramienta de gran valor para generar hidrolizados con alto potencial como ingredientes en alimentos funcionales, cuya demanda está en crecimiento debido a la mayor consciencia de los consumidores sobre el impacto de la alimentación en la salud y el bienestar (Özer & Kirmaci, 2010; Zhao *et al.*, 2022).

No obstante, un desafío importante en la aplicación alimentaria de las WP es su potencial alergenicidad, particularmente asociada a α -LA y β -LG, que pueden inducir reacciones adversas en consumidores predispuestos (Patel, 2015; Zhao *et al.*, 2022). Afortunadamente, la hidrólisis enzimática ofrece una solución eficaz al escindir los epítopos alérgicos y reducir significativamente su alergenicidad (Zheng *et al.*, 2008). Así, la modificación de las WP mediante este proceso representa una estrategia integral para mejorar la funcionalidad, incrementar la bioactividad y disminuir la alergenicidad, contribuyendo además al desarrollo de productos de mayor valor agregado derivados del lactosuero. Por lo tanto, en los apartados siguientes, se analizará la hidrólisis de las proteínas, con especial énfasis en el proceso de hidrólisis enzimática.



Figura 3. Generación de péptidos bioactivos a partir de proteínas de suero. Figura modificada de [Mann et al. \(2019\)](#).

1.5. Hidrólisis de proteínas

La hidrólisis de proteínas se refiere a la ruptura de los enlaces peptídicos, lo que resulta en la formación de péptidos más pequeños y aminoácidos libres. Este proceso puede llevarse a cabo mediante métodos químicos o biológicos. Los métodos químicos, que emplean ácidos o bases, son menos usados debido a sus efectos adversos sobre la calidad nutricional del producto final. Al aplicarlos, pueden destruir L-aminoácidos, formar D-aminoácidos y generar compuestos tóxicos como la lisinoalanina ([Vioque & Millán, 2005](#)). Adicionalmente, la neutralización de ácidos o bases también resulta en la adición de sales al producto final ([Guadix et al., 2000](#)).

Por otro lado, los métodos biológicos utilizan proteasas, enzimas que rompen los enlaces peptídicos, preferentemente bajo condiciones controladas de pH y temperatura ([Vioque & Millán, 2005](#)). La hidrólisis enzimática es el método preferido debido a su alta selectividad, condiciones suaves y capacidad para preservar la calidad nutricional del producto ([Guadix et al., 2000](#)). Las enzimas actúan de manera altamente específica sobre los sustratos, reduciendo la formación de reacciones secundarias y subproductos no deseados ([Chew et al., 2019](#)). Además, las reacciones enzimáticas se realizan bajo condiciones suaves de temperatura y pH, lo que disminuye los costos operativos y minimiza la formación de compuestos indeseables ([Guadix et al., 2000](#); [Chew et al., 2019](#)). A diferencia de la hidrólisis alcalina, que destruye arginina y cisteína, o la hidrólisis ácida, que elimina triptófano y desamina serina y treonina, la hidrólisis enzimática preserva el valor nutricional del producto al evitar la degradación de aminoácidos esenciales ([Guadix et al., 2000](#)). Además, debido a su naturaleza proteica, las enzimas pueden inactivarse fácilmente después de la reacción mediante la aplicación de calor o un cambio de pH ([Chew et al., 2019](#)).

Durante la hidrólisis enzimática de proteínas, las proteasas actúan sobre los enlaces peptídicos, rompiéndolos y liberando los grupos amino y carboxilo, los cuales pueden estar parcialmente ionizados, dependiendo del pH del proceso (**Figura 4**). Se estima que, a 25°C, los valores de pK para los grupos -COOH y +H₃N- en los polipéptidos se encuentran en los rangos de 3,1-3,6 y 7,5-7,8, respectivamente ([Guadix et al., 2000](#)). En condiciones ácidas, los grupos amino están completamente protonados, mientras que los grupos carboxilo están solo parcialmente desprotonados. Esto provoca una captación neta de protones por cada enlace peptídico roto, lo que resulta en un incremento del pH. Por el contrario, a pH neutro o alcalino, la hidrólisis conlleva una disminución del pH, dado que los grupos carboxilo están completamente desprotonados y los grupos amino están parcialmente protonados ([Benítez et al., 2008](#)).

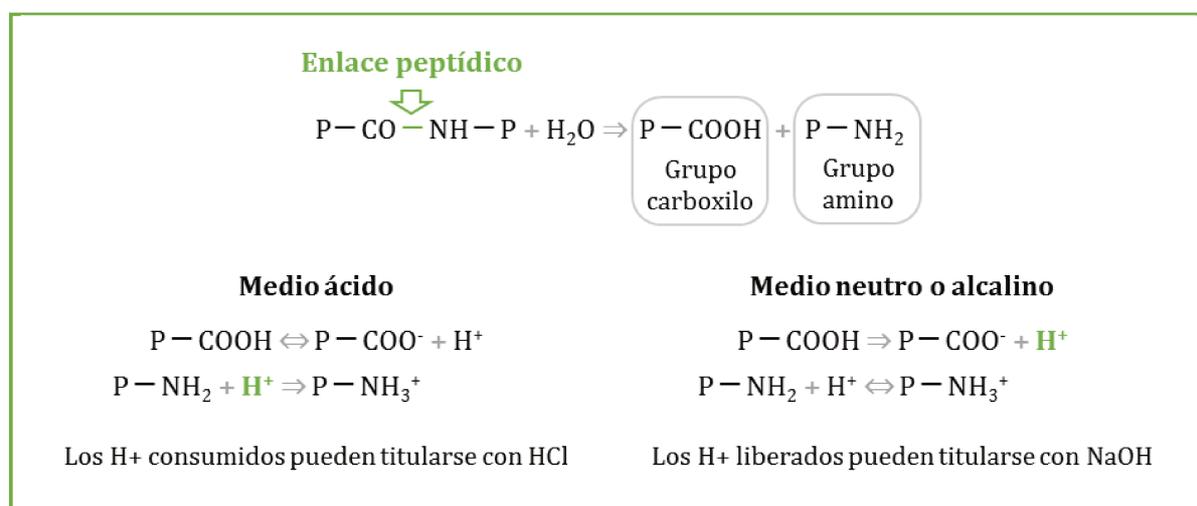


Figura 4. Representación de la hidrólisis de proteínas y equilibrios de grupos amino y carboxilos liberados en función del pH de reacción. Figura modificada de [Mat et al. \(2018\)](#).

Las reacciones enzimáticas deben realizarse a la temperatura y pH óptimos para aprovechar al máximo la actividad proteolítica ([Aluko, 2019](#)). Por lo tanto, para minimizar las fluctuaciones del pH y asegurar tasas óptimas de reacción, se recomienda realizar el proceso en un sistema tampón o utilizar el método *pH-stat* ([Benítez et al., 2008](#)). El método *pH-stat* ajusta el pH del sistema en tiempo real mediante la adición controlada de un ácido o una base, dependiendo del pH inicial, para compensar el consumo o la liberación de protones ([Mat et al., 2018](#)). Esta adición usualmente tiene una mayor velocidad durante los primeros 30 min de reacción, cuando la tasa de proteólisis es alta y se liberan (o consumen) grandes cantidades de H⁺ en un corto período de tiempo. A medida que avanza la hidrólisis, las fluctuaciones del pH se vuelven menos frecuentes, lo que permite tener intervalos más largos antes de realizar un ajuste del pH ([Aluko, 2019](#)). Este método es ampliamente utilizado para monitorear las reacciones de hidrólisis, ya que la velocidad

de titulación es proporcional a la velocidad de reacción, y la cantidad de ácido o base añadida puede proporcionar una medida del grado de hidrólisis. Así, el método *pH-stat* constituye una herramienta simple, rápida, reproducible y no destructiva para investigar la cinética de la hidrólisis enzimática de proteínas (Mat *et al.*, 2018).

1.5.1. Proceso de hidrólisis enzimática

El proceso de hidrólisis enzimática se realiza comúnmente de forma discontinua, utilizando recipientes de reacción conocidos como reactores o digestores. Estos recipientes están equipados con sistemas de agitación y mecanismos para mantener constantes tanto la temperatura como el pH durante todo el proceso, dado que las proteasas requieren de condiciones óptimas para su actividad (Mahmoud & Cordle, 2000). En la **Figura 5** se muestra un esquema general de las etapas del proceso de hidrólisis.

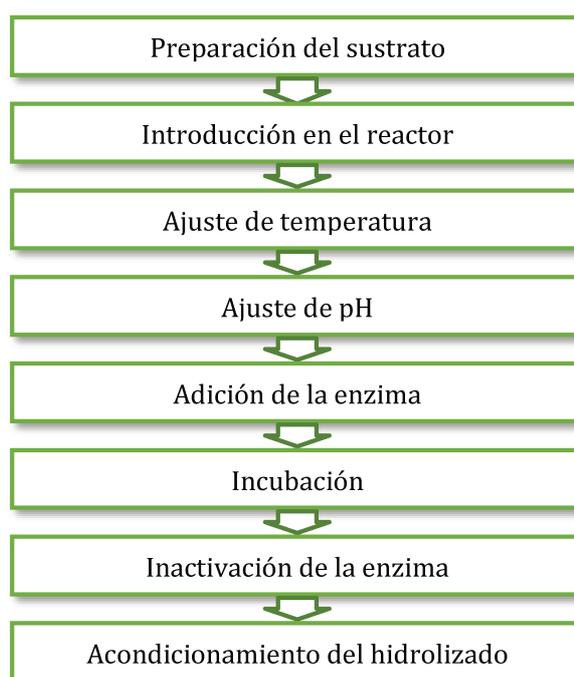


Figura 5. Etapas del proceso de hidrólisis con una sola enzima.

El sustrato proteico se prepara añadiendo agua y ajustando posteriormente el pH al valor deseado y a la temperatura de reacción. Alternativamente, se puede dispersar en un tampón que mantenga el pH requerido. El uso de soluciones reguladoras resulta beneficioso para mantener un valor de pH estable durante la proteólisis, reduciendo la necesidad de ajustes constantes. Este método es particularmente útil cuando no es necesario estimar el grado de hidrólisis mediante la

cantidad de ácido o base añadida. Sin embargo, el uso de tampones puede ser menos efectivo para determinar el cese de la proteólisis, ya que los cambios en el pH durante la reacción son mínimos. En contraste, el uso de agua permite el seguimiento del proceso de reacción mediante el método *pH-stat* y facilita la determinación del punto final de la hidrólisis, dado que las fluctuaciones de pH cesan cuando se completa la reacción enzimática (Aluko, 2018).

El contenido proteico del sustrato empleado influye en la calidad del hidrolizado obtenido. Se prefieren materiales proteicos de alta pureza, como concentrados y aislados, que resultan en productos con niveles mínimos de compuestos no peptídicos solubles (Aluko, 2019). Respecto a la concentración del sustrato empleada, la selección de la misma responde a consideraciones tecnológicas y económicas. Una alta concentración puede resultar en una suspensión viscosa con material no disuelto, lo que limita la difusión efectiva de la enzima y genera además espuma excesiva. Por otro lado, una concentración demasiado baja puede llevar a un rendimiento ineficiente. En la mayoría de los procesos de hidrólisis de proteínas, la concentración del sustrato varía entre 10% y 14% en base de proteínas (Mahmoud & Cordle, 2000).

La solución o suspensión acuosa del material proteico se introduce en el reactor y se ajusta a las condiciones óptimas de temperatura y pH para la proteasa (Mahmoud & Cordle, 2000). Dado que el pH de una solución está relacionado con la temperatura, el sustrato debe ajustarse a la temperatura óptima antes de ajustar el pH (Aluko, 2018). Luego, se añade la enzima, dando inicio a la hidrólisis. La mezcla se mantiene bajo estas condiciones hasta alcanzar el grado deseado de hidrólisis (Mahmoud & Cordle, 2000). Cuando se alcanza este punto, se procede a detener la reacción inactivando la enzima mediante un aumento de la temperatura, reducción del pH, o una combinación de ambos métodos. La inactivación térmica se logra llevando la mezcla de reacción a una temperatura que desnatura la proteasa y detiene su actividad enzimática, generalmente por encima de 80°C durante 5 a 20 min. Esta inactivación térmica puede realizarse con o sin ajuste previo del pH (Aluko, 2018). Una vez finalizada la hidrólisis enzimática, el producto obtenido puede enfriarse a temperatura ambiente o con ayuda de un baño maría inverso y luego liofilizarse para obtener un hidrolizado proteico en polvo (Aluko, 2019).

La proteólisis con una sola enzima es la técnica más comúnmente utilizada en la producción de hidrolizados de proteínas alimentarias (Aluko, 2018). Sin embargo, la hidrólisis de proteínas también puede llevarse a cabo utilizando más de una proteasa, ya sea de manera simultánea o secuencial. En la hidrólisis simultánea, es esencial que las enzimas operen bajo condiciones óptimas similares para asegurar que cada proteasa funcione de manera efectiva dentro del cóctel enzimático. Cuando las proteasas requieren condiciones óptimas diferentes, como la pepsina y la pancreatina, se deben aplicar en una secuencia predefinida. Por ejemplo, se inicia la digestión con pepsina a pH 2-3 durante un tiempo determinado; luego, se ajusta la mezcla a pH 7-8 y se añade

pancreatina para continuar la digestión. El uso secuencial de pepsina y pancreatina (o tripsina) se emplea usualmente en estudios *in vitro* de digestión gastrointestinal. La pepsina simula la digestión en el estómago, mientras que la pancreatina o tripsina simulan la digestión intestinal (Aluko, 2019).

La combinación de proteasas con diferentes especificidades y mecanismos de acción puede ser una herramienta valiosa para mejorar las propiedades funcionales y biológicas de los hidrolizados de proteínas. Esta estrategia permite obtener péptidos de diferentes tamaños y la exposición de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos (Justus *et al.*, 2019). En algunos casos, la hidrólisis secuencial con dos proteasas se utiliza para lograr una ruptura más completa de la proteína, aprovechando la especificidad particular de las enzimas utilizadas (Chew *et al.*, 2019).

1.5.2. Proteasas: enzimas clave en la hidrólisis de proteínas

Según la *Enzyme Commission* (EC), las proteasas (también conocidas como peptidasas), pertenecen al grupo 3 de las hidrolasas y al subgrupo 4, especializado en la hidrólisis de enlaces peptídicos (dos Santos Aguilar & Sato, 2018). Estas enzimas se pueden clasificar de diversas maneras. Según su origen, las proteasas pueden ser animales, vegetales o microbianas (bacterianas o fúngicas). En función del rango de pH en el que exhiben su actividad óptima, se dividen en proteasas ácidas, neutras o alcalinas (Mahmoud & Cordle, 2000). En cuanto a su modo de acción catalítica, las proteasas se clasifican en endopeptidasas y exopeptidasas. Las endopeptidasas actúan en el interior de las cadenas polipeptídicas, mientras que las exopeptidasas actúan en los extremos de estas cadenas (Guadix *et al.*, 2000). La naturaleza del sitio catalítico de las proteasas difiere de acuerdo a los aminoácidos y otros ligandos involucrados en la formación del complejo enzima-sustrato, resultando en diferentes mecanismos de reacción (Benítez *et al.*, 2008). Dentro de las exopeptidasas, se encuentran las carboxipeptidasas, que escinden aminoácidos en el extremo C-terminal de las cadenas polipeptídicas, y las aminopeptidasas, que lo hacen en el extremo N-terminal. Por otro lado, las endopeptidasas se subdividen en serina (EC 3.4.21), cisteína (EC 3.4.22) y aspartato (EC 3.4.23) proteasas, según el aminoácido que participa en su acción catalítica. Además, podemos mencionar a las metaloproteasas (EC 3.4.24), cuya actividad es promovida por cationes metálicos, siendo el zinc divalente el más frecuente (Benítez *et al.*, 2008; Chew *et al.*, 2019).

Las proteasas tienen una amplia aplicación, destacándose en las industrias farmacéutica, de limpieza y alimentaria. Recientemente, han ganado atención en el área de nutracéuticos, donde se utilizan para la liberación de péptidos bioactivos (Tacias-Pascacio *et al.*, 2020). En la industria alimentaria, las primeras enzimas proteolíticas empleadas fueron las proteasas pancreáticas de

origen animal. Sin embargo, las proteasas bacterianas y fúngicas han adquirido una relevancia creciente debido a la facilidad de manejo de estos microorganismos y a sus altos rendimientos de producción (Guadix *et al.*, 2000; Vioque & Millán, 2005; Benítez *et al.*, 2008). Las mismas se comercializan principalmente en forma de preparaciones enzimáticas, ya sea como mezclas líquidas o en pellets secos (Guadix *et al.*, 2000; Benítez *et al.*, 2008; Chew *et al.*, 2019). En la actualidad, existe una amplia gama de enzimas seguras, consideradas de grado alimenticio (Jeewanthi *et al.*, 2015). Alcalase®, Flavourzyme®, Neutrase® y Protamex® son ejemplos de proteasas microbianas utilizadas en la obtención de péptidos bioactivos. La selección adecuada de la enzima es crucial, ya que determina el tipo y la eficacia de los péptidos liberados del sustrato proteico, influyendo en la actividad y calidad final de los hidrolizados (Aluko, 2019).

Alcalase® (ALC), es un preparado enzimático comercial de origen bacteriano, producido a partir de cepas de *Bacillus licheniformis*, compuesto por una combinación de diversas proteasas (Osman *et al.*, 2016). Esta serina endopeptidasa, exhibe su máxima actividad en un rango de pH alcalino (6-10) (Mahmoud & Cordle, 2000). Su baja selectividad y especificidad permiten que ALC sea adecuada para una variedad de sustratos proteicos, pudiendo conseguir un alto grado de hidrólisis, ya sea aplicada individualmente o en combinación con otras proteasas (Tacias-Pascacio *et al.*, 2020). Al hidrolizar las regiones internas de las cadenas polipeptídicas, esta enzima libera péptidos de bajo peso molecular (Justus *et al.*, 2019). ALC se caracteriza por su bajo costo y amplia disponibilidad comercial (Zheng *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado que es altamente eficiente en la liberación de péptidos bioactivos a partir de diversas fuentes proteicas, lo que la convierte en una de las proteasas más utilizadas en este campo (Tacias-Pascacio *et al.*, 2020). En particular, la hidrólisis de las WP con ALC puede reducir eficazmente la antigenicidad asociada a α -LA y β -LG (Zheng *et al.*, 2008).

Flavourzyme® (FLA) es una mezcla de endo- y exoproteasas fúngicas derivadas de *Aspergillus oryzae* (Chiang *et al.*, 2018). Es un complejo de proteasas que, según se ha reportado, opera bajo condiciones neutras o ligeramente ácidas (Chew *et al.*, 2019). Consiste en una mezcla de aminopeptidasas, dipeptidil peptidasas y endopeptidasas. Por su actividad exopeptidasa, FLA se caracteriza por la producción de péptidos de alto peso molecular y mayor contenido de aminoácidos libres (Justus *et al.*, 2019). FLA se utiliza en la hidrólisis de proteínas en diversas aplicaciones industriales y de investigación. Varios estudios han documentado el uso de FLA para la hidrólisis de proteínas vegetales y animales, destacando su capacidad para generar péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina a partir de germen de maíz, proteínas de lupino y plasma bovino, entre otros (Merz *et al.*, 2015). Además, esta enzima se emplea para reducir el sabor amargo de los hidrolizados, gracias a su actividad exoproteasa que actúa en los

extremos de los residuos de aminoácidos hidrofóbicos, estructuras químicas habitualmente asociadas al desarrollo del mismo (Chiang *et al.*, 2018).

Los preparados enzimáticos FLA y ALC se han utilizado tanto de manera individual como en combinación para obtener hidrolizados a partir de diversas matrices proteicas, como hongos comestibles, okara y garbanzos (Kimatu *et al.*, 2017; Justus *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2020). En cuanto a la hidrólisis de proteínas de suero lácteo, ambas proteasas han sido ampliamente utilizadas por separado para producir péptidos con propiedades antioxidantes (Dryáková *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; de Castro & Sato, 2014; Mann *et al.*, 2015; da Rosa *et al.*, 2018) y antihipertensivas (da Costa *et al.*, 2007; Morais *et al.*, 2014; Jeewanthi *et al.*, 2017). Sin embargo, son escasos los estudios que abordan la combinación de estas enzimas en la hidrólisis de WP, lo que destaca la importancia de profundizar las investigaciones en esta dirección.

1.6. Caracterización de hidrolizados de proteínas

El grado de hidrólisis (DH), es una característica clave de los hidrolizados proteicos, que determina en gran medida sus propiedades bioactivas y funcionales y, por lo tanto, sus aplicaciones potenciales. El DH se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original (Vioque & Millán, 2005; Benítez *et al.*, 2008). Este parámetro es fundamental para controlar el proceso de hidrólisis y se utiliza comúnmente para comparar diferentes hidrolizados proteicos (Mahmoud & Cordle, 2000). Un DH más alto indica una mayor degradación de proteínas en péptidos o aminoácidos (Chew *et al.*, 2019). El DH final de un hidrolizado depende de varios factores, entre ellos la concentración del sustrato, la relación enzima/sustrato (E/S), la presencia de fenómenos inhibitorios, de autólisis e inactivación enzimática, el tiempo de incubación, y las condiciones fisicoquímicas como el pH y la temperatura. Además, la naturaleza de la enzima utilizada tiene un papel crucial, ya que cada una de ellas posee una actividad específica y un tipo de acción particular, que determina el perfil de péptidos producidos y, en consecuencia, sus propiedades (Vioque & Millán, 2005; Benítez *et al.*, 2008).

Los cambios que ocurren durante la hidrólisis enzimática afectan de manera significativa las propiedades de los hidrolizados, entre los cuales se incluyen: (1) un incremento en los grupos ionizables (NH_3^+ , COO^-) lo cual conlleva a un incremento en la hidrofiliidad y en la carga neta; (2) una reducción en el tamaño molecular de las cadenas polipeptídicas, lo cual resulta en una disminución notable de la antigenicidad; y (3) una alteración en la estructura molecular que expone el interior hidrofóbico previamente oculto al entorno acuoso (Mahmoud & Cordle, 2000). Los cambios mencionados se reflejan en las características de los hidrolizados obtenidos. Desde

el punto de vista nutricional, la hidrólisis mejora la digestibilidad y reduce la alergenicidad (Benítez *et al.*, 2008). Además, los aminoácidos proporcionados por los hidrolizados son rápida y completamente absorbidos a nivel digestivo en comparación con la proteína intacta sin hidrolizar (Parra Huertas, 2009). En cuanto a las propiedades funcionales, los hidrolizados suelen presentar una alta solubilidad en un amplio rango de pH, lo cual es beneficioso en muchas aplicaciones alimentarias y también influye en otras propiedades adicionales como la capacidad emulsionante y espumante (Chen *et al.*, 2012). Finalmente, la hidrólisis facilita la liberación de péptidos bioactivos que, al encontrarse inactivos en la proteína intacta, incrementan el potencial bioactivo del hidrolizado (Justus *et al.*, 2019).

El tamaño de los péptidos obtenidos tiene una influencia muy marcada en las propiedades de los hidrolizados. Generalmente, una hidrólisis proteica limitada ($DH < 10\%$) produce hidrolizados con mejores propiedades funcionales, mientras que una hidrólisis extensa puede tener efectos negativos. Diversos estudios sugieren que existe un tamaño molecular o longitud de la cadena óptimos para que los péptidos proporcionen buenas propiedades funcionales (Chen *et al.*, 2012). Sin embargo, en ciertos casos, una hidrólisis extensa ($DH > 10\%$) es necesaria para obtener péptidos bioactivos con aplicaciones médicas y dietéticas. No obstante, una hidrólisis excesiva puede degradar estos péptidos, resultando en la pérdida de sus propiedades bioactivas. Este fenómeno ha sido observado en estudios donde las actividades biológicas de los hidrolizados se perdieron o disminuyeron sustancialmente al superar un nivel óptimo de DH (Agyei *et al.*, 2016).

Dado que las propiedades de los hidrolizados enzimáticos están influenciadas por múltiples factores relacionados con el proceso de hidrólisis, es esencial llevar a cabo una caracterización exhaustiva de los mismos a fin de ser considerados como posibles ingredientes alimentarios. En cuanto a la evaluación de las propiedades bioactivas, los estudios *in vivo* y los ensayos clínicos son fundamentales para confirmar los efectos fisiológicos de los péptidos obtenidos. No obstante, los estudios *in vitro*, que se basan en mecanismos biológicos, representan una alternativa temprana y sumamente útil para evaluar la funcionalidad de los hidrolizados, y en general, constituyen el primer paso en el análisis del potencial bioactivo de estos compuestos (Segura-Campos *et al.*, 2010).

1.7. Hidrolizados enzimáticos como ingredientes funcionales

Los hidrolizados de proteínas pueden considerarse ingredientes funcionales si demuestran beneficios significativos para la salud más allá de sus efectos nutricionales, contribuyendo a mejorar una o más funciones del organismo o a reducir el riesgo de enfermedades (González-García *et al.*, 2014). Más aún, es crucial considerar tanto la matriz alimentaria en la que se

incorporan como las condiciones de procesamiento, incluyendo el almacenamiento. Así, los péptidos bioactivos deben mantenerse estables en las matrices alimentarias para ejercer sus efectos biológicos y deben resistir las condiciones de procesamiento y almacenamiento durante su producción (Ashaolu *et al.*, 2023).

Los péptidos bioactivos son altamente reactivos debido a sus grupos nucleofílicos, lo que los hace susceptibles a cambios estructurales e interacciones con la matriz alimentaria. Estas interacciones pueden afectar su bioaccesibilidad y biodisponibilidad, así como alterar sus propiedades biológicas. Además, las interacciones entre los péptidos y la matriz pueden generar nuevos compuestos, que podrían tener potencial bioactivo o incluso aportar características indeseables (Udenigwe & Fogliano, 2017). Aunque existen numerosos estudios de actividad biológica ya sea *in vitro*, en modelos animales y en humanos, hay escasa información sobre la estabilidad y bioactividad de estos péptidos cuando se incorporan en matrices alimentarias, así como la influencia que poseen los efectos del procesamiento y el almacenamiento sobre la bioactividad observada (Ashaolu *et al.*, 2023).

El tratamiento térmico es un proceso común en la industria alimentaria, destinado a reducir o destruir la actividad microbiana y modificar la estructura de los alimentos mediante la reducción del contenido de agua. Este proceso puede inducir cambios conformacionales, como desnaturalización o agregación, dependiendo de la matriz alimentaria y las condiciones térmicas aplicadas (temperatura y tiempo). Dichos cambios pueden destruir o modificar algunos aminoácidos, además de favorecer reacciones no enzimáticas entre componentes, e incluso mejorar las interacciones moleculares que afectan la seguridad y biodisponibilidad de los nutrientes de la matriz. El pH es otra variable importante a considerar en las matrices alimentarias que contienen péptidos bioactivos, ya que influye en la carga neta de los mismos, las interacciones moleculares, la estructura y la capacidad de inhibir las enzimas, afectando así las actividades biológicas (Ashaolu *et al.*, 2023). En este contexto, resulta interesante evaluar cómo afectan las propiedades de los hidrolizados la aplicación de tratamientos térmicos y/o las condiciones de pH del medio en el cual se encuentran (o se pretende que sean incorporados).

Una limitación significativa en el uso de hidrolizados en alimentos funcionales es la posibilidad que se desarrollen sabores desagradables. La hidrólisis de proteínas puede liberar péptidos asociados con la aparición de sabor amargo según la fuente de proteína, la especificidad de la enzima, y la presencia y posición de aminoácidos hidrofóbicos en los péptidos del hidrolizado (Benítez *et al.*, 2008). Además, la adición de NaOH durante el proceso de obtención conduce a una acumulación de cenizas en los hidrolizados, lo que también contribuye a la formación de sabores desagradables (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011). En particular, los hidrolizados de proteínas del suero lácteo han sido asociados con el desarrollo de sabores no deseados como amargo, cocido,

malteado, entre otros. Por lo tanto, minimizar o enmascarar estos sabores no deseados al incorporar WPHs en productos alimentarios resulta de suma importancia ya que, de lo contrario, podría disminuir la aceptación del producto e incluso provocar su rechazo por parte de los consumidores (Boland, 2011). En este sentido, una alternativa que ha demostrado ser eficaz para reducir el amargor de los hidrolizados es el tratamiento con exopeptidasas, ya que facilita la eliminación de aminoácidos hidrófobos de los extremos de la cadena polipeptídica, lo que puede mejorar el perfil sensorial del hidrolizado. Características especialmente significativas de un alimento, como lo son el sabor y la textura del mismo, juegan un papel fundamental en la aceptación continua de nuevos productos, independientemente de sus beneficios para la salud (Cheung *et al.*, 2015). En función de ello, resulta de especial interés considerar y evaluar las propiedades sensoriales de los productos para garantizar su posible aceptación y éxito en el mercado.

Por todo lo expuesto, **el presente trabajo** pretende obtener potenciales ingredientes funcionales elaborados a partir del concentrado de proteínas de suero lácteo, un subproducto de importancia para la industria láctea. Para ello, se empleará la hidrólisis enzimática utilizando proteasas comerciales, conocidas por su eficacia en la producción de péptidos bioactivos. Inicialmente, se evaluarán diferentes condiciones del proceso de hidrólisis y se seleccionarán las más convenientes para la obtención de aquellos hidrolizados que muestren aptitudes para ser estudiados en mayor profundidad y, eventualmente, ser considerados como potenciales ingredientes funcionales. Seguidamente, el estudio se centrará en caracterizar estos ingredientes desde el punto de vista de su composición y diversas propiedades fisicoquímicas, funcionales y bioactivas. Un aspecto clave del trabajo será evaluar el potencial de combinar Alcalase® y Flavourzyme® en la producción de hidrolizados de proteínas de suero lácteo, analizando cómo esta combinación enzimática influye en las propiedades del hidrolizado, particularmente en términos de funcionalidad y bioactividad. Además, los ingredientes obtenidos se incorporarán en una matriz alimentaria de base láctea, donde se evaluará su potencial bioactivo, el impacto sobre el perfil sensorial y la aceptabilidad del producto formulado. El enfoque planteado para el presente trabajo de Tesis busca añadir valor al lactosuero y explorar las aplicaciones de los hidrolizados en la industria alimentaria, particularmente en el ámbito del diseño y la formulación de nuevos alimentos funcionales.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

2.1. Objetivo general

Obtener un ingrediente bioactivo a partir de la hidrólisis parcial de concentrado de proteína de suero lácteo (WPC 80), caracterizarlo desde el punto de vista fisicoquímico, tecnológico y funcional, y utilizarlo en la formulación de matrices alimentarias que puedan ser consumidas por amplios sectores de la población.

2.2. Objetivos específicos

- ❖ Obtener, a través del tratamiento de suspensiones de concentrados de proteínas de lactosuero (WPC 80) con enzimas hidrolíticas comerciales, derivados adecuados por hidrólisis parcial de dichas proteínas.
- ❖ Caracterizar los extractos de hidrolizados obtenidos, estudiando aquellas propiedades fisicoquímicas, bioactivas y tecnofuncionales que son de relevancia, tanto desde un punto de vista científico como tecnológico.
- ❖ Incorporar el ingrediente obtenido a matrices alimentarias y estudiar aspectos de calidad nutricional, propiedades fisicoquímicas y análisis sensorial, a fin de evaluar la viabilidad del producto alimenticio considerando el posible escalado y/o transferencia tecnológica del proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos empleados en el presente trabajo de Tesis se organizaron en torno a tres ejes principales, directamente relacionados con los objetivos específicos planteados:

1. **Obtención de hidrolizados de proteínas de suero lácteo**
2. **Caracterización de los hidrolizados obtenidos**
3. **Incorporación de los ingredientes en una matriz alimentaria**

Además, se incluyó un cuarto apartado correspondiente al **análisis estadístico** de los datos obtenidos. En las siguientes secciones, se describen en detalle cada uno de estos ejes.

3.1. OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO

3.1.A. Protocolo general del proceso de hidrólisis enzimática

El proceso de hidrólisis enzimática se llevó a cabo en un reactor discontinuo de doble camisa, conectado a un baño termostático con recirculación externa y equipado con un agitador magnético. La temperatura y el pH del proceso se controlaron mediante un pHmetro de mesada HANNA® HI 2211 (HANNA Instruments, CABA, Argentina). La **Figura 6** ilustra el equipamiento empleado y su disposición durante el procedimiento.

Como sustrato, se utilizó el concentrado de proteínas de suero lácteo (LACPRODAN 80, Arla Foods Ingredients S.A., Porteña, Córdoba, Argentina), compuesto por un 80% (m/m) de proteínas (WPC-80). Los preparados enzimáticos comerciales de grado alimenticio Alcalase® 2.4L (ALC) y Flavourzyme® 500L (FLA) (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca), se emplearon como catalizadores tanto de manera individual como en combinación. Previo a su uso, el WPC-80 se reconstituyó en agua ultrapura bajo agitación magnética continua hasta su completa disolución y se almacenó a 4°C durante 24 h para garantizar la hidratación total de las proteínas.

Un volumen definido de sustrato (60 o 300 mL) se transfirió al reactor, donde se calentó a 50°C bajo agitación magnética continua. Una vez alcanzada la temperatura deseada, se ajustó el pH utilizando NaOH 1 M, y se inició la hidrólisis mediante la incorporación de la enzima a la mezcla de reacción. Durante el proceso, se mantuvo la agitación continua como también la temperatura y el pH, este último regulado mediante la adición controlada de NaOH desde una bureta, en forma de goteo manual. El volumen de NaOH añadido se registró a intervalos de tiempo regulares para calcular el grado de hidrólisis, de acuerdo con el método descrito en la sección **3.2.A.1**. La hidrólisis enzimática se detuvo llevando la mezcla a un baño de agua a 80°C durante 20 min para inactivar la enzima. Los hidrolizados de proteínas de suero (WPHs)

obtenidos se enfriaron a temperatura ambiente, se almacenaron a -20°C y posteriormente se liofilizaron utilizando un liofilizador de laboratorio Heto FD 2.5 (Heto Lab Equipment A/S, Allerød, Dinamarca).



Figura 6. Equipamiento utilizado durante el proceso de hidrólisis enzimática. **(A)** Experiencias preliminares. **(B)** Obtención de ingredientes funcionales. **1:** pHmetro, **2:** temporizador, **3:** agitador magnético, **4:** reactor de doble camisa, **5:** electrodo de pH con sonda de temperatura, **6:** bureta de 25 mL con NaOH, **7:** baño termostático con recirculación externa.

El protocolo general descrito se utilizó tanto en **experiencias preliminares** como en la **obtención de los ingredientes funcionales** finales. Las condiciones específicas del proceso de hidrólisis empleadas en cada etapa experimental se resumen en la **Figura 7** y se describen a continuación.

| ETAPAS GENERALES DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS | CONDICIONES ESPECÍFICAS DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS | | | |
|---|--|--|---|--|
| | EXPERIENCIAS PRELIMINARES | | OBTENCIÓN DE INGREDIENTES FUNCIONALES | |
| | WPHs ALC | WPHs FLA | WPH-A | WPH-AF |
| 1 Preparación del sustrato | WPC-80 en agua ultrapura al 1 - 2 - 4 - 6 - 8 - 10 - 12 % (m/v) de proteínas | | WPC-80 en agua ultrapura al 8% (m/v) de proteínas | |
| 2 Almacenamiento del sustrato | 4°C - 24 h | | 4°C - 24 h | |
| 3 Introducción al reactor | Volumen de sustrato de 60 mL | | Volumen de sustrato de 300 mL | |
| 4 Calentamiento | 50°C | | 50°C | |
| 5 Ajuste de pH | pH: 7 - 8 - 9 | | pH: 8,5 | |
| 6 Adición de la enzima (inicio de la reacción) | Alcalase®: 1 - 2 - 3% (m/m) de proteínas | Flavourzyme®: 4 - 5,5 - 7% (m/m) de proteínas | Alcalase®: 2% (m/m) de proteínas | |
| 7 Incubación | 180 min - 50°C Titulación: NaOH 0,5 N | 180 min - 50°C Titulación: NaOH 0,1 N | 60 min - 50°C Titulación: NaOH 1 N | |
| 8 Inactivación enzimática (fin de la reacción) | 80°C - 20 min | | 80°C - 20 min | |
| PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS | Etapa I: WPH ALC 1% pH 7-8-9_2% WPH ALC 2% pH 7-8-9_2% WPH ALC 4% pH 7-8-9_2% WPH ALC 6% pH 7-8-9_2% WPH ALC 8% pH 7-8-9_2% WPH ALC 10% pH 7-8-9_2% WPH ALC 12% pH 7-8-9_2% | Etapa I: WPH FLA 1% pH 7-8-9_5,5% WPH FLA 2% pH 7-8-9_5,5% WPH FLA 4% pH 7-8-9_5,5% WPH FLA 6% pH 7-8-9_5,5% WPH FLA 8% pH 7-8-9_5,5% WPH FLA 10% pH 7-8-9_5,5% WPH FLA 12% pH 7-8-9_5,5% | WPH-A | Se repiten: 4 5 6 7 8 HIDRÓLISIS ADICIONAL con Flavourzyme® [5,5% (m/m) de proteínas] 120 min - 50°C Titulación: NaOH 1 N |
| | Etapa II: WPH ALC 8% pH 9_1% WPH ALC 8% pH 9_2% WPH ALC 8% pH 9_3% | Etapa II: WPH FLA 8% pH 8_4% WPH FLA 8% pH 8_5,5% WPH FLA 8% pH 8_7% | | WPH-AF |
| Enfriamiento a temperatura ambiente, almacenamiento a -20°C y liofilización | | | | |

Figura 7. Etapas generales y condiciones específicas del proceso de hidrólisis enzimática empleadas para la obtención de WPHs.

3.1.B. Experiencias preliminares

Se realizaron múltiples reacciones de hidrólisis enzimática con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes variables del proceso sobre las características de los WPHs. Los preparados enzimáticos ALC y FLA se utilizaron de manera individual, variando la concentración de sustrato, el pH de la reacción y la relación enzima/sustrato (E/S), según lo especificado en la **Tabla 4**.

En una **primera etapa**, se evaluó la concentración de sustrato en un rango de 1 a 12% (m/v) de proteínas, utilizando tres niveles de pH: 7, 8 y 9. En estas condiciones, cada preparado enzimático se probó a una relación E/S fija de 2% (m/m) de proteínas para ALC y 5,5% (m/m) de proteínas para FLA. En una **segunda etapa**, se estableció una concentración de sustrato fija de 8% (m/v) de proteínas, ajustando el pH en 9 para ALC y 8 para FLA, y evaluando tres relaciones E/S diferentes (**Tabla 4**).

Cada experimento se realizó por duplicado, utilizando un volumen de sustrato de 60 mL (**Figura 6.A**). Las reacciones se llevaron a cabo a 50°C por 180 min. Durante el proceso, el pH se mantuvo constante mediante la adición controlada de NaOH 0,5 M para las hidrólisis con ALC y NaOH 0,1 M para las realizadas con FLA. Luego de la inactivación enzimática y el enfriamiento a temperatura ambiente, los WPHs obtenidos se almacenaron a -20°C, y una alícuota de 10 mL de cada muestra fue liofilizada para su posterior análisis.

Adicionalmente, se prepararon controles de proteínas de suero sin hidrolizar (CSH), sometiendo el WPC-80 a las mismas condiciones operativas que los ensayos de hidrólisis (agitación continua, temperatura de 50°C y pH constante durante 180 min), pero omitiendo la adición de la enzima y el paso de inactivación térmica.

Tabla 4. Variables de estudio en las experiencias preliminares del proceso de hidrólisis enzimática.

| | Etapa I | Etapa II |
|---------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| S ₀ [% (m/v) de proteínas] | 1 - 2 - 4 - 6 - 8 - 10 - 12 | 8 |
| pH de reacción | 7 - 8 - 9 | ALC: 9, FLA: 8 |
| Preparado enzimático | ALC o FLA | |
| Relación E/S [% (m/m) de proteínas] | ALC: 2 FLA: 5,5 | ALC: 1 - 2 - 3 FLA: 4 - 5,5 - 7 |
| Tiempo de reacción (min) | 180 | |
| Temperatura (°C) | 50 | |
| Molaridad de NaOH (M) | ALC: 0,5 - FLA: 0,1 | |

Etapa I: Estudio de la concentración de sustrato (S₀) y del pH de reacción. **Etapa II:** Estudio de la relación E/S.

3.1.C. Obtención de los ingredientes funcionales

A partir de los resultados obtenidos en las experiencias preliminares de hidrólisis enzimática, se seleccionaron las condiciones más adecuadas para la producción de dos WPHs con aptitudes particulares para ser considerados posibles ingredientes funcionales. Para facilitar su identificación a lo largo del manuscrito, estos hidrolizados serán mencionados como “ingredientes funcionales” (en conjunto) o, de forma individual, como WPH-A y WPH-AF. Las condiciones específicas de obtención de estos ingredientes se presentan en la **Tabla 5**.

Como sustrato de partida de ambos WPHs, se empleó WPC-80, reconstituido en agua ultrapura a una concentración proteica del 8% (m/v), ajustado a pH 8,5 tras ser calentado a 50°C. El **WPH-A** se produjo mediante un tratamiento único con ALC, utilizando una relación E/S de 2% (m/m) de proteínas y un tiempo de reacción de 60 min. Por otro lado, el **WPH-AF** se obtuvo mediante dos etapas secuenciales de hidrólisis. En la primera, se utilizó ALC bajo las mismas condiciones que el WPH-A. Posteriormente, tras la inactivación térmica de ALC y la restauración de las condiciones de temperatura y pH (50°C y pH 8,5), se llevó a cabo la segunda etapa, añadiendo FLA en una relación E/S de 5,5% (m/m) de proteínas. Transcurridos 120 min adicionales de reacción, esta se dio por finalizada con la inactivación de la enzima, tal como se describe en el protocolo general.

Durante todas las reacciones enzimáticas, el pH se mantuvo en 8,5 mediante la adición de NaOH 1 M. El volumen de sustrato empleado para la obtención de los ingredientes funcionales fue de 300 mL (**Figura 6.B**). Inicialmente, se realizaron cinco réplicas de cada uno, las cuales se agruparon en un único lote antes de la liofilización para su caracterización inicial. Posteriormente, antes del desarrollo de las formulaciones alimentarias, se elaboraron nueve réplicas adicionales de cada ingrediente funcional.

Tabla 5. Condiciones del proceso de obtención de los ingredientes funcionales.

| Ingrediente funcional | WPH-A | WPH-AF |
|---------------------------------------|--------------|--------------------|
| S ₀ [% (m/v) de proteínas] | 8 | |
| pH de reacción | 8,5 | |
| Preparado enzimático | ALC | ALC seguida de FLA |
| Relación E/S [% (m/m) de proteínas] | 2 | ALC: 2 - FLA: 5,5 |
| Tiempo de reacción (min) | 60 | ALC: 60 - FLA: 120 |
| Temperatura (°C) | 50 | |
| Molaridad de NaOH (M) | 1 | |

S₀: concentración de sustrato.

3.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS OBTENIDOS

Los WPHs obtenidos fueron caracterizados en diferentes niveles de profundidad según su etapa de desarrollo. Aquellos derivados de las experiencias preliminares, se sometieron a una caracterización más acotada, enfocada en algunos parámetros de particular importancia que permitieran evaluar su viabilidad inicial y seleccionar las condiciones más adecuadas para la posterior obtención de los ingredientes funcionales. En contraste, los WPHs seleccionados como ingredientes funcionales (WPH-A y WPH-AF) fueron objeto de una caracterización más exhaustiva, que abarcó un análisis integral de su composición y propiedades fisicoquímicas, funcionales y bioactivas. La **Figura 8** esquematiza los ensayos realizados, resaltando las diferencias en la profundidad de la caracterización entre ambos conjuntos de hidrolizados. En las siguientes secciones, se describen en detalle cada una de estas determinaciones.

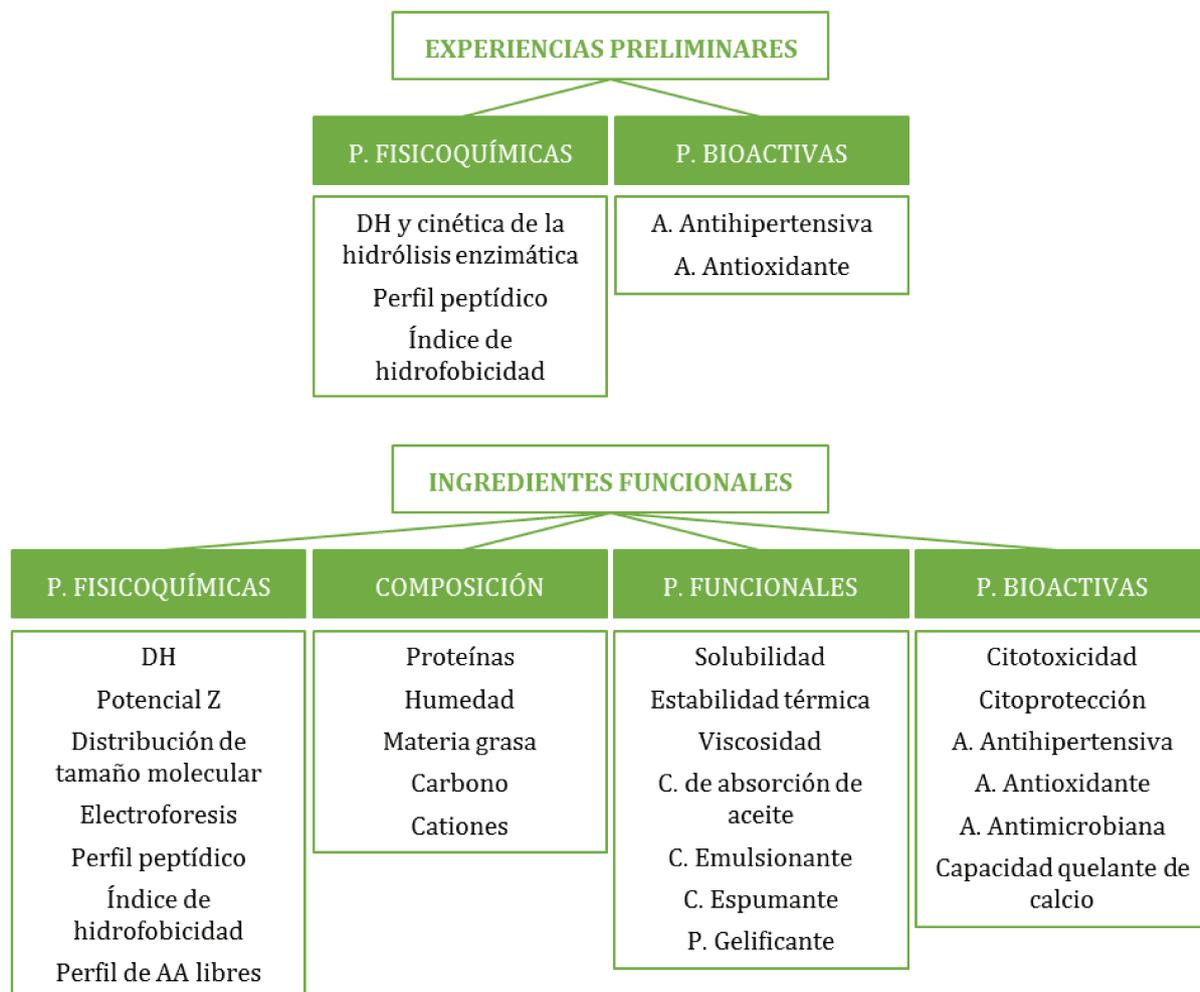


Figura 8. Ensayos de caracterización de los WPHs obtenidos en experiencias preliminares e ingredientes funcionales. **A.:** actividad, **C.:** capacidad, **P.:** propiedad.

3.2.A. Caracterización de los WPHs obtenidos en experiencias preliminares

3.2.A.1. Grado de hidrólisis y cinética de hidrólisis enzimática

El grado de hidrólisis (DH) alcanzado por los WPHs durante el proceso de hidrólisis enzimática se determinó utilizando el método *pH-stat* (Adler-Nissen, 1986). Este método se fundamenta en la cantidad de solución de NaOH necesaria para mantener constante el pH durante la hidrólisis. La ruptura del enlace peptídico genera un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo amino (-NH₂) en los extremos C y N de los dos péptidos producidos, respectivamente. A pH neutro o básico, los grupos carboxilos formados liberan un protón, que puede ser titulado con la solución de NaOH. Sin embargo, la mayoría de los grupos amino coproducidos también capturan un protón para formar grupos amonio a pH neutro, contrarrestando así la mayor parte de los protones liberados por los grupos carboxilos (Mat *et al.*, 2018). Por lo tanto, para estimar el porcentaje de enlaces peptídicos escindidos, se considera no sólo el volumen de NaOH añadido sino también el grado de disociación promedio de los grupos α -amino liberados, utilizando la **Ecuación 1**.

$$DH(\%) = 100 \times B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{Mp} \times \frac{1}{h_{total}} \quad (1)$$

donde B es el volumen (mL) de NaOH añadido, N_b es la normalidad de la solución de NaOH, Mp es la masa (g) de proteínas en la muestra, h_{total} es el número total de uniones peptídicas en el sustrato (8,8 para WPC) y α es el grado de disociación promedio de los grupos α -amino liberados durante la hidrólisis, calculado mediante la **Ecuación 2**.

$$\alpha = \frac{10^{(pH-pK)}}{1 + 10^{(pH-pK)}} \quad (2)$$

donde el pK es el valor de disociación promedio de los grupos α -amino liberados durante la hidrólisis, obtenido mediante la **Ecuación 3**.

$$pK = 3,8 + 0,45 \times pH \quad (3)$$

Por otra parte, el DH se empleó para analizar la cinética de hidrólisis de los WPHs. A partir del gráfico de DH (%) respecto al tiempo (t, min), se determinaron los parámetros cinéticos *a* y *b* mediante regresión no lineal, utilizando la **Ecuación 4** propuesta por Wu *et al.* (2016). Este modelo ha sido previamente utilizado en el estudio de la hidrólisis enzimática de diversas proteínas tanto animales como vegetales (González-Tello *et al.*, 1994; Márquez & Vázquez, 1999; Apar & Özbek, 2008; Demirhan *et al.*, 2011).

$$DH(\%) = \frac{1}{b} \times \ln(1 + abt) \quad (4)$$

Finalmente, se evaluó el efecto de la concentración de sustrato, el pH de reacción y la relación E/S sobre el DH final y los parámetros cinéticos a y b .

3.2.A.2. Perfil peptídico

El perfil peptídico de los WPHs se evaluó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC), siguiendo la metodología descrita por Fenoglio *et al.* (2016) con modificaciones. Las muestras, presentadas en disolución según su obtención inicial, fueron tratadas mezclando 1 mL de cada una con 1 mL de urea 6 M. La mezcla se agitó y se diluyó hasta alcanzar un volumen final de 10 mL. Posteriormente, se filtró 1 mL de esta solución a través de membranas de nylon de 0,22 μm de diámetro de poro (Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, EE.UU.), y el filtrado se transfirió a viales para su posterior inyección.

El análisis se llevó a cabo utilizando un sistema cromatográfico Waters (Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.), que consta de una bomba binaria Waters 1525 Series, un inyector automático Waters 717 plus, un desgasificador en línea AF y un detector de absorbancia UV-VIS dual Waters 2487 que se configuró a una longitud de onda de 215 nm. La separación cromatográfica se realizó mediante una columna analítica C₁₈ (5 μm de tamaño de partícula, 300 Å de tamaño de poro, dimensiones: 4,6 mm x 250 mm), modelo Microsorb-MV 300-5 C18 (Varian Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.), termostaticada a 30°C. Se utilizó una elución por gradiente empleando ácido trifluorocético al 0,1% (v/v) en agua como fase móvil A y ácido trifluorocético al 0,1% (v/v) en acetonitrilo como fase móvil B. Para cada muestra tratada, se utilizó un volumen de 100 μL para la inyección en el sistema. Se mantuvo un caudal constante de fase móvil de 1 mL/min, empleando el gradiente de elución presentado en la **Tabla 6**.

Como reactivos estándares se emplearon BSA (Wiener lab., Rosario, Argentina), β -LG (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.) y α -LA (Agropur Cooperative, Saint-Hubert, Longueuil, Canadá). Para el control del equipo durante las corridas y el posterior procesamiento de los resultados, se utilizó el software Waters Breeze System® (Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.).

Tabla 6. Gradiente de elución utilizado para la determinación del perfil peptídico por RP-HPLC.

| Tiempo (min) | Fase móvil A (%) | Fase móvil B (%) |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0-5 | 100 | 0 |
| 5-50 | 100-50 | 0-50 |
| 50-55 | 50 | 50 |
| 55-60 | 70-30 | 50-70 |
| 60-65 | 30 | 70 |

Fase móvil A: ácido trifluorocético al 0,1% (v/v) en agua, **Fase móvil B:** ácido trifluorocético al 0,1% (v/v) en acetonitrilo.

3.2.A.3. Índice de hidrofobicidad

Los perfiles cromatográficos obtenidos por RP-HPLC, tal como se describió en la sección **3.2.A.2.**, se emplearon para determinar el índice de hidrofobicidad según el método propuesto por [da Costa et al. \(2007\)](#). Estos autores propusieron dividir el cromatograma en tres zonas en función del gradiente de elución de acetonitrilo (fase móvil B). Una primera región, de hidrofobicidad baja (HB), abarcó los péptidos recuperados entre un 30% y 35% (v/v) de acetonitrilo; la segunda, de hidrofobicidad media (HM), involucró a los péptidos eluidos entre 35% y 40% (v/v) de acetonitrilo; y la tercera, de hidrofobicidad alta (HA), los péptidos y/o proteínas eluidas con un porcentaje de acetonitrilo superior al 40% (v/v).

Inicialmente, se determinaron los tiempos límite para cada zona del cromatograma conforme a las condiciones de elución de la fase móvil B (**Figura 9**). La región de HB abarcó desde los 32 hasta los 36,5 min, la de HM, desde los 36,5 hasta los 41 min, y la de HA, desde los 41 min hasta el final del cromatograma. Posteriormente, se sumaron las áreas integradas por cada zona y se determinó el porcentaje de hidrofobicidad en relación al área total del cromatograma.

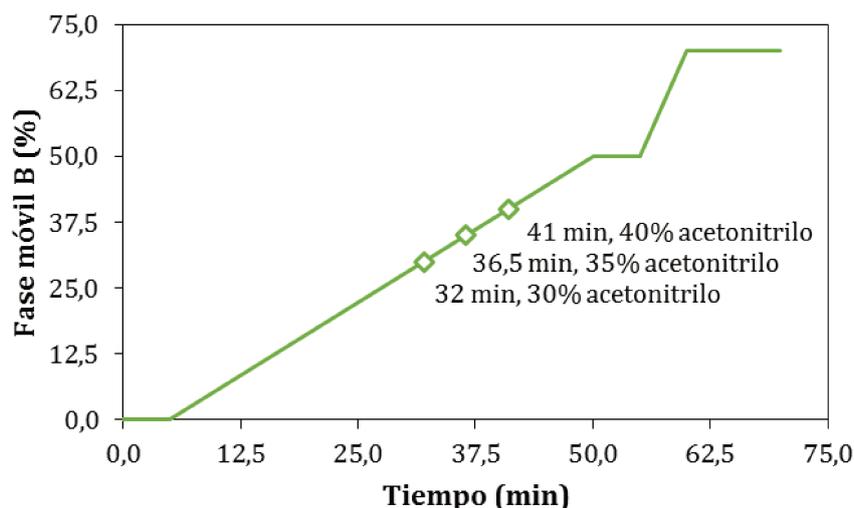


Figura 9. Condiciones de elución de la fase móvil B durante la corrida de RP-HPLC.

3.2.A.4. Actividad antihipertensiva

La actividad antihipertensiva (AAH) de los WPHs se determinó *in vitro* mediante el ensayo de inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina I (ECA). Esta enzima juega un papel crucial en la hipertensión arterial y se considera un factor de riesgo significativo de enfermedades cardíacas y vasculares (Jeewanthi *et al.*, 2017). En el cuerpo humano, la ECA aumenta la presión arterial al convertir el péptido inactivo angiotensina I en angiotensina II, un potente vasoconstrictor, y al desactivar la bradiquinina, un agente vasodilatador (Morais *et al.*, 2014).

Para el ensayo de inhibición de la ECA se utilizó el método descrito por Hayakari *et al.* (1978) con modificaciones realizadas por Cian *et al.* (2011). El mismo se basa en la reacción específica entre el ácido hipúrico, liberado por la ECA en presencia del sustrato hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL), y la 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (TT). Esta reacción produce un compuesto coloreado cuya absorbancia se mide a 382 nm. Las etapas del ensayo se resumen en la **Figura 10** y se describen a continuación. Inicialmente, se extrajo la ECA a partir de pulmones de conejos adultos jóvenes provistos por la Escuela de Agricultura, Ganadería y Granja UNL (Esperanza, Argentina). Para ello, se homogeneizó en frío, mediante un baño de hielo molido y un homogeneizador UltraTurrax T25 Basic (IKA, Staufen, Alemania) a 11.000 rpm, 1 g de pulmón, 5 μ L de fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1 M y 5 mL de buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 8,3 que contenía D-sacarosa 0,25 M. Una vez que el tejido se destruyó por completo, el homogeneizado se centrifugó a $9.498 \times g$ durante 10 min a 4°C utilizando una centrífuga Biofuge 28RS (Heraeus Sepatech, Osterode, Alemania). El sobrenadante se recogió, se fraccionó en diferentes tubos de microcentrífuga y se almacenó a -20°C hasta su uso como fuente de ECA.

Para el ensayo de inhibición de la ECA propiamente dicho, se prepararon diferentes mezclas de reacción por duplicado en tubos eppendorf sumergidos en un baño de hielo molido. Los componentes y cantidades de cada mezcla se detallan en la **Tabla 7**. Brevemente, las mezclas incluyeron 15 μL de NaCl 5 M, 20 μL de HHL 3,3 g/L, 175 μL de buffer fosfato de sodio (BFS) 100 mM pH 8,3, 20 μL de muestra y 20 μL de ECA. Las preparaciones se incubaron en un baño de agua a 37°C durante 45 min. La reacción se detuvo por la adición de 665 μL de TT (30 mg/mL) en dioxano, seguido de 1,1 mL de BFS 100 mM pH 8,3. Luego de 10 min de incubación para dar tiempo a la formación de color, se centrifugó a $9.498 \times g$ durante 10 min a temperatura ambiente utilizando una centrífuga Biofuge 28RS. A continuación, se procedió a leer la absorbancia a 382 nm. Finalmente, el porcentaje de inhibición de la ECA se obtuvo mediante la **Ecuación 5**.

$$\text{Inhibición de la ECA}(\%) = 100 - \left[\left(\frac{AM - ABM}{AE - ABE} \right) \times 100 \right] \quad (5)$$

donde AM es la absorbancia de ECA con muestra y HHL, ABM es la absorbancia de ECA con muestra (sin HHL) (control de muestra), AE es la absorbancia de ECA con HHL (sin muestra) (control positivo), y ABE es la absorbancia del sustrato sin ECA ni muestra (control negativo).

Tabla 7. Reactivos y cantidades utilizadas en el ensayo de inhibición de la ECA.

| Mezcla | M | BM | E | BE |
|----------------------------------|----------|-----------|----------|-----------|
| NaCl 5 M (μL) | 15 | 15 | 15 | 15 |
| HHL en BFS (μL) | 20 | - | 20 | 20 |
| BFS (μL) | 175 | 195 | 195 | 195 |
| Muestra (μL) | 20 | 20 | - | - |
| ECA (μL) | 20 | 20 | 20 | - |
| Incubación durante 45 min a 37°C | | | | |
| ECA (μL) | - | - | - | 20 |
| TT (μL) | 665 | 665 | 665 | 665 |
| BFS (μL) | 1100 | 1100 | 1100 | 1100 |

M es la preparación que contiene ECA, muestra y HHL, **BM** es la preparación que contiene ECA y muestra en ausencia de HHL, **E** es la mezcla de reacción que contiene ECA y HHL en ausencia de muestra, y **BE** es la mezcla que no contiene ECA ni muestra.

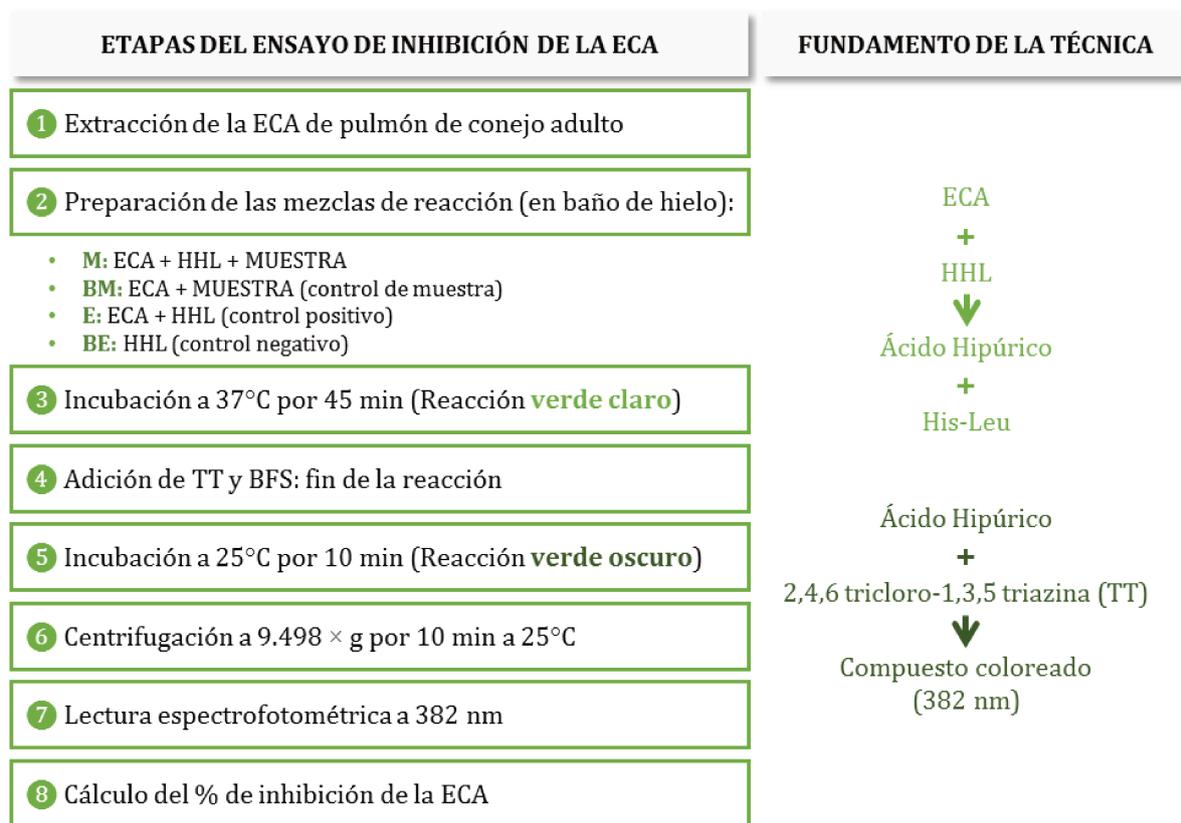


Figura 10. Etapas del ensayo de inhibición de la ECA y fundamento de la técnica.

La AAH se determinó en función de las condiciones de hidrólisis empleadas en la obtención de los WPHs. El efecto de la concentración, se estudió al pH óptimo de cada preparado enzimático, pH 8 para FLA y pH 9 para ALC. El efecto de la relación enzima/sustrato se estudió en todos los niveles empleados tanto para ALC como para FLA. Pevio a su análisis, las muestras liofilizadas se reconstituyeron en agua ultrapura a la concentración de 30 mg/mL para los WPHs obtenidos con FLA y a 5 mg/mL para los obtenidos con ALC. Luego de evaluar el efecto de las condiciones de hidrólisis en el grado de inhibición de la ECA (%), se seleccionó un hidrolizado representativo de cada tipo de preparado enzimático y se determinó el índice IC₅₀, el cual indica la concentración necesaria para reducir la actividad de la ECA en un 50%. Para tal fin, se seleccionó el WPH obtenido con FLA a partir de WPC-80 al 10% (m/v) pH 8 (WPH FLA 10% pH 8_5,5%) y el WPH obtenido con ALC a partir de WPC-80 al 8% (m/v) pH 9 (WPH ALC 8% pH 9_2%). Ambos hidrolizados se prepararon en agua ultrapura en el rango de concentración de 0,05 a 8 mg/mL.

3.2.A.5. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante (AAO) de los WPHs se determinó mediante el método de eliminación de radicales libres descrito por *Re et al. (1999)* con modificaciones. Esta metodología se fundamenta en la lectura espectrofotométrica a 734 nm del color residual del radical ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico), generado previamente por adición del agente radicalario K₂S₂O₈ y estandarizado a esa longitud de onda. La intensidad del color disminuye cuando el radical es reducido por la presencia de un determinado compuesto antioxidante (**Figura 11**). El grado de decoloración observado proporciona una medida directa del potencial antioxidante del compuesto analizado.

Las etapas que involucraron la determinación de la AAO se muestran en la **Figura 11** y se describen a continuación. Inicialmente, se preparó una solución madre de ABTS 7 mM en BFS 5 mM pH 7,4 a la cual se le añadió persulfato de potasio (61,25 mM en BFS 5 mM pH 7,4) hasta lograr una concentración final de la sal de 2,45 mM. Dicha mezcla se incubó en oscuridad durante 12-16 h a temperatura ambiente para permitir la formación del radical ABTS^{•+}. Transcurrido este tiempo y al momento previo de la determinación, se diluyó la mezcla de ABTS^{•+} con BFS 5 mM pH 7,4 para su estandarización hasta lograr una absorbancia de 0,70 ± 0,02 a 734 nm.

Para la determinación de la AAO propiamente dicha, se mezcló un volumen conveniente de muestra (<10 µL) con 1 mL de la solución de ABTS^{•+} y se dejó reaccionar durante 7 min a temperatura ambiente, en oscuridad. Debido a que la reacción de reducción del ABTS^{•+} continúa (aunque lentamente) después de los 7 min, las determinaciones se realizaron de una muestra por vez. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió con la lectura de la absorbancia a 734 nm. Antes de cada determinación, se registró la absorbancia del reactivo en ausencia de la muestra. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y la tasa de eliminación del radical ABTS^{•+} se calculó como el porcentaje de disminución de color (D) mediante la **Ecuación 6**.

$$D(\%) = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100 \quad (6)$$

donde A_i es la absorbancia de la solución de ABTS^{•+} antes de agregar la muestra, y A_f es la absorbancia de la mezcla de ABTS^{•+} junto con la muestra luego de los 7 min de incubación.

Como estándar para la construcción de las curvas de calibración, se empleó una solución madre de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, compuesto análogo de vitamina E) 4 mM preparado en 50% (v/v) de etanol absoluto y 50% (v/v) de BFS 5 mM pH 7,4. Las mismas se realizaron empleando un rango de concentración de Trolox de 4-24 µM, con el fin de lograr un porcentaje de reducción de color inicial a 734 nm de entre 20% y 85%. De esta

manera distintitos volúmenes de Trolox 4 mM (1, 2, 3, 4, y 6 μL) reaccionaron con el reactivo $\text{ABTS}^{\bullet+}$ siguiendo el protocolo descrito para las muestras. La AAO se expresó como capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) mediante la **Ecuación 7**.

$$TEAC (mM) = \left[\frac{D (\%) - I}{m} \right] \times \frac{(1000 + S)}{S} \times \frac{1}{1000} \quad (7)$$

donde D es el porcentaje (%) de disminución de color determinado en la **Ecuación 6**, I es la ordenada al origen de la curva de calibración de Trolox, m es la pendiente ($\text{L}/\mu\text{M}$) de la curva de calibración de Trolox, 1000 es el volumen (μL) de la solución de radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, S es el volumen (μL) de muestra empleado en el ensayo y $1/1000$ es el factor de conversión necesario para expresar los resultados en mM. De manera similar a lo descrito para la AAH, se evaluó el impacto de las condiciones de hidrólisis empleadas en la obtención de los WPH sobre la AAO, analizando las mismas muestras a las mismas concentraciones. La curva de calibración que vincula el D (%) a 734 nm vs la concentración de Trolox se presenta en el **Anexo 1**.

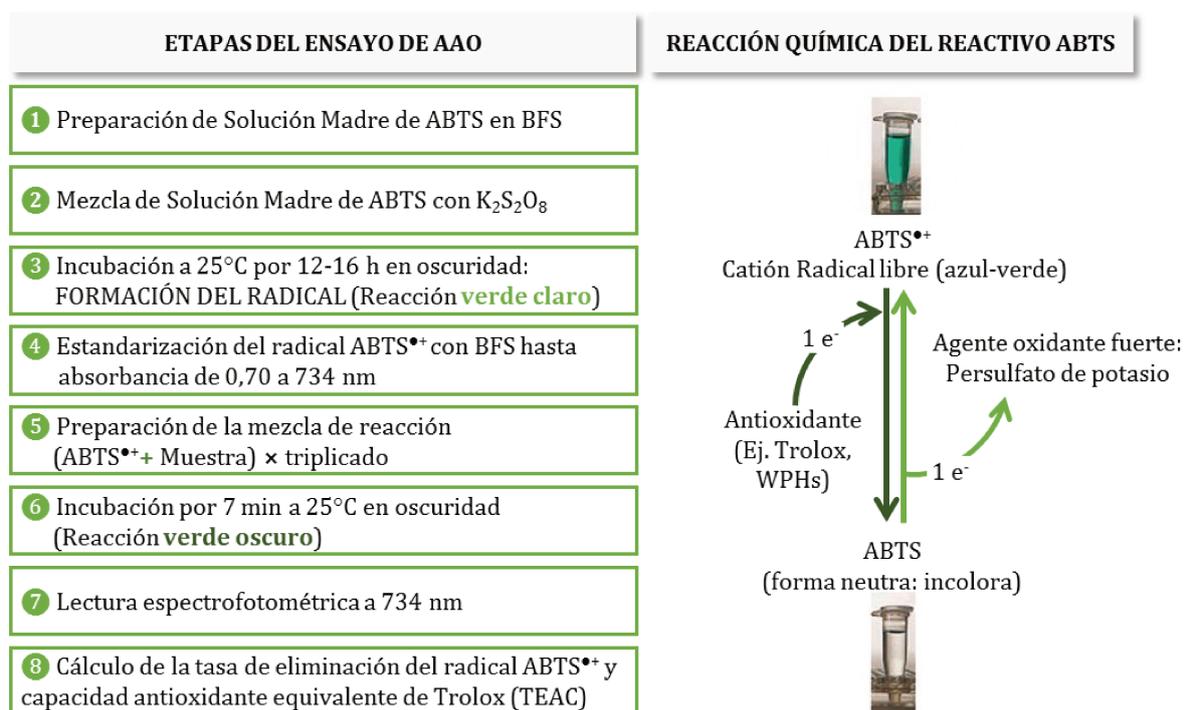


Figura 11. Etapas correspondientes a la determinación de la actividad antioxidante (AAO) y reacción química que experimenta el reactivo ABTS durante la misma [Figura modificada de Boligon *et al.* (2014)].

3.2.B. Caracterización de los ingredientes funcionales

Para la caracterización de los ingredientes funcionales obtenidos (WPH-A y WPH-AF), se emplearon diversas técnicas y metodologías que permitieron un análisis exhaustivo de sus propiedades (**Figura 8**). Se evaluaron diversas **propiedades fisicoquímicas**, incluyendo el grado de hidrólisis, el potencial zeta, la distribución de tamaño molecular, los perfiles peptídicos y de aminoácidos, así como el índice de hidrofobicidad. La **composición** de los ingredientes se analizó determinando los contenidos de proteínas, humedad, materia grasa, cationes y carbono. En cuanto a las **propiedades funcionales**, se examinaron aspectos como la solubilidad, la estabilidad térmica, la viscosidad, la capacidad emulsionante, espumante y gelificante de los hidrolizados. También se evaluaron las **propiedades bioactivas**, que incluyeron la citoprotección, la actividad antihipertensiva, la actividad antioxidante, la actividad antimicrobiana y la capacidad ligante de calcio. Aunque la determinación de la posible presencia de citotoxicidad no se relaciona estrictamente con una propiedad bioactiva del hidrolizado, se incluyó en el análisis debido a su relevancia en la evaluación de la seguridad de los ingredientes. Las pruebas de citotoxicidad son muy importantes para asegurar que los posibles ingredientes no causen efectos nocivos en las células y, en consecuencia, sean aptos para su uso en formulaciones finales. Finalmente, en los ensayos de caracterización se consideraron factores adicionales como la concentración de WPH utilizada, el pH y la aplicación de diversos tratamientos térmicos. A continuación, se describen las metodologías empleadas y los niveles de los factores estudiados en cada caso.

3.2.B.1. Determinación de las propiedades fisicoquímicas

❖ Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis alcanzado en la obtención de los ingredientes funcionales durante el proceso de hidrólisis enzimática se determinó según el procedimiento descrito en la sección **3.2.A.1.**

❖ Potencial zeta

El potencial zeta de los ingredientes funcionales se determinó mediante dispersión de luz electroforética (ELS) utilizando un analizador de partículas Litesizer 500 (Anton Paar GmbH, Graz, Austria) a 25°C, aplicando la aproximación de Smoluchowski y un factor de Henry de 1,5. Las muestras se prepararon a una concentración de 1% (m/v) en BFS 10 mM pH 7. El pH de las

soluciones se ajustó a 3, 4, 4,5, 5, 6 y 7 mediante la adición de HCl 1 M y/o NaOH 1 M. Se transfirió 0,9 mL de cada muestra a una cubeta Omega, la cual se introdujo en la celda de medición del analizador. Para cada valor de pH, se realizaron 3 mediciones consecutivas, y los datos experimentales se procesaron utilizando el software Kalliope (Anton Paar GmbH). Además, se determinó el punto isoeléctrico (pI) de las muestras, definido como el pH en el cual la carga neta promedio de las moléculas contenidas en los ingredientes resultó ser nula (potencial zeta igual a cero).

❖ *Distribución de tamaño molecular*

El tamaño y la distribución de partículas de los ingredientes obtenidos se determinaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS). Las mediciones se llevaron a cabo a 25°C utilizando el analizador de partículas Litesizer 500 (Anton Paar GmbH) y un ángulo de dispersión de 90°. Las muestras se prepararon a una concentración de 1% (m/v) en BFS 10 mM pH 7 y luego se diluyeron 1/20 para asegurar una transmitancia superior al 70%. Se añadieron 0,9 mL de estas diluciones a cubetas de poliestireno desechables y se colocaron en la celda de medición del analizador. Para cada muestra, se realizaron 3 mediciones consecutivas y los datos experimentales se procesaron utilizando el software Kalliope (Anton Paar GmbH).

❖ *Electroforesis*

El perfil electroforético se determinó mediante la metodología de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), siguiendo el método de [Laemmli \(1970\)](#) y [Ballatore et al. \(2020\)](#) con modificaciones y empleando un sistema de electroforesis vertical MiniVE (Cytiva, Uppsala, Suecia). En la **Figura 12** se resumen las etapas llevadas cabo para esta determinación.

Inicialmente, se preparó la placa de gel con un tamaño de 8 cm x 10 cm x 1 mm, compuesta por 7 cm de gel de resolución (de poro fino) y 1 cm de gel de apilamiento (de poro grueso). El gel de resolución presentó una composición final de 15% (m/v) de acrilamida, 0,375 M de buffer Tris-HCl pH 8,8, 0,1% (m/v) de SDS, 0,025% (m/v) de persulfato de amonio y 0,025% (m/v) de TEMED. Por su parte, el gel de apilamiento tuvo una concentración final de 5% (m/v) de acrilamida, 0,125 M de buffer Tris-HCl pH 6,8, 0,1% de SDS, 0,025% (m/v) de persulfato de amonio y 0,025% (m/v) de TEMED.

Posteriormente, se realizó el tratamiento de la muestra. Para ello, los ingredientes WPH-A y WPH-AF se prepararon en agua ultrapura a una concentración de 30 mg/mL y el WPC-80 se

preparó a 10 mg/mL. Luego, en un tubo eppendorf se mezclaron 75 μ L de muestra con 25 μ L de buffer de muestra (40% de glicerol, 0,24 M de buffer Tris-HCl pH 6,8 y 8% de SDS), 50 μ L de β -mercaptoetanol y 10 μ L de colorante azul de bromofenol (25 mg de azul de bromofenol en 10 mL de buffer Tris-HCl 0,6 M pH 6,8). La mezcla se agitó en vórtex durante 1 min, se incubó a 80°C durante 10 min y se agitó nuevamente durante 1 min. Finalmente, se centrifugó a 12.000 \times g durante 2 min utilizando una centrifuga Biofuge 28RS.

Como reactivo estándar de pesos moleculares se utilizó el marcador de proteínas *Precision Plus Protein All Blue Standards* (Bio-rad S.A., Hercules, CA, EE.UU.), que contiene diez componentes individuales con un rango de 10 a 250 kDa. Además, se emplearon dos patrones individuales de β -LG (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.) y α -LA (Agropur Cooperative, Saint-Hubert, Longueuil, Canadá), tratados de la misma manera que las muestras, utilizando 50 μ L de solución patrón a una concentración de 1 mg/mL en agua ultrapura.

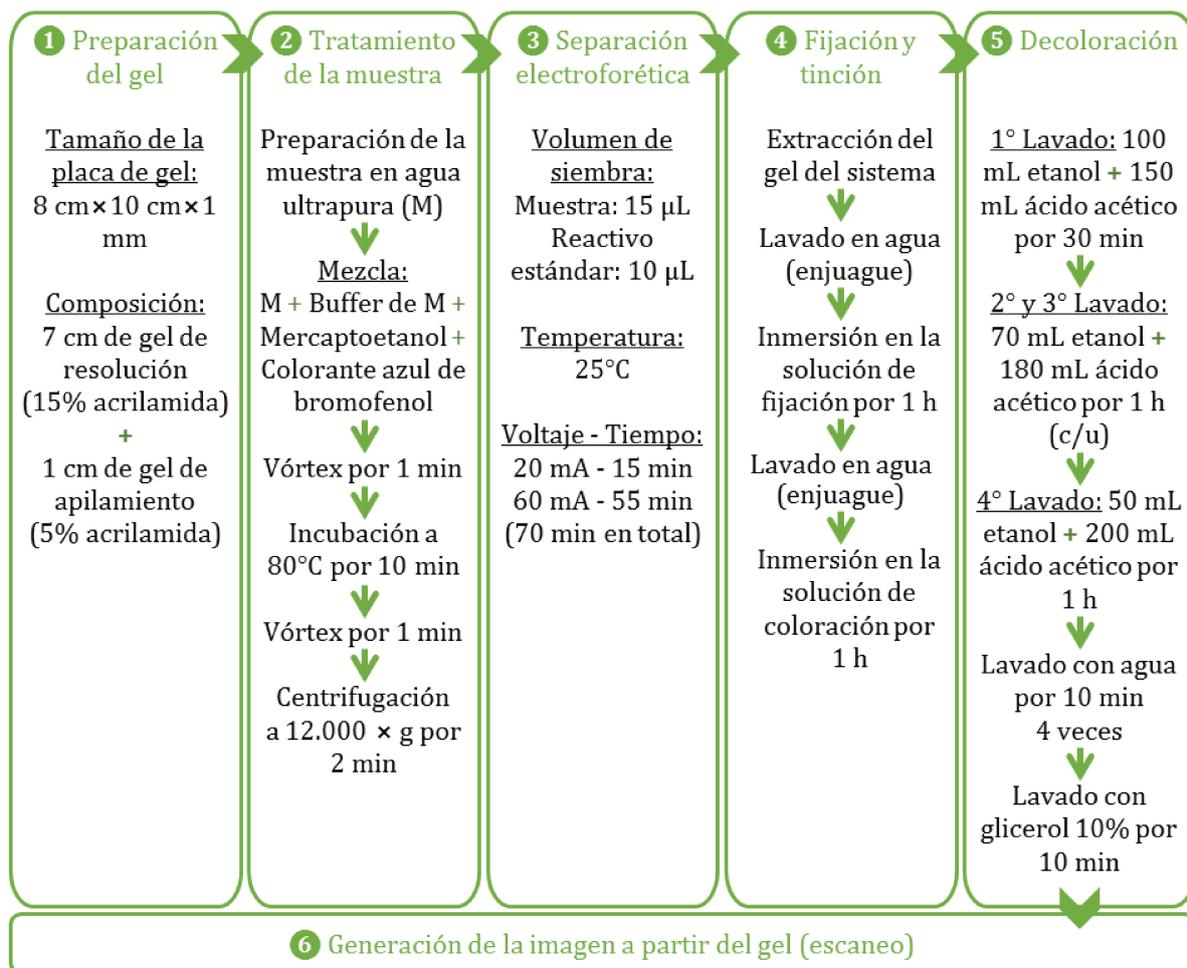


Figura 12. Etapas llevadas a cabo durante la técnica SDS-PAGE.

Para la separación electroforética propiamente dicha, el volumen de siembra fue de 15 μ L para las muestras y de 10 μ L para los reactivos estándares. Los geles se corrieron a temperatura ambiente, con una corriente constante de 20 mA durante los primeros 15 min y luego 60 mA hasta completar la corrida (70 min). Al finalizar la separación, los geles se extrajeron del sistema y se sometieron a fijación y tinción. Primero, se lavaron con agua ultrapura y se sumergieron en la solución de fijación [5% (v/v) de glutaraldehído en agua ultrapura] durante 1 h. Luego, se lavaron nuevamente con agua ultrapura y se tiñeron con una solución de Coomassie Blue R-250 al 0,5% (m/v) en etanol durante 1 h.

Seguidamente, se llevó a cabo el proceso de decoloración mediante cuatro lavados sucesivos con soluciones de ácido acético (5%) y etanol (95%). El primer lavado consistió en 100 mL de etanol y 150 mL de ácido acético durante 30 min. En el segundo y tercer lavados, se utilizaron 70 mL de etanol y 180 mL de ácido acético, con una duración de 1 h cada uno. El último lavado se realizó con 50 mL de etanol y 200 mL de ácido acético durante 1 h. Posteriormente, se efectuaron cuatro lavados adicionales con agua ultrapura, de 10 min cada uno, seguidos de un último lavado con glicerol al 10% (v/v). Finalmente, se obtuvieron imágenes digitales de los geles coloreados utilizando un escáner Epson Stylus L220 (Epson América Inc., Buenos Aires, Argentina).

❖ *Perfil peptídico*

El perfil peptídico de los ingredientes funcionales se determinó siguiendo el procedimiento descrito en la sección **3.2.A.2**. Para su análisis, las muestras liofilizadas se reconstituyeron al 7% (m/m) en agua ultrapura. En estas pruebas, se utilizó una columna analítica C₁₈ con las mismas características previamente mencionadas, pero modelo Welch Ultisil XB (Welch Materials Co., Ltd., Guangzhou, China).

❖ *Índice de hidrofobicidad*

El índice de hidrofobicidad de los ingredientes obtenidos se determinó según el procedimiento descrito en la sección **3.2.A.3**.

❖ *Perfil de aminoácidos libres*

El perfil de aminoácidos libres se evaluó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) con derivatización pre-columna empleando el agente o-ftalaldehído (OPA), siguiendo la metodología descrita por [Verdini et al. \(2002\)](#) con modificaciones. En la

Figura 13 se resumen las etapas llevadas cabo para esta determinación. Inicialmente, cada muestra se reconstituyó al 2% (m/v) en agua ultrapura y se mezcló con ácido 5-sulfosalicílico a una concentración final del ácido de 2,5% (m/v) con la finalidad de precipitar los componentes proteicos de mayor peso molecular. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a $2.110 \times g$ durante 30 min a temperatura ambiente utilizando una centrífuga Capp CRC-658 (Capp, Odense, Dinamarca), y el sobrenadante se ajustó a pH 4 con NaOH 1 M. A partir de esta fracción soluble, se determinó el contenido de aminoácidos libres mediante su derivatización con OPA.

La solución derivatizante se preparó mezclando 0,05 g de OPA con 1,25 mL de metanol. A la mezcla se le agregó 50 μL de 2-mercaptoetanol y 11,2 mL de buffer borato de sodio 0,4 M pH 9,5 y se dejó reposar durante 24 h en heladera resguardada de la luz. La reacción de derivatización se realizó mezclando 200 μL de muestra o estándar de aminoácido con 200 μL de SDS al 2% (m/v) en buffer borato de sodio 0,4 M pH 9,5 y 200 μL de solución derivatizante, dejando reaccionar durante 1 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo adicionando 400 μL de buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 4 y la solución resultante, previa a su inyección, se filtró con membrana de nylon de 0,22 μm de diámetro de poro Alltech (Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL, EE.UU.).

El análisis cromatográfico se llevó a cabo utilizando un sistema Waters (Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.) equipado con un detector de fluorescencia FL-2 (Isco, Inc., Lincoln, NE, EE.UU.). La separación cromatográfica se realizó con una columna analítica C_{18} (5 μm de tamaño de partícula, 100 \AA de tamaño de poro, dimensiones: 4,6 mm x 250 mm) modelo Microsorb-MV 100-5 C_{18} (Varian Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.) termostatzada a 40°C. Los ajustes del detector fueron los siguientes: celda de flujo de 10 μL , filtro de excitación en el rango de 305 a 395 nm, filtro de emisión en el rango de 430 a 470 nm, constante de tiempo de 0,5 s y sensibilidad de 0,2 unidades. Se utilizó una elución por gradiente empleando como fase móvil A una solución compuesta por ácido tetrahidrofurano, metanol y acetato de sodio 0,05 M pH 5,9 en las proporciones 1:19:80, respectivamente; y como fase móvil B, la mezcla 80:20 de metanol/acetato de sodio 0,05 M pH 5,9. Se mantuvo un caudal constante de fase móvil de 1,3 mL/min, empleando el gradiente de elución presentado en la **Tabla 8**.

Para cuantificar los aminoácidos presentes se construyeron las curvas de calibración de todos los aminoácidos empleando estándares de ácido glutámico (Glu), ácido aspártico (Asp), asparagina (Asn), glutamina (Gln), glicina (Gly), histidina (His), alanina (Ala), isoleucina (Ile), leucina (Leu), tirosina (Tyr), lisina (Lys), treonina (Thr), triptófano (Trp), metionina (Met), valina (Val), fenilalanina (Phe), serina (Ser) y arginina (Arg) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EE.UU.). Todos los aminoácidos se disolvieron en agua destilada a excepción de Glu, Tyr, Asp y Trp, los cuales se disolvieron en NaOH 1 M.

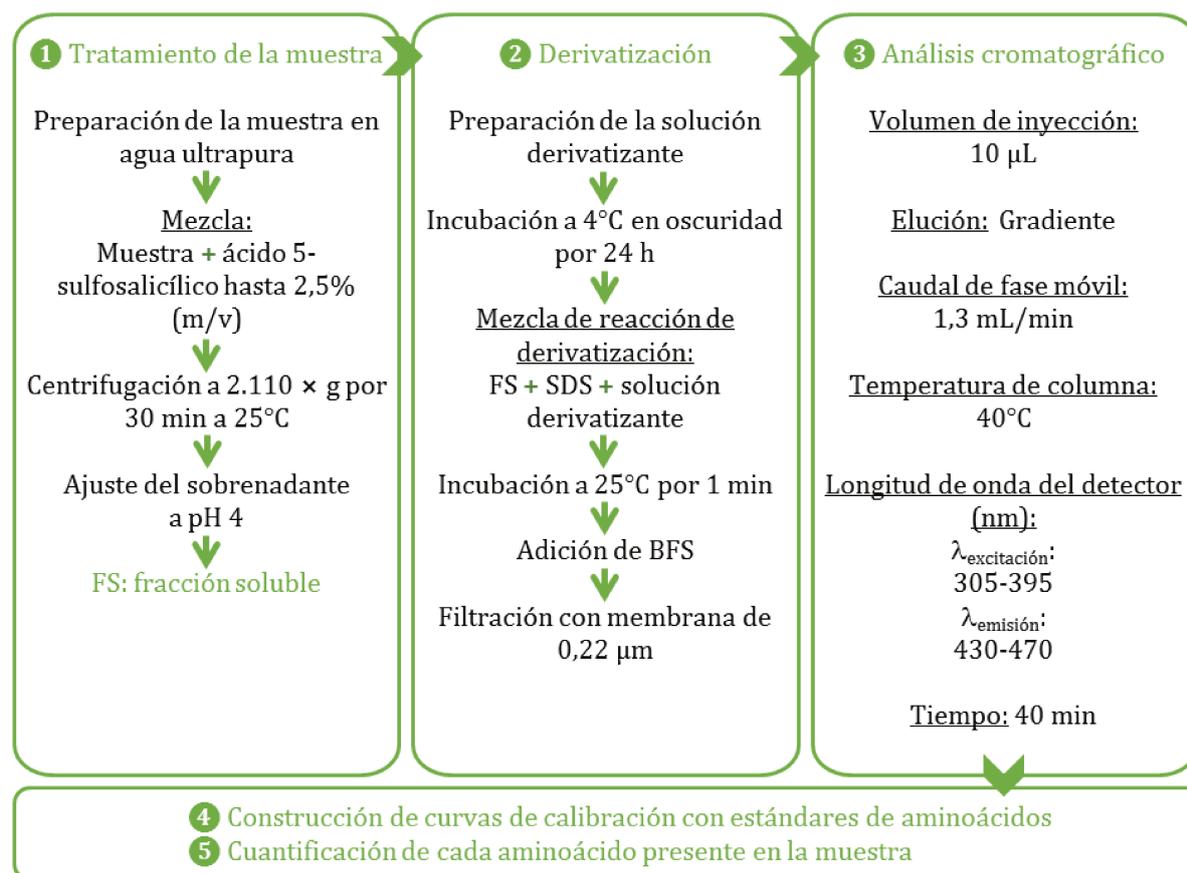


Figura 13. Etapas llevadas a cabo durante la determinación del perfil de aminoácidos libres.

Tabla 8. Gradiente de elución utilizado para la determinación del perfil de aminoácidos libres por RP-HPLC.

| Tiempo (min) | Fase móvil A (%) | Fase móvil B (%) |
|--------------|------------------|------------------|
| 0-1 | 100 | 0 |
| 1-6 | 100-86 | 0-14 |
| 6-11 | 86 | 14 |
| 11-16 | 86-50 | 14-50 |
| 16-20 | 50 | 50 |
| 20-26 | 50-25 | 50-75 |
| 26-30 | 25 | 75 |
| 30-36 | 25-0 | 75-100 |
| 36-40 | 0 | 100 |

Fase móvil A: ácido tetrahidrofurano/metanol/acetato de sodio 0,05 M pH 5,9 (1:19:80), **Fase móvil B:** metanol/acetato de sodio 0,05 M pH 5,9 (80:20).

3.2.B.2. Determinación de la composición

❖ Contenido de proteínas y humedad

El contenido de proteínas se estimó a partir del contenido de nitrógeno total determinado por el método Kjeldahl. La conversión de nitrógeno a proteína láctea se realizó aplicando un factor de conversión de 6,38. Las mediciones se llevaron a cabo según el procedimiento semiautomático Büchi Labortechnik AG (1998), utilizando un digestor automático Büchi 430 (Büchi, Flawil, Suiza), una unidad de destilación automática Büchi 322 (Büchi, Flawil, Suiza), una unidad de control Büchi 342 (Büchi, Flawil, Suiza) y un titulador automático Mettler DL22 (Mettler Instrumente AG, Greifensee, Suiza). El contenido de humedad se determinó gravimétricamente empleando un horno de secado por microondas CEM AVC80 (CEM Corporation, Matthews, NC, EE.UU.) con balanza incorporada. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

❖ Contenido de materia grasa

El contenido de materia grasa se determinó utilizando el método gravimétrico Roese-Gottlieb (AOAC, 1990). Se disolvieron 3 g de muestra en 10 mL de agua destilada. Seguidamente, se añadieron 1,5 mL de hidróxido de amonio 30%, se homogeneizó la solución y se trasvasó a una ampolla de decantación. Luego, se agregaron 10 mL de alcohol etílico absoluto y se agitó unos segundos. A continuación, se adicionaron 25 mL de éter etílico y 25 mL de éter de petróleo. La mezcla se dejó reposar hasta visualizar la separación de fases. Posteriormente, se extrajo el extracto etéreo (menos denso que la fase acuosa) y se transfirió a un balón limpio y seco. El proceso de extracción se repitió dos veces más utilizando 20 mL de éter etílico y 15 mL de éter de petróleo por extracción. Completadas las tres extracciones, las fracciones se juntaron, la mezcla de solventes se destiló y el balón se llevó a una estufa a 80°C hasta alcanzar peso constante. El contenido de materia grasa se determinó mediante la **Ecuación 8**. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

$$\text{Materia Grasa (\%)} = \frac{\text{masa balón con residuo graso (g)} - \text{masa balón (g)}}{\text{masa muestra (g)}} \times 100 \quad (8)$$

❖ *Contenido de carbono*

Se determinó el contenido de carbono empleando el equipo Vario TOC Cube Elementar (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Alemania), siguiendo la metodología descrita por Lovato (2010). Las muestras se reconstituyeron en agua ultrapura a una concentración de 0,01% (m/v). El contenido de carbono total (TC) se determinó introduciendo la muestra en un tubo de combustión con catalizador y calentándola a 800°C. El carbono presente en la muestra se transformó en CO₂, el cual fue arrastrado hacia una celda de detección mediante el suministro de aire de alta pureza (gas *carrier*) al tubo de combustión. Un detector infrarrojo no dispersivo (NDIR) generó una señal, y el área de pico obtenida se calculó mediante un procesador de datos. La concentración de TC se determinó comparando las áreas de los picos con curvas de calibración preestablecidas, utilizando estándares de 2,5, 5, 10, 20, 50 y 100 mg/mL.

El contenido de carbono inorgánico total (TIC) se determinó simultáneamente, introduciendo la muestra dentro de un reactor donde el gas *carrier* burbujea en una solución acidificada de ácido fosfórico al 25% (m/v). Sólo el carbono inorgánico (carbonatos y bicarbonatos, fundamentalmente) de la muestra se descompone para formar CO₂, el cual resultó detectado por el NDIR. Para esta determinación, se utilizó la curva de calibración de 0,25, 0,5, 1, 2 y 5 mg/mL. Finalmente, por diferencia entre TC y TIC, se determinó el carbono orgánico total (TOC). Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

❖ *Contenido de cationes*

Se determinó el contenido de los cationes de mayor interés en los ingredientes funcionales, cuantificando específicamente los iones calcio (Ca²⁺), fosfatos (PO₄³⁻), sodio (Na⁺), potasio (K⁺) y magnesio (Mg²⁺). Debido a la falta de equipamiento especializado en el laboratorio, se derivó este análisis al Laboratorio de la Cámara Arbitral de Cereales de la Bolsa de Comercio de Santa Fe. Las muestras liofilizadas se enviaron en contenedores plásticos al laboratorio para su análisis. El laboratorio utilizó espectrofotometría de absorción atómica (EAA) con un espectrómetro Perkin Elmer PinAAcle 900 H (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.). Se realizó un proceso de calcinación antes de la EAA para los análisis de calcio, magnesio y potasio, con el fin de preparar adecuadamente las muestras. Por otro lado, la determinación de iones fosfatos se llevó a cabo mediante un método colorimétrico conforme al procedimiento AOAC. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

3.2.B.3. Determinación de las propiedades funcionales

❖ Solubilidad

La solubilidad a distintos valores de pH se determinó utilizando la metodología descrita por Horax *et al.* (2017) con modificaciones. Inicialmente, las muestras se prepararon a una concentración de 8% (m/v) en agua ultrapura bajo agitación magnética. Posteriormente, el valor de pH se ajustó a 3,5, 4,5, 6,5, 7 y 8,5 mediante la adición de HCl 1 M y/o NaOH 1 M. A continuación, se centrifugó una alícuota de cada muestra a 6.000 × g durante 10 min a 25°C utilizando una centrífuga Biofuge 28RS. El contenido de nitrógeno en el sobrenadante obtenido y en la muestra sin centrifugar, se determinó empleando el método Kjeldahl como se describió en la sección 3.2.B.2. La solubilidad (S) se expresó como el porcentaje de nitrógeno soluble, conforme a la Ecuación 9. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. En la Figura 14 se resumen las etapas llevadas a cabo.

$$S(\%) = \frac{\text{Nitrógeno en sobrenadante } (\%)}{\text{Nitrógeno en muestra total } (\%)} \times 100 \quad (9)$$

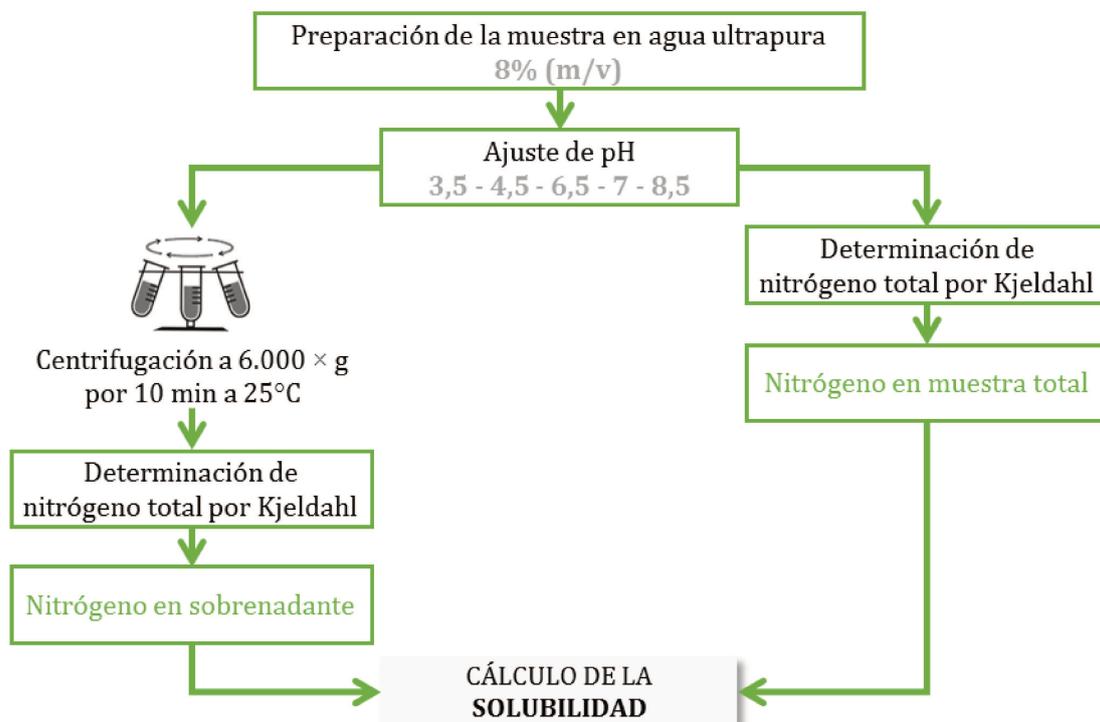


Figura 14. Determinación de la solubilidad.

❖ *Estabilidad térmica*

La estabilidad térmica se evaluó a diferentes temperaturas siguiendo la metodología descrita por Niizawa *et al.* (2021), con modificaciones, de acuerdo con la **Figura 15**. Las muestras se prepararon a concentraciones de 1%, 4% y 8% (m/v) en agua ultrapura, y el valor de pH se ajustó a 4,5, 6 y 7,5 mediante la adición de HCl 1 M y/o NaOH 1 M. Una alícuota de cada muestra se transfirió a tubos de vidrio de 0,9 cm de diámetro x 10 cm de alto con tapas de plástico, y se sometió a tratamiento térmico a 65°C, 80°C y 95°C durante 30 min. Inmediatamente, los tubos se enfriaron en un baño de agua helada durante 5 min. Luego, el pH se ajustó a 4,6 mediante la adición de HCl 1 M y/o NaOH 1 M para inducir la precipitación de las proteínas desnaturalizadas o agregadas debido al tratamiento térmico. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a $26.000 \times g$ durante 30 min a 5°C utilizando una centrífuga Biofuge 28RS.

El contenido de proteína soluble en el sobrenadante se determinó tanto en las muestras sin el tratamiento térmico como en las tratadas. Para ello, se mezclaron 50 μ L de cada sobrenadante con 1 mL de tampón de disociación (EDTA 50 mM, Urea 8 M, pH 10) y se midió la absorbancia a 280 nm. A partir de estos valores, se calculó el porcentaje de proteínas desnaturalizadas (PD) mediante la **Ecuación 10**. El índice PD se utilizó como indicador de la estabilidad térmica, donde valores altos indican una menor estabilidad térmica y viceversa. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

$$PD(\%) = \frac{Abs\ muestra - Abs\ muestra\ con\ tratamiento\ térmico}{Abs\ muestra} \times 100 \quad (10)$$

❖ *Viscosidad*

La viscosidad de los ingredientes se evaluó a diferentes concentraciones y valores de pH, utilizando la técnica propuesta por Meza *et al.* (2019) con modificaciones. Las muestras se prepararon a concentraciones de 2%, 6% y 10% (m/v) en agua ultrapura, y el valor de pH se ajustó a 4, 6 y 8 mediante la adición de HCl 1 M y/o NaOH 1 M. Las mediciones se realizaron por duplicado utilizando un viscosímetro de velocidad controlada Brookfield DV3TLVCP (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Middleboro, MA, EE.UU.) equipado con una geometría de conoplato (CPA-40Z, ángulo de 0,8° y 48 mm de diámetro). Se llevaron a cabo barridos de temperatura, midiendo la viscosidad en un rango de 20°C a 60°C con una velocidad de corte constante de 100 s^{-1} . La temperatura aumentó linealmente a una velocidad de calentamiento de $1,8 \pm 0,1^\circ C/min$. En el rango de concentración evaluado, las soluciones de WP exhiben un comportamiento newtoniano (Meza *et al.*, 2020).

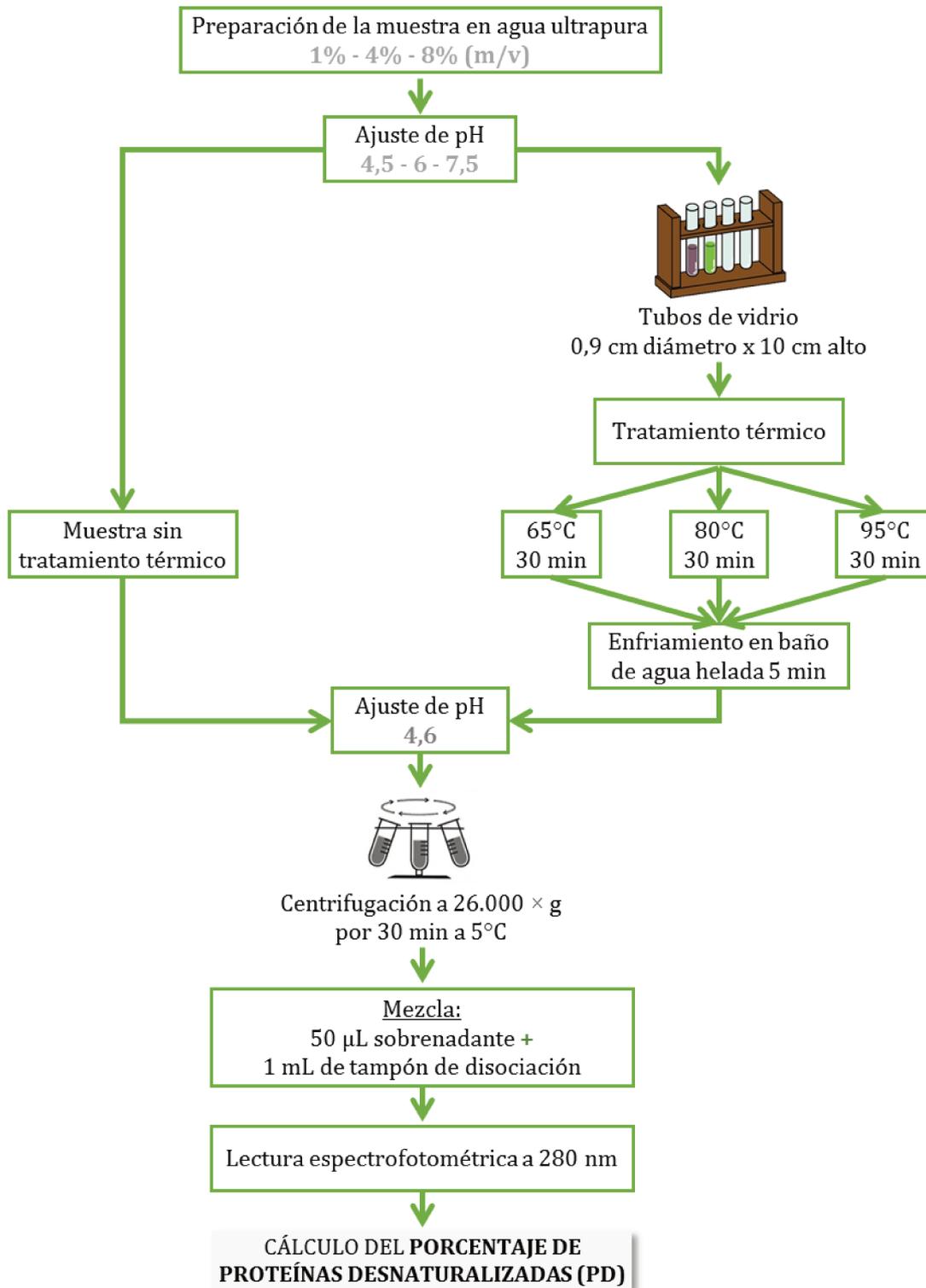


Figura 15. Determinación de la estabilidad térmica.

❖ *Capacidad de absorción de aceite*

La capacidad de absorción de aceite se determinó empleando la metodología de [Acuña & Simbaña \(2010\)](#) con modificaciones. Una masa de 0,25 g de muestra se mezcló con 1 g de aceite de girasol comestible (Cocinero, Molinos Río de la Plata S.A., Buenos, Argentina). Dichas mezclas se agitaron en vórtex a diferentes tiempos (5, 10, 15, 20, 25 y 30 min) y posteriormente se centrifugaron a $593 \times g$ durante 15 min a temperatura ambiente utilizando una centrífuga Biofuge 28RS. El sobrenadante se retiró y el aceite retenido por la muestra se determinó a partir de la **Ecuación 11**. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

$$\text{Absorción de aceite} \left(\frac{g \text{ aceite}}{g \text{ muestra}} \right) = \frac{\text{Masa pellet (g)} - \text{Masa muestra seca (g)}}{\text{Masa muestra seca (g)}} \quad (11)$$

❖ *Capacidad emulsionante*

La capacidad emulsionante, entendida como la habilidad de formar y estabilizar emulsiones, se evaluó por duplicado siguiendo la metodología de [Piornos et al. \(2015\)](#), con modificaciones, según la **Figura 16**. Las muestras se prepararon al 2% (m/v) en agua ultrapura y el pH se ajustó a 4,5, 5,5 y 6,5 mediante la adición de HCl 1 M y/o NaOH 1 M.

Determinación de la capacidad emulsionante (formación de la emulsión): se emulsionaron 5 mL de muestra con 5 mL de aceite de girasol comestible (Cocinero, Molinos Río de la Plata S.A., Buenos, Argentina) a 11.000 rpm durante 3 min utilizando un homogeneizador UltraTurrax T25 Basic. La emulsión obtenida se trasvasó a un tubo de centrífuga graduado y se centrifugó a $820 \times g$ durante 5 min a temperatura ambiente utilizando una centrífuga Capp CRC-658. La capacidad emulsionante (CE) se calculó a partir de la **Ecuación 12**.

$$CE(\%) = \frac{\text{Volumen de la capa de emulsión remanente (mL)}}{\text{Volumen total de la emulsión inicial (mL)}} \times 100 \quad (12)$$

Determinación de la estabilidad de la emulsión: la emulsión obtenida se calentó en un baño de agua a 80°C durante 30 min, se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó en las mismas condiciones descritas previamente. La estabilidad de la emulsión (EE) se determinó utilizando la **Ecuación 13**.

$$EE(\%) = \frac{\text{Volumen de la capa de emulsión remanente postcalentamiento (mL)}}{\text{Volumen total de la emulsión inicial precalentamiento (mL)}} \times 100 \quad (13)$$

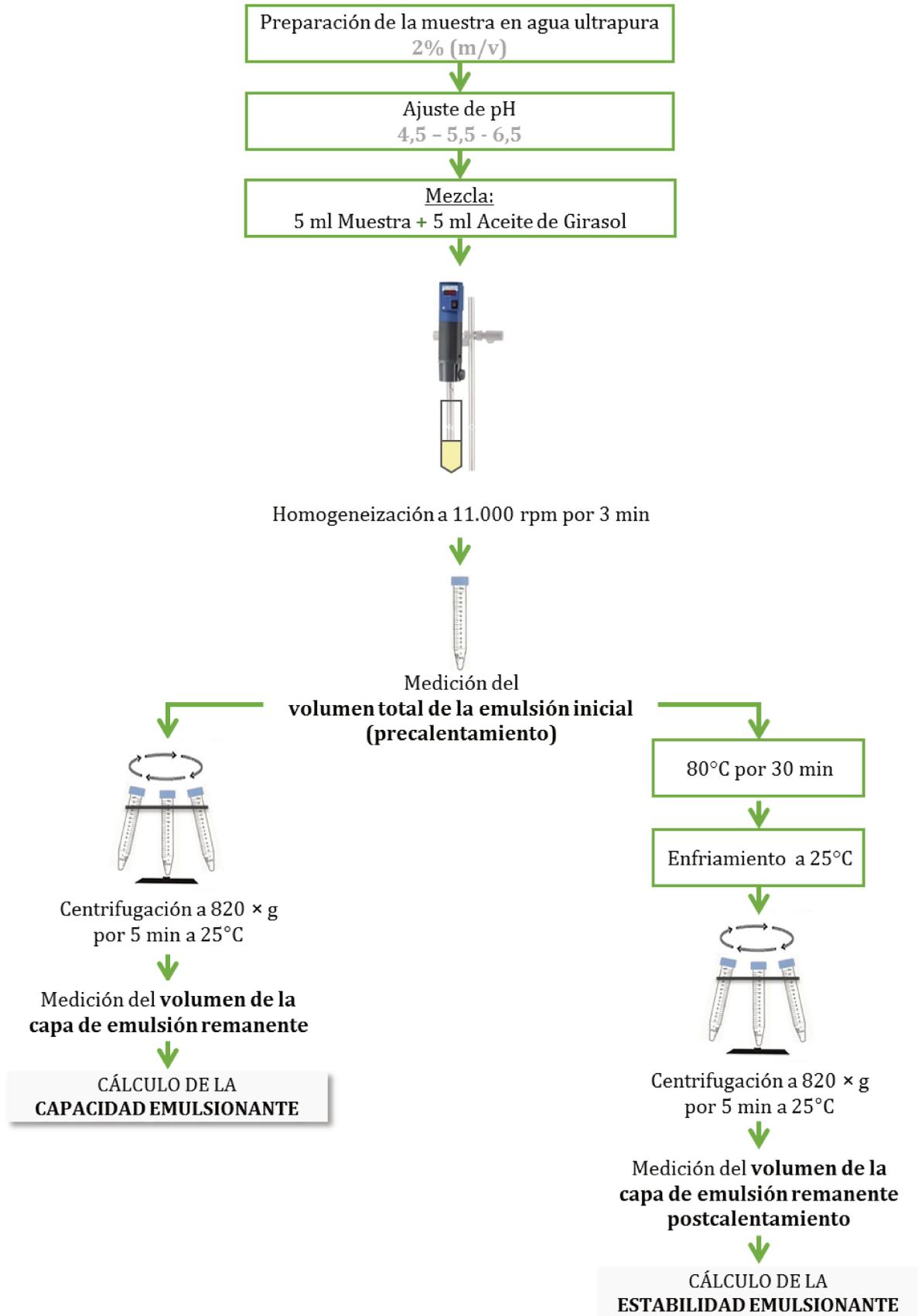


Figura 16. Determinación de la capacidad emulsionante.

❖ *Capacidad espumante*

La capacidad espumante, entendida como la habilidad de formar y estabilizar espumas, se determinó siguiendo la metodología de [Klompong et al. \(2007\)](#), con modificaciones (**Figura 17**). Las muestras se prepararon en agua ultrapura y el ajuste de pH a los valores deseados se realizó añadiendo HCl 1 M y/o NaOH 1 M. Se evaluó el efecto de la concentración con muestras a concentraciones de 2%, 6% y 10% (m/v) y a pH 6; el efecto del pH a valores de 4,5; 5,5 y 6,5 en muestras al 2% (m/v); y el efecto de la fuerza iónica mediante la adición de NaCl al 0,2%, 0,6%, 1% y 2% (m/v) en muestras preparadas al 2% (m/v) y pH 6. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Determinación de la capacidad espumante (formación de la espuma): se homogeneizaron 4 mL de muestra a 11.000 rpm durante 5 min utilizando un homogeneizador UltraTurrax T25 Basic, para promover la formación de espuma. Inmediatamente después, se retiró cuidadosamente del homogeneizador y se midió el volumen total alcanzado (V_f). La capacidad espumante (CF) se calculó como el incremento porcentual del volumen inicial (V_i) según la **Ecuación 14**.

$$CF(\%) = \frac{V_f(mL) - V_i(mL)}{V_i(mL)} \times 100 \quad (14)$$

Determinación de la estabilidad de la espuma: el volumen final alcanzado se registró a intervalos regulares: cada 1 min durante los primeros 5 min y luego cada 5 min hasta el drenaje completo. La estabilidad de la espuma se calculó como la disminución porcentual del volumen de espuma en función del tiempo, utilizando la misma ecuación.

❖ *Propiedad gelificante*

La propiedad gelificante de los ingredientes funcionales se determinó siguiendo la metodología descrita por [Ceruti et al. \(2014\)](#), con modificaciones. Las muestras se prepararon en agua ultrapura a concentraciones de 10%, 15% y 20% (m/v), ajustando el pH a 4, 6 y 8 mediante la adición de HCl 1 M y/o NaOH 1 M. Se añadieron 3 mL de cada muestra en tubos de vidrio de 0,9 cm de diámetro x 10 cm de alto, que se sumergieron en un baño de agua a 80°C durante 30 min, seguido de un enfriamiento rápido en un baño de hielo durante 5 min. Las muestras se almacenaron a 4°C y se evaluó su estado a las 2 h y 24 h después del tratamiento térmico, observando la viscosidad y la formación de gel de manera subjetiva al inclinar los tubos y evaluar la resistencia al flujo de las suspensiones. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

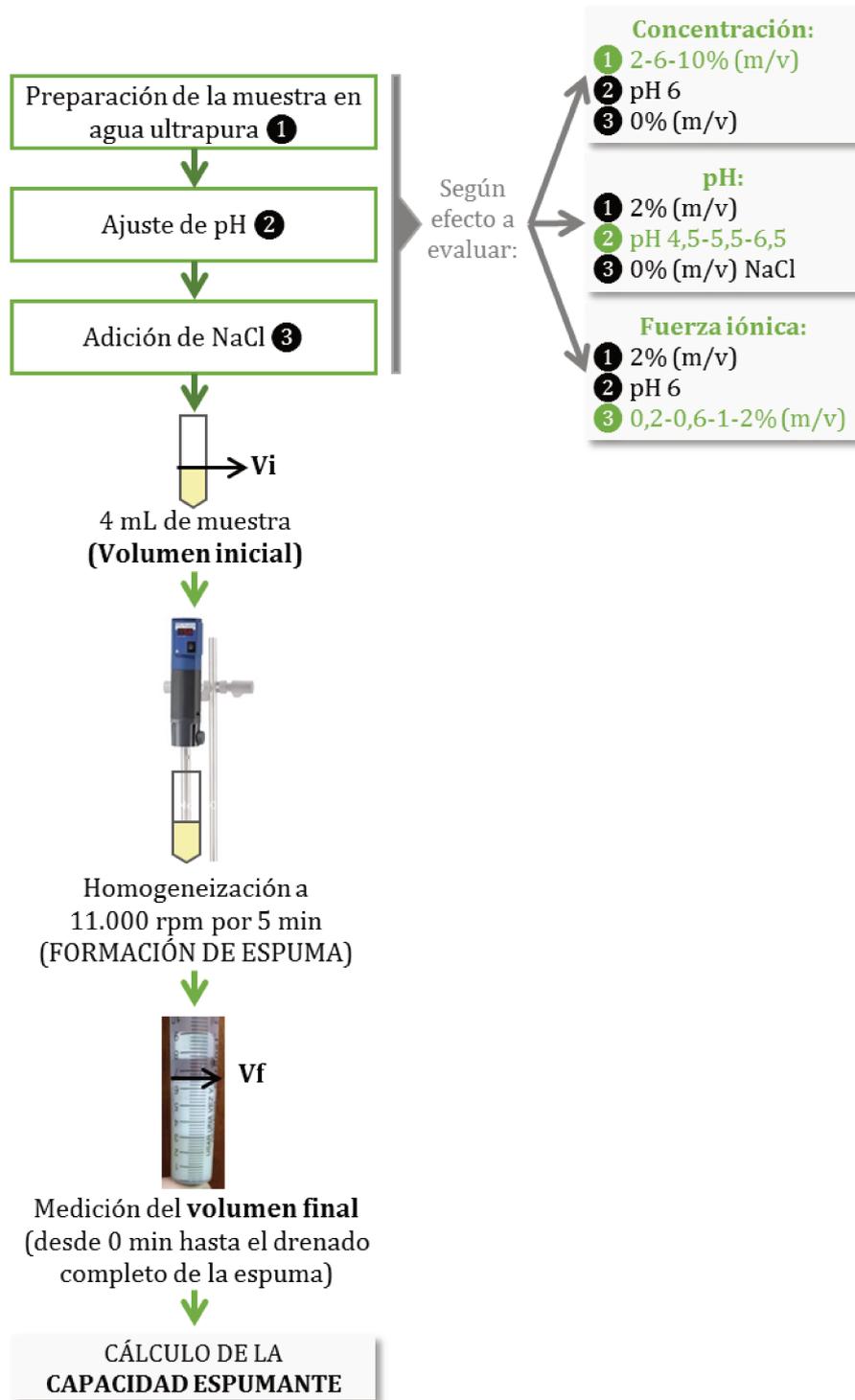


Figura 17. Determinación de la capacidad espumante.

3.2.B.4. Determinación de las propiedades bioactivas

❖ Citotoxicidad y citoprotección

Se evaluaron las propiedades de citotoxicidad y citoprotección de los ingredientes utilizando dos líneas celulares: **IEC-18** (células de epitelio intestinal de ratas) y **Caco-2/TC7** (células de carcinoma intestinal humano). Estos ensayos, realizados en el Instituto Multidisciplinario de Investigación y Transferencia Agroalimentaria y Biotecnológica (IMITAB-CONICET, Villa María, Córdoba, Argentina), son fundamentales para la caracterización de ingredientes destinados a matrices alimentarias. La evaluación de estas propiedades no solo permite determinar la seguridad de los ingredientes mediante la medición de su citotoxicidad, sino que también identifica su potencial para proteger las células del daño oxidativo, destacando así su valor en aplicaciones alimentarias y terapéuticas. La metodología empleada se basó en el protocolo propuesto por [Ballatore et al. \(2020\)](#), con modificaciones, y todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Ensayo de citotoxicidad: este ensayo es esencial para asegurar que los ingredientes no causen daño a las células, lo cual es particularmente importante para evitar efectos adversos en los consumidores y garantizar la seguridad en productos alimentarios. Para su evaluación, las células fueron expuestas a las muestras en concentraciones que oscilaron entre 0,03 y 1 mg/mL durante 24 h. La citotoxicidad se determinó midiendo la viabilidad celular mediante el método MTT. Este método se basa en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (una sal de tetrazolio amarilla) a cristales de formazán de color violeta por células metabólicamente activas ([Mosmann, 1983](#)). La reducción del MTT se midió espectrofotométricamente a 570 nm, proporcionando una indicación de la funcionalidad mitocondrial y, por ende, de la viabilidad celular. El efecto citotóxico se expresó como el porcentaje de viabilidad celular de las células tratadas en comparación con las células control (no expuestas).

Ensayo de citoprotección: permite identificar el potencial antioxidante o protector de los ingredientes, lo cual es valioso para desarrollar productos que puedan prevenir o mitigar el daño celular asociado con el estrés oxidativo y otras condiciones patológicas. Para su análisis, se evaluó el efecto protector de las muestras contra un agente inductor de estrés oxidativo, la menadiona (MEN). Las células fueron tratadas con MEN en presencia de las muestras durante 24 h. La concentración de MEN fue de 5 μ M para las células IEC-18 y de 12,5 μ M para las células Caco-2/TC7. Las concentraciones de las muestras de hidrolizados variaron de 0,125 a 1 mg/mL. La citoprotección se determinó evaluando la capacidad de las muestras para preservar la viabilidad celular frente al estrés oxidativo inducido por MEN. La viabilidad celular se midió utilizando el

método MTT, y el efecto citoprotector se expresó como el porcentaje de viabilidad celular de las células tratadas en comparación con las células control (no expuestas).

❖ *Actividad antihipertensiva*

Se evaluó la AAH según el procedimiento descrito en la sección 3.2.A.4. Se determinó el índice IC₅₀ de cada ingrediente preparado en agua ultrapura en el rango de concentración de 0,05 a 8 mg/mL. Además, se determinó el índice IC₅₀ del WPC-80 en el rango de concentración comprendido entre 25 y 200 mg/mL (en agua ultrapura). Posteriormente, se analizó el efecto del tratamiento térmico de estas muestras sobre la AAH, seleccionando diversos tratamientos térmicos utilizados habitualmente en la industria alimentaria. En este caso, los ingredientes WPH-A y WPH-AF se prepararon a una concentración de 4 mg/mL, mientras que el WPC-80 se preparó a 100 mg/mL, todos en agua ultrapura. El calentamiento a 63°C durante 30 min (pasteurización *Low Temperature Long Time* o LTLT), 72°C durante 1 min (pasteurización *High Temperature Short Time* o HTST) y 80°C durante 15 min (tratamiento de choque térmico) se denominaron tratamientos A, B y C, respectivamente.

❖ *Actividad antioxidante*

La AAO se evaluó siguiendo el procedimiento detallado en la sección 3.2.A.5. Las muestras se prepararon en agua ultrapura a concentraciones de 0,2%, 1% y 5% (m/v), y el valor de pH se ajustó a 4,5 y 6,5 mediante la adición de HCl 1 M y/o NaOH 1 M. Para el ensayo, se empleó un volumen de 2,5 µL de muestra. Además, se evaluó el efecto de los tratamientos térmicos A, B y C sobre la AAO de los ingredientes funcionales, tal como se describió para la AAH, utilizando una concentración de muestra del 5% (m/v) en agua ultrapura.

❖ *Actividad antimicrobiana*

La posible presencia de actividad antimicrobiana (AAM) en los ingredientes funcionales se determinó mediante el método de difusión en agar descrito por [Tagg & Mc Given \(1971\)](#) y modificado por [Cardoso et al. \(2012\)](#). Para ello, se utilizaron los siguientes microorganismos: *Pseudomonas aeruginosa* (P.A), *Escherichia coli* (E.C), *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (S.A), *Enterococcus faecalis* (E.F) y *Listeria monocytogenes* (L.M). Las preparaciones microbianas se obtuvieron a partir de cultivos stock conservados a -80°C, propagados mediante dos resiembras sucesivas en Caldo Nutritivo (Biokar) y observados al microscopio en gota fresca y tinción Gram,

para asegurar cultivos axénicos de cada microorganismo evaluado. Para la manipulación y resiembra diaria de las cepas, se realizaron paralelamente cultivos en tubos de ensayo con 5 mL de agar nutritivo dispuesto de forma inclinada en el tubo y almacenados a 4°C en heladera.

Para la prueba de AAM, se siguió el procedimiento detallado en la **Figura 18**. Se realizaron orificios de 7 mm de diámetro en placas que contenían 15 mL de Agar Nutritivo (Biokar, Francia), utilizando tubos de vidrios estériles. Previamente, las placas fueron inoculadas individualmente con las bacterias sensibles estudiadas antes de la solidificación del medio, logrando una concentración inicial de inóculo de $1-5 \times 10^6$ UFC/mL (volumen de siembra de suspensión de microorganismos en fase exponencial utilizada: 0,1 mL).

Las muestras se prepararon a las concentraciones de 50, 100 y 200 mg/mL en agua ultrapura y a pH de 3, 4,5, 6,5, 7,5 y 8,5. Un volumen de 0,06 mL de cada muestra se colocó en cada pocillo y las placas se dejaron reposar en flujo laminar durante 45 min para favorecer la difusión de los líquidos. Luego, se incubaron a 37°C durante 16-24 h. Finalmente, se midió el diámetro de los halos de inhibición observados. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

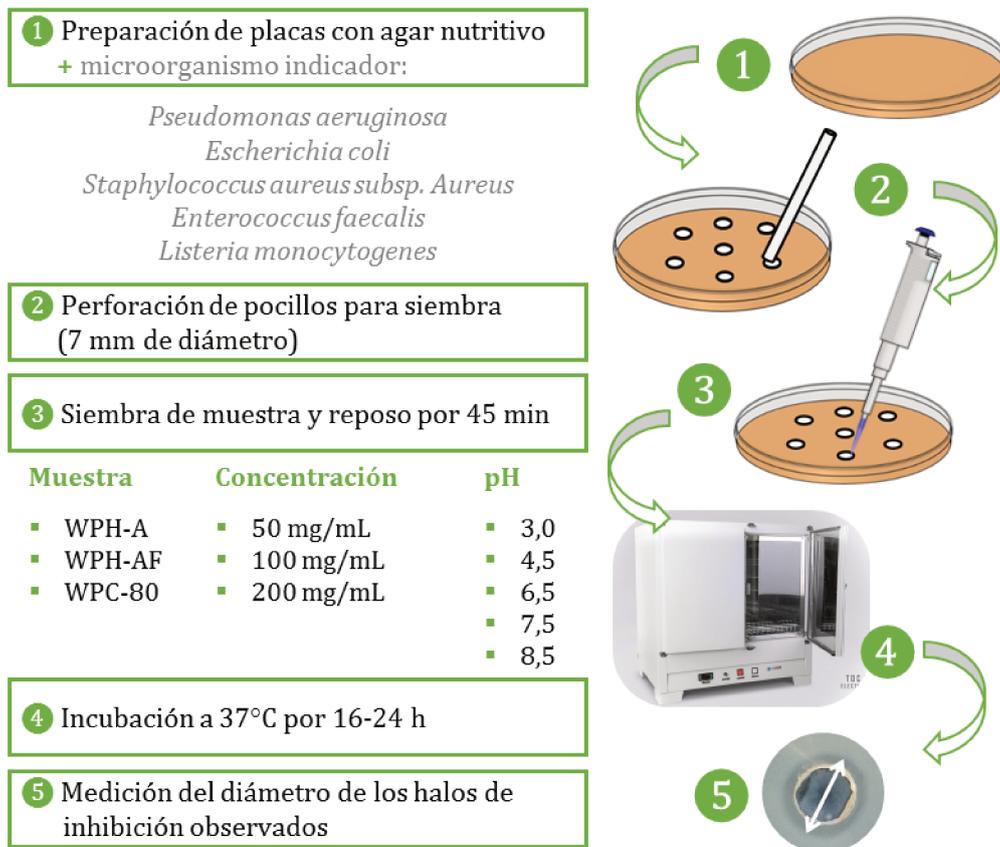


Figura 18. Procedimiento para la determinación de la actividad antimicrobiana.

❖ *Capacidad quelante de calcio*

El calcio es un nutriente esencial para el cuerpo humano, y su deficiencia puede provocar enfermedades óseas metabólicas, como el raquitismo en los niños y la osteoporosis en los adultos mayores. En este contexto, se ha propuesto el uso de péptidos quelantes de calcio como una alternativa prometedora para superar las limitaciones del calcio iónico, como su baja absorción y biodisponibilidad a bajas concentraciones. La formación de quelatos péptidos-calcio podría mejorar significativamente la absorción de calcio en el tracto gastrointestinal (Sun *et al.*, 2016). En función de ello, se estudió la capacidad quelante de calcio de los ingredientes funcionales y el impacto de los factores de la reacción de quelación que afectan la formación de estos quelatos. El análisis de esta propiedad en los hidrolizados obtenidos podría contribuir potencialmente en el tratamiento de la deficiencia de calcio en los seres humanos.

La capacidad quelante de calcio (Ca-CC), definida como el contenido de calcio (μg) unido al péptido (mg) después de la reacción de quelación, se determinó utilizando la metodología descrita por Hou *et al.* (2018) con modificaciones, de acuerdo a la **Figura 19**. En función de optimizar la Ca-CC para los péptidos presentes en WPH-A y WPH-AF, se seleccionaron tres factores influyentes, pH (X1), temperatura (X2) y la relación WPH/calcio (X3). Se empleó el método de superficie de respuesta (RSM) para evaluar cómo estas variables afectaron la Ca-CC. El RSM se aplicó mediante un diseño compuesto central (DCC), que consistió en 20 experimentos en total, 8 factoriales, 6 axiales y 6 puntos centrales (**Anexo 2**). Los valores del punto central y el rango de las tres variables independientes analizadas se detallan en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Variables independientes (pH, temperatura y relación WPH/Ca) usadas en el diseño experimental de Ca-CC.

| Variable independiente | Niveles codificados | | | | |
|------------------------|---------------------|--------|--------|---------|--------|
| | -1,682 | -1 | 0 | +1 | +1,682 |
| X1- pH | 6 | 6,8 | 8 | 9,2 | 10 |
| X2- T (°C) | 25 | 32,1 | 42,5 | 52,9 | 60 |
| X3- WPH/Ca (m/m) | 50:1 | 90,5:1 | 150: 1 | 209,5:1 | 250:1 |

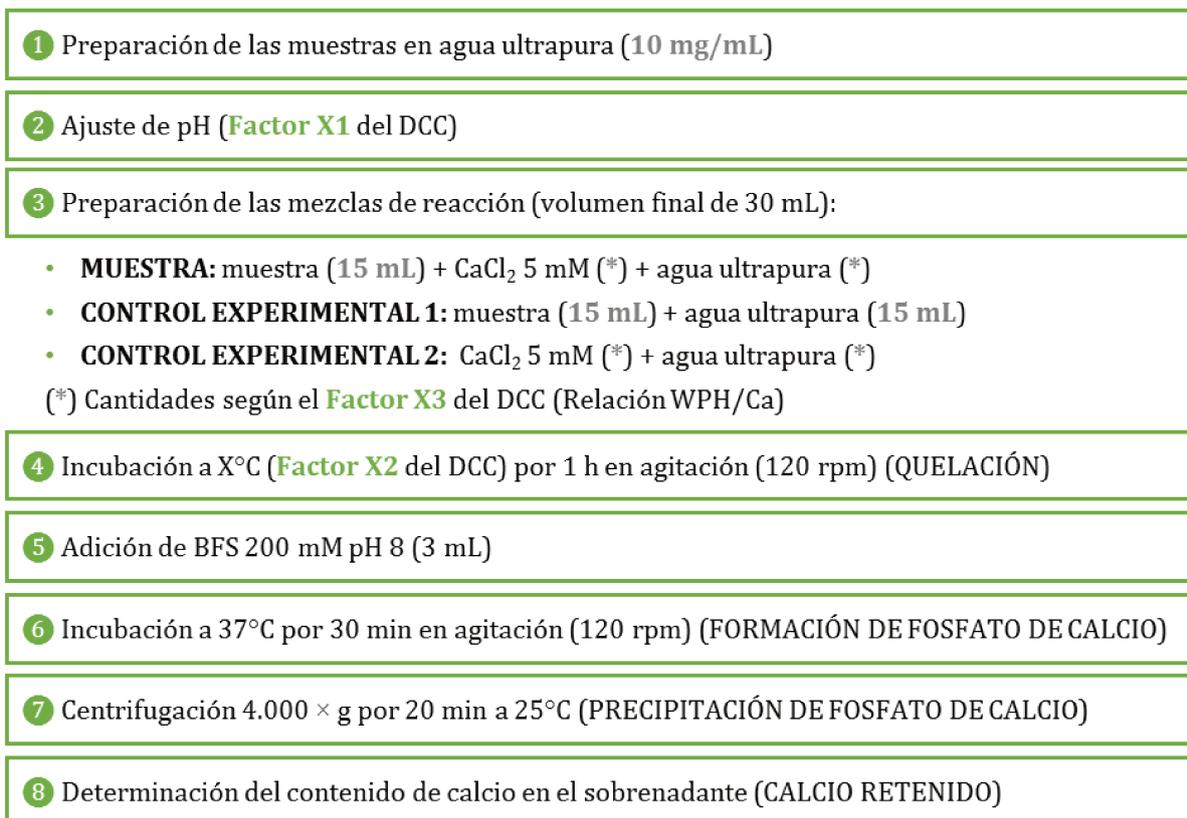


Figura 19. Procedimiento para la determinación de la capacidad quelante de calcio.

Inicialmente, las muestras se prepararon en agua ultrapura a una concentración de 10 mg/mL, ajustando los valores de pH según el DCC (Factor X1, **Tabla 9**) mediante la adición de HCl 1 M y/o NaOH 1 M. Luego, se prepararon las mezclas de reacción utilizando 15 mL de las diferentes suspensiones de WPH, junto con distintas cantidades de CaCl₂ 5 mM y agua ultrapura, hasta alcanzar un volumen final de 30 mL, ajustando así la relación WPH/calcio establecida (Factor X3, **Tabla 9**). Para el control experimental, se realizaron preparaciones sustituyendo el WPH y el CaCl₂ 5 mM por agua ultrapura. Todas las mezclas se incubaron en un baño termostático con agitación a 120 rpm durante 1 h a temperaturas específicas (Factor X2, **Tabla 9**) para promover la unión péptido-Ca. Posteriormente, se añadieron 3 mL de BFS 200 mM pH 8 y se incubaron a 37°C durante 30 min.

Finalizada la incubación, las mezclas se centrifugaron a 4000 × g durante 20 min a temperatura ambiente utilizando una centrífuga Biofuge 28RS, para precipitar las sales insolubles de fosfato de calcio. El sobrenadante se recolectó para determinar la Ca-CC del quelato, utilizando un kit comercial (Ca-color AA, Wiener lab., Rosario, Argentina) basado en el reactivo orto-cresoltaleína complexona (**Anexo 3**). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado, y los datos experimentales se ajustaron con un modelo polinomial para predecir la respuesta de la variable dependiente conforme a la **Ecuación 15**.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (15)$$

donde Y es la variable dependiente analizada (Ca-CC), β_0 es un coeficiente constante, β_i , β_{ii} y β_{ij} son los coeficientes para el efecto lineal, cuadrático y de interacción, respectivamente, y X_i y X_j son las variables independientes. La optimización de respuesta múltiple se analizó mediante el software estadístico Design-Expert versión 7.0 (Stat Ease, Inc., Minnesota, EE. UU.).

3.3. INCORPORACIÓN DE LOS INGREDIENTES EN UNA MATRIZ ALIMENTARIA

3.3.A. Formulación de postres lácteos

Se desarrollaron tres formulaciones de postres lácteos de consistencia cremosa y sabor a dulce de leche, donde se incorporó WPH-A, WPH-AF o WPC-80 en su composición según correspondiera. Además, se elaboró una formulación control sin la adición de proteínas del lactosuero o sus hidrolizados. Todas las formulaciones se prepararon a base de leche en polvo descremada (San Regim, SanCor Cooperativas Unidas Ltda., Sunchales, Argentina) a una concentración de 16% (m/m), 12% (m/m) de azúcar comercial (Ledesma, Ingenio Ledesma S.A.A.I., Jujuy, Argentina), 0,1% (m/m) de colorante caramelo provisto por Veneto S.A. (Santa Fe, Argentina) y 0,165% (m/m) de saborizante dulce de leche (Lecker, Lecker Argentina S.A., Buenos Aires, Argentina). Como espesantes se utilizaron goma guar adquirida de un comercio local y carragenina (80% κ -carragenina y 20% λ -carragenina, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EE.UU.) a las concentraciones de 0,6% (m/m) y 0,06% (m/m), respectivamente. Los ingredientes WPH-A, WPH-AF o WPC-80 se incorporaron a la concentración de 1% (m/m) y esta cantidad fue reemplazada por agua destilada en la formulación control. En todos los casos, se completó el peso total con agua destilada. La **Tabla 10** resume la composición empleada de las formulaciones de postres lácteos.

Para la preparación, se colocó la cantidad necesaria de agua destilada en un recipiente de vidrio y se añadieron los ingredientes gradualmente, mezclando con agitación magnética continua. Primero se incorporó la leche en polvo, seguido del azúcar, el WPH o WPC-80, el saborizante, el colorante y la carragenina. Finalmente, se añadió la goma guar, ya que su incorporación incrementa sustancialmente la viscosidad de la mezcla.

El proceso continuó con el filtrado de la mezcla a través de una malla metálica para eliminar los grumos no disueltos de goma guar. Luego, se calentó a 75°C durante 29 ± 7 min utilizando un baño de agua a 90°C (**Figura 20**) y aplicando agitación mecánica continua para asegurar la

completa disolución de los espesantes. A continuación, se dejó enfriar parcialmente la mezcla y se la envasó en recipientes plásticos en porciones de aproximadamente 30 g. Tras el envasado, los postres se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se colocaron las tapas y almacenaron a 4°C. Las formulaciones se obtuvieron por duplicado utilizando una escala de producción de aproximadamente 2 kg por postre lácteo producido. Los postres lácteos obtenidos se denominaron FWPH-A, FWPH-AF y FWPC-80, según el ingrediente diferencial (WPH-A, WPH-AF y WPC-80, respectivamente), mientras que la formulación control se denominó FC.



Figura 20. Equipamiento utilizado durante el calentamiento en la obtención de postres lácteos. **1:** recipiente de vidrio, **2:** baño termostático, **3:** agitador mecánico equipado con un agitador de paletas inclinadas, **4:** termocupla, **5:** temporizador.

Tabla 10. Composición de las formulaciones de postres lácteos producidas.

| Ingrediente | Concentración [% (m/m)] |
|--|--------------------------------|
| Leche en polvo descremada | 16 |
| Azúcar comercial | 12 |
| WPH-A, WPH-AF, WPC-80 o agua destilada | 1 |
| Goma guar | 0,6 |
| Carragenina | 0,06 |
| Colorante caramelo | 0,10 |
| Saborizante dulce de leche | 0,165 |
| Agua destilada | Hasta completar el 100% |

3.3.B. Análisis sensorial de las formulaciones de postres lácteos

Las formulaciones FWPH-A, FWPH-AF, FWPC-80 y FC, fueron evaluadas en el Departamento de Análisis Sensorial de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina). Las determinaciones incluyeron un Análisis Sensorial Descriptivo Cuantitativo (QDA®) y una caracterización sensorial basada en consumidores mediante pruebas de aceptabilidad e intención de compra. Dichas metodologías se describen a continuación.

3.3.B.1. Análisis Sensorial Descriptivo Cuantitativo (QDA®)

Se seleccionó un panel de 8 evaluadores, compuesto por 4 hombres y 4 mujeres, con edades comprendidas entre 25 y 45 años. Todos los evaluadores eran miembros entrenados pertenecientes al panel sensorial del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA) de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina), de acuerdo con la norma [ISO 8586 \(2023\)](#). Durante las sesiones de entrenamiento, degustaron postres lácteos comerciales y experimentales para generar vocabulario específico con el fin de definir y describir los atributos sensoriales a evaluar, es decir: color característico, brillo, sinéresis, consistencia, uniformidad de masa, filancia, suavidad, adherencia, cremosidad, gusto dulce, gusto amargo, gusto salado, sabor a “dulce de leche”, sabor a crema, sabor a polvo, sabor láctico, sabor a cocido, flavor residual y flavor global. Las definiciones de estos atributos se presentan en el **Anexo 4**.

A los 6-7 días de su elaboración, las muestras experimentales de postres lácteos codificadas con números de tres dígitos a 8°C, se entregaron aleatoriamente a los panelistas, solicitándoles que bebieran agua entre la evaluación de cada muestra para enjuagar su paladar. Las intensidades de los descriptores se puntuaron en una escala no estructurada de 10 cm de longitud anclada en

1 y 9. Posteriormente, se midió la intensidad de cada atributo en cada escala, con el fin de asignar un valor para el análisis estadístico (ANOVA de una vía con factores fijos). Las pruebas se llevaron a cabo en una sala estandarizada conforme a la norma [ISO 8589:2007/A1 \(2014\)](#).

3.3.B.2. Caracterización sensorial basada en consumidores

Se reclutaron un total de 114 consumidores a partir de la base de datos del Departamento de Análisis Sensorial de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina), en función de su consumo de postres lácteos (al menos dos veces por semana), disponibilidad e interés por participar. Los participantes tenían entre 18 y 63 años y las mujeres representaron un 62% del total. Los consumidores no recibieron ninguna información adicional sobre las muestras antes de la degustación y dieron su consentimiento informado por escrito.

Las pruebas se realizaron en un laboratorio sensorial en cabinas individuales según [ISO 8589:2007/A1 \(2014\)](#). Se controló la luz artificial, la temperatura (22°C) y la circulación del aire. Los participantes contaron con agua en todo momento para enjuagar su boca y neutralizar los sabores residuales entre la ingesta de las diferentes muestras. A los 3-4 días de su elaboración, las muestras se entregaron a los consumidores en recipientes plásticos colocados sobre una bandeja, cada uno con 30 g de los diferentes tipos de postres lácteos (8°C). Cada muestra (FWPH-A, FWPH-AF, FWPC-80 y FC) se codificó con números aleatorios de 3 dígitos. El orden en que los consumidores probaron los productos fue también aleatorio, de manera tal de lograr un correcto equilibrio en las presentaciones y minimizar cualquier sesgo sensorial. En la **Figura 21** se muestra la forma de presentación de las muestras. En el **Anexo 5**, se presenta, a modo de ejemplo, el formato de una de las planillas entregadas a los consumidores, junto al consentimiento informado.

❖ Aceptabilidad (Overall Liking)

Se pidió a los consumidores que probaran las muestras y calificaran su gusto general mediante una puntuación hedónica horizontal, donde 9 = me gusta muchísimo, 8 = me gusta mucho, 7 = me gusta, 6 = me gusta poco, 5 = me resulta indiferente, 4 = me disgusta poco, 3 = me disgusta, 2 = me disgusta mucho, y 1 = me disgusta muchísimo ([Ares et al., 2017](#)). Los anclajes verbales de la escala se seleccionaron de manera que la distancia psicológica entre puntos sucesivos de la escala sea siempre la misma ([Wichchukit & O'Mahony, 2015](#)). Finalmente, se llevó a cabo ANOVA de una vía con factor fijo para identificar diferencias significativas entre las muestras. Cuando las

diferencias fueron significativas ($p < 0,05$), las medias se compararon mediante la prueba de Tukey.

❖ *Intención de Compra*

Se les pidió a los participantes que, luego de indicar su grado de gusto sobre las muestras, mencionen cual/es producto/s comprarían. Se les explicó de manera explícita la posibilidad de poder marcar uno de ellos, dos, tres, todos o ninguno. Para evaluar la existencia de diferencias significativas entre la intención de compra de cada producto, se realizó una prueba de chi-cuadrado por celda sobre los resultados del test de independencia entre filas y columnas (tabla de contingencias) y se aplicó el test exacto de Fisher mediante el empleo del Software XLSTAT™ (Addinsoft, París, Francia).



Figura 21. Presentación de muestras en la caracterización sensorial basada en consumidores.

3.3.C. Sinéresis de las formulaciones de postres lácteos

La sinéresis de las formulaciones de postres lácteos (FWPH-A, FWPH-AF, FWPC-80 y FC) se determinó semanalmente durante los 29 días de almacenamiento (días 1, 8, 15, 22 y 29 post-elaboración), a partir de la metodología descrita por [Verbeken *et al.* \(2006\)](#) con modificaciones. Una masa conocida de cada formulación se colocó en tubos de eppendorf y se centrifugó a $6.300 \times g$ durante 30 min a 10°C utilizando una centrífuga Biofuge 28RS. El porcentaje de sinéresis se calculó como la relación entre el peso del líquido separado del postre lácteo y el peso total de la muestra antes de la centrifugación.

3.3.D. Propiedades bioactivas de las formulaciones de postres lácteos

La posible presencia en las formulaciones de postres lácteos de algunas de las propiedades bioactivas previamente determinadas en los hidrolizados, y su persistencia en el tiempo de almacenamiento, se evaluó en términos de actividad antihipertensiva y actividad antioxidante, siguiendo los protocolos detallados en las secciones **3.2.A.4.** y **3.2.A.5.** Los postres se prepararon a una concentración de 0,4 g/mL en agua ultrapura, y tanto la AAH como la AAO se midieron semanalmente en los días 1, 8, 15, 22 y 29 post-elaboración, en función de determinar la influencia de las condiciones de almacenamiento de los postres formulados sobre las mismas.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados, excluyendo aquellos provenientes del análisis sensorial anteriormente mencionados, se llevó a cabo mediante análisis de varianza (ANOVA), ya sea unidimensional o multifactorial, según del tipo de estudio realizado. Cuando se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$), se realizó una comparación múltiple de medias utilizando la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD). Para el análisis estadístico se utilizó el software Statgraphics® Centurion versión XVI (Statgraphics Inc, Rockville, MD, EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EXPERIENCIAS PRELIMINARES DE OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE WPHS

4.1.A. Obtención de hidrolizados

Las experiencias preliminares de hidrólisis enzimática se llevaron a cabo en dos etapas, y los productos generados en cada una se presentan en la **Figura 22**. En la **Etapa I**, se obtuvieron diferentes WPHs utilizando ALC y FLA de manera individual, variando la concentración de sustrato y el pH de reacción, tal como se detalló en la **Tabla 4** (sección **3.1.B.**). El objetivo de esta etapa fue examinar el comportamiento de los preparados enzimáticos frente al sustrato, considerando estas variables.

La bibliografía específica sobre la hidrólisis enzimática de WPC o WPI indica que las concentraciones proteicas utilizadas suelen oscilar entre el 3% y el 10% (m/v) (Severin & Xia, 2006; Sinha *et al.*, 2007; da Costa *et al.*, 2007; Dryáková *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2010; Adjonu *et al.*, 2013; O'Keeffe & FitzGerald, 2014; Mann *et al.*, 2015). Con base en esta información, en el presente estudio se estableció un rango de concentración de proteínas entre el 1% y el 12% (m/v).

El pH de reacción se seleccionó en función del rango óptimo de actividad de cada proteasa. El preparado enzimático ALC suele utilizarse en un rango de pH entre 7 y 9 (Severin & Xia, 2006; da Costa *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2010; Nchienzia *et al.*, 2010; O'Keeffe & FitzGerald, 2014; Kimatu *et al.*, 2017; Justus *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2020), mientras que FLA se emplea principalmente a pH 7 (Klompong *et al.*, 2007; Cumby *et al.*, 2008; Nchienzia *et al.*, 2010; Dryáková *et al.*, 2010; O'Keeffe & FitzGerald, 2014; Kimatu *et al.*, 2017; Justus *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2020). Para facilitar la comparación entre ambas enzimas y evaluar la posibilidad de establecer un pH común que permita su combinación sin necesidad de ajustes adicionales, se seleccionaron los valores de pH 7, 8 y 9 para ambos preparados enzimáticos.

En cuanto a la temperatura de hidrólisis, la bibliografía indica valores entre 40°C y 50°C para FLA, y entre 50°C y 65°C para ALC, aunque la mayoría de los estudios emplean 50°C (Severin & Xia, 2006; Chang *et al.*, 2007; Cumby *et al.*, 2008; Nchienzia *et al.*, 2010; O'Keeffe & FitzGerald, 2014; Ambigaipalan *et al.*, 2015; Kimatu *et al.*, 2017; Chirinos *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2020). En función de ello y de manera tal de acotar el número de variables en esta fase preliminar, en este estudio se optó por trabajar a 50°C en todas las reacciones de hidrólisis.

El tiempo de reacción se estableció en 180 min para todas las experiencias preliminares, manteniendo constantes el pH y la temperatura, así como la agitación continua durante todo el proceso. Al finalizar, las enzimas fueron inactivadas térmicamente mediante la incubación de las

mezclas en un baño termostático a 80°C durante 20 min, excepto en los WPHs FLA obtenidos a pH 9 donde el tiempo de inactivación se redujo a 10 min. Esta modificación se implementó debido a cambios en la viscosidad observados luego de 20 min de tratamiento térmico. Dichos cambios podrían estar relacionados con el menor grado de hidrólisis alcanzado con esta enzima, en estos casos (DH < 6%), sugiriendo que las proteínas no hidrolizadas o parcialmente hidrolizadas podrían haber experimentado cierto grado de desnaturalización térmica. La estructura y la solubilidad de las proteínas del suero están influenciadas por factores como la temperatura, el pH y la composición (deWit & Klarenbeek, 1984). Al calentarse, estas proteínas tienden a desnaturalizarse y agregarse, lo que puede dar lugar a la formación de un gel dependiendo de las condiciones fisicoquímicas (Sağlam *et al.*, 2013). Los tratamientos térmicos pueden afectar de manera reversible o irreversible la estructura y propiedades de las proteínas del suero. Temperaturas de hasta 60°C, suelen provocar cambios reversibles que pueden influir en el comportamiento de asociación o disociación de algunas proteínas del suero. Estos cambios se atribuyen comúnmente a transiciones conformacionales previas a la desnaturalización, causadas tanto por una pérdida parcial de la estructura tridimensional de la proteína como por alteraciones en su hidratación (deWit & Klarenbeek, 1984).

En la **Etapa II**, los WPHs se obtuvieron a partir de soluciones de WPC-80 al 8% (m/v) de proteínas, variando la relación E/S (**Tabla 4**, sección **3.1.B.**). El pH de reacción se ajustó a 8 para FLA y a 9 para ALC, en función de la mayor actividad enzimática observada en la etapa previa. Respecto a la inactivación enzimática, en los WPHs FLA obtenidos con una relación E/S del 4% (m/m) de proteínas, también se aplicó la excepción de reducir el tiempo del tratamiento térmico a 10 min. Esta decisión se basó en observaciones previas que indicaron un aumento de la viscosidad en muestras con bajo DH cuando se aplicaba un tratamiento térmico de 80°C durante 20 min.

Durante todas estas experiencias, se prepararon controles de proteínas de suero sin hidrolizar (CSHs) a partir de soluciones de WPC-80 al 1%, 6% y 10% (m/v) de proteínas, ajustadas a pH 7, 8 y 9. Así, se incluyó una concentración baja, intermedia y alta para cada pH evaluado. Además, se utilizaron soluciones de WPC-80 al 8% (m/v) de proteínas a pH 8 y 9, replicando las condiciones de concentración de sustrato y pH empleadas en la variación de la relación E/S. Estas soluciones fueron expuestas a 50°C durante 180 min, con agitación continua y pH constante, siguiendo el mismo procedimiento utilizado en el proceso de hidrólisis enzimática. Al finalizar, se omitió la etapa de inactivación enzimática debido a la ausencia de ALC y FLA.

Los CSHs se caracterizaron de la misma manera que los WPHs para evaluar el impacto del proceso de hidrólisis enzimática. Durante la reconstitución de los polvos de CSHs, se observaron dificultades en la disolución, con la presencia de material no disuelto. Este fenómeno podría estar

asociado con el calentamiento aplicado (50°C durante 180 min) en su obtención, que pudo haber afectado de forma irreversible la estructura de algunas de las proteínas del suero, provocando alteraciones en su solubilidad. En consecuencia, se decidió utilizar WPC-80 como control en la etapa posterior que luego mencionaremos como *caracterización de los ingredientes funcionales* (sección 4.2.B.).

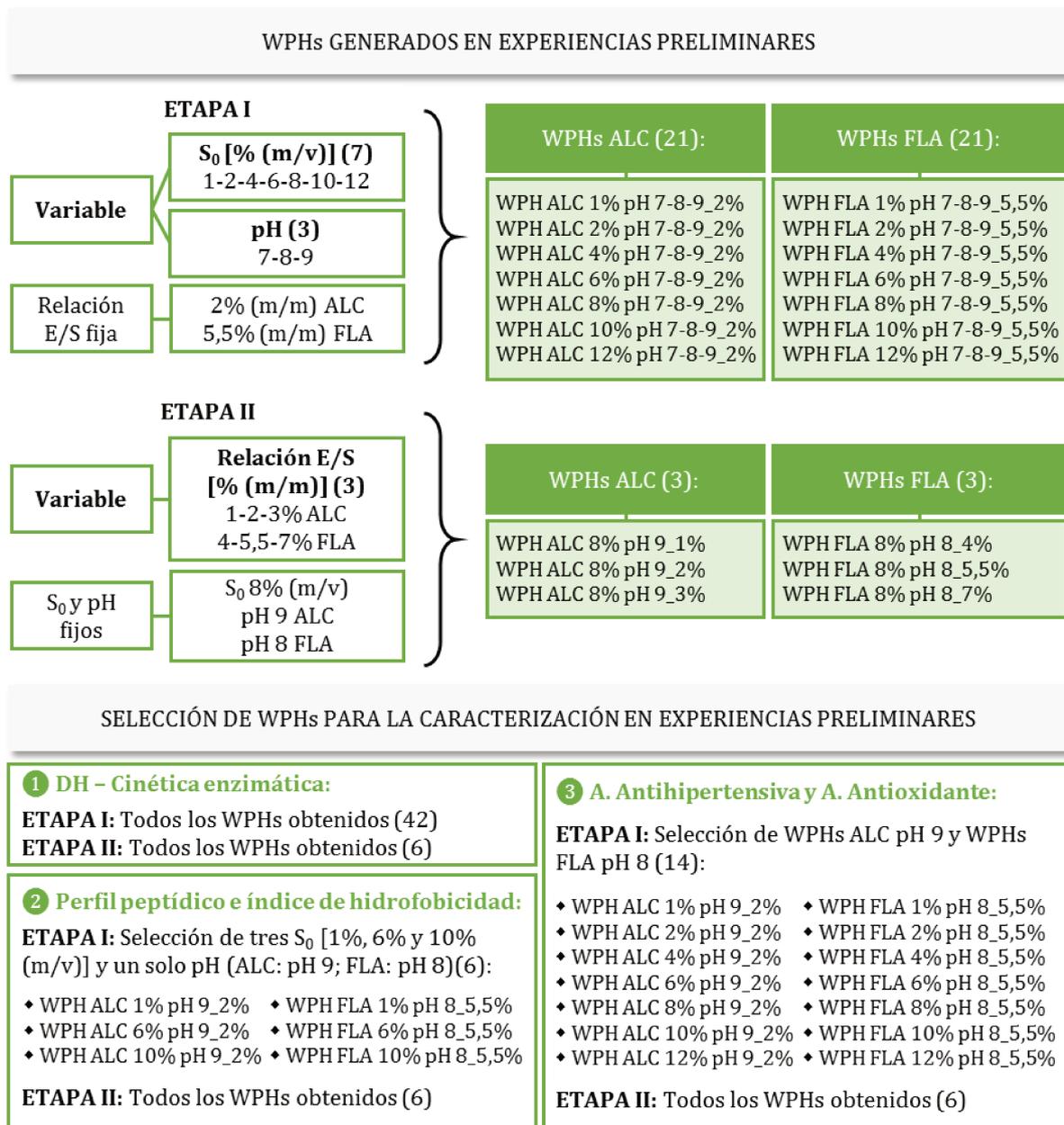


Figura 22. Hidrolizados de proteínas de suero generados en experiencias preliminares de hidrólisis enzimática y selección de los mismos para su caracterización.

4.1.B. Caracterización de hidrolizados

Los hidrolizados de proteínas de suero obtenidos en las experiencias preliminares de hidrólisis enzimática fueron seleccionados para su posterior caracterización. Los ensayos realizados incluyeron la determinación del grado de hidrólisis, el estudio de la cinética enzimática, el análisis del perfil peptídico y del índice de hidrofobicidad, así como la evaluación de bioactividades, específicamente actividad antihipertensiva y antioxidante. En la **Figura 22** se detallan los WPHs evaluados en cada caso.

En esta primera etapa del trabajo de Tesis, que abarca tanto la obtención como la caracterización preliminar de los WPHs, se obtuvieron datos relevantes sobre los preparados enzimáticos utilizados y las propiedades de los hidrolizados generados. Estos resultados permitieron seleccionar las condiciones de trabajo más adecuadas y sacar conclusiones parciales orientadas a la obtención de potenciales ingredientes funcionales propiamente dichos.

4.1.B.1. Grado de hidrólisis y cinética de hidrólisis enzimática

❖ Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (DH) se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos durante el proceso de hidrólisis. Este indicador es de gran importancia, ya que determina las características del producto final, en particular la longitud de la cadena peptídica, lo que a su vez influye en la funcionalidad de los péptidos generados y en las características fisicoquímicas de los hidrolizados (Dullius *et al.*, 2018). En este trabajo, el DH se monitoreó a lo largo de las reacciones enzimáticas mediante el método *pH-stat* (sección 3.2.A.1.). Las curvas de progresión del DH obtenidas en la **Etapa I**, donde se evaluó el efecto del pH de reacción y de la concentración de sustrato, se presentan en las **Figuras 23** (WPHs ALC) y **24** (WPHs FLA), mientras que en la **Tabla 11** se detallan los valores finales de DH alcanzados a los 180 min de reacción.

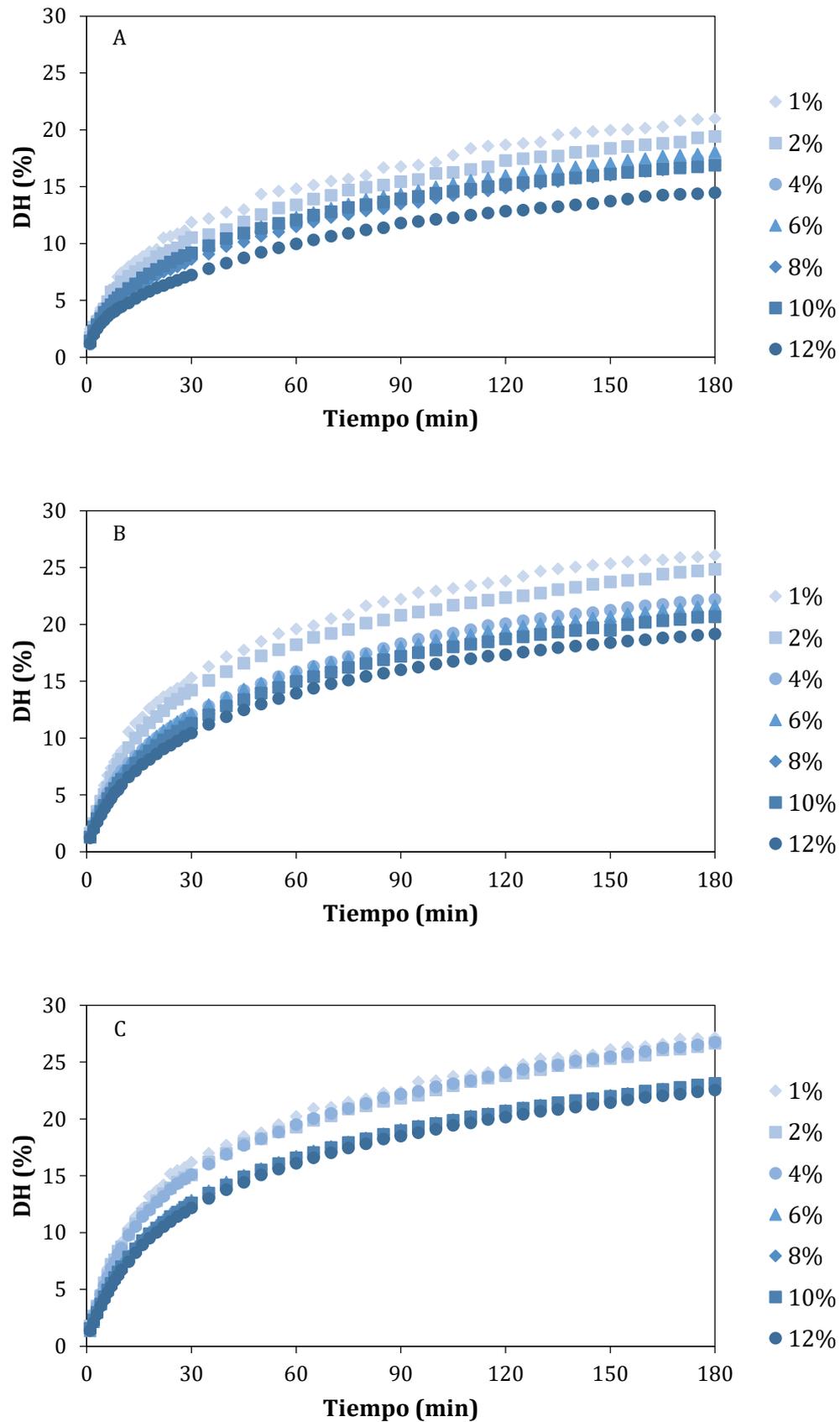


Figura 23. Curvas promedio de progresión del DH (%) alcanzado por los WPHs ALC, en función de la concentración de sustrato [% (m/v) de proteínas] y del pH de reacción, con una relación E/S fija de 2% (m/m) de proteínas. (A) pH 7. (B) pH 8. (C) pH 9.

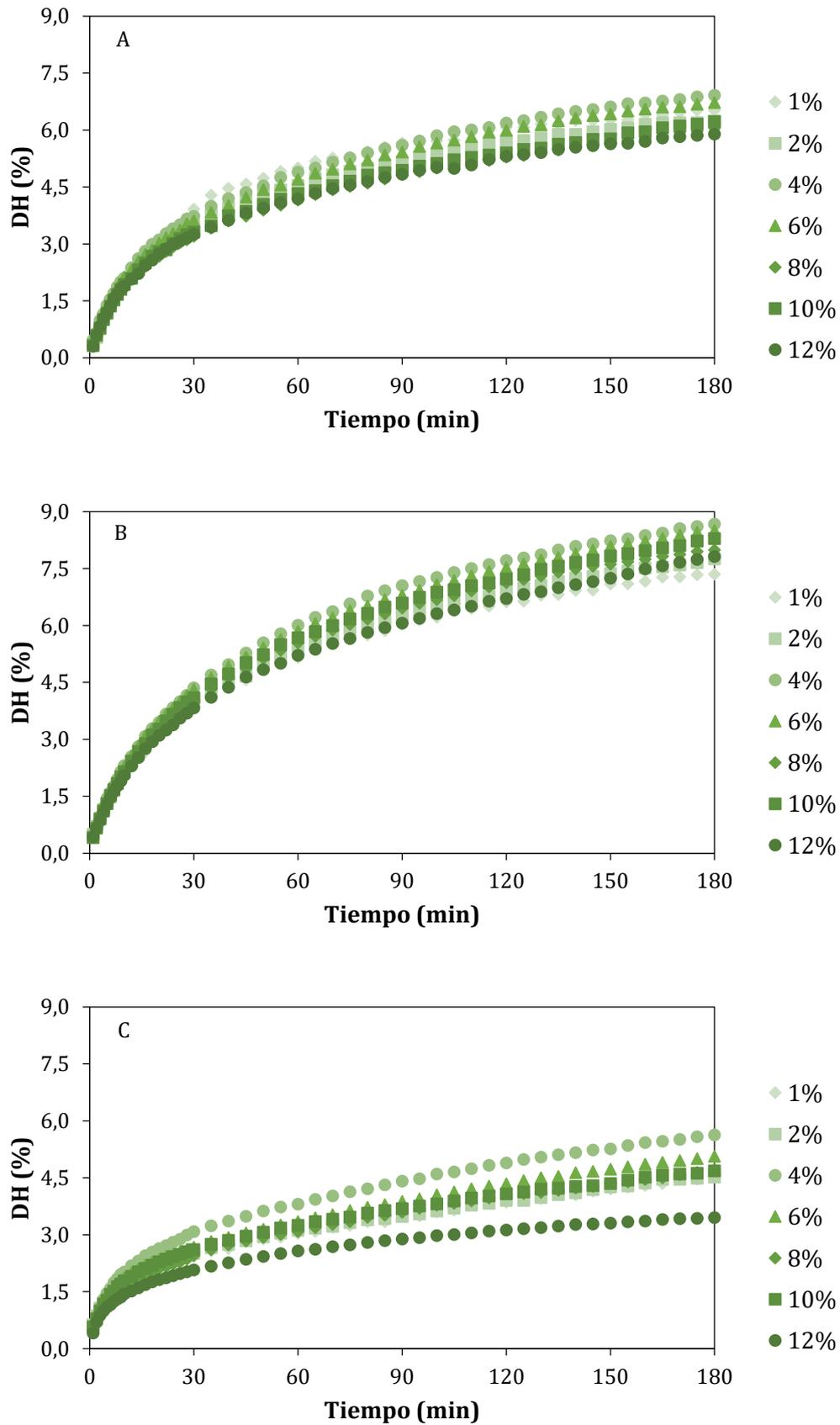


Figura 24. Curvas promedio de progresión del DH (%) alcanzado por los WPHs FLA, en función de la concentración de sustrato [% (m/v) de proteínas] y del pH de reacción, con una relación E/S fija de 5,5% (m/m) de proteínas. (A) pH 7. (B) pH 8. (C) pH 9.

Tabla 11. Valores promedio y desviación estándar correspondientes al DH alcanzado por los hidrolizados tras 180 min de reacción, en función del pH de reacción y de la concentración de sustrato [S_0 , % (m/v) de proteínas], con una relación E/S fija de 2% y 5,5% (m/m) de proteínas para ALC y FLA, respectivamente.

| pH | S_0 [% (m/v)] | DH (%) | |
|-----------------------|-----------------|----------------------------|---------------------------|
| | | WPHs ALC | WPHs FLA |
| 7 | 1 | 20,99 ± 0,17 ^e | 6,52 ± 0,10 ^{fg} |
| | 2 | 19,42 ± 0,87 ^d | 6,24 ± 0,06 ^{ef} |
| | 4 | 17,42 ± 0,23 ^{bc} | 6,92 ± 0,10 ^g |
| | 6 | 18,06 ± 0,63 ^c | 6,72 ± 0,01 ^g |
| | 8 | 16,90 ± 0,16 ^b | 6,05 ± 0,05 ^e |
| | 10 | 16,88 ± 0,19 ^b | 6,22 ± 0,01 ^{ef} |
| | 12 | 14,48 ± 0,42 ^a | 5,89 ± 0,32 ^{de} |
| 8 | 1 | 26,07 ± 0,09 ⁱ | 7,35 ± 0,00 ^h |
| | 2 | 24,85 ± 0,37 ^h | 7,75 ± 0,04 ^{hi} |
| | 4 | 22,20 ± 0,69 ^{fg} | 8,67 ± 0,03 ^k |
| | 6 | 21,65 ± 0,03 ^{ef} | 8,50 ± 0,02 ^k |
| | 8 | 20,88 ± 0,63 ^e | 7,99 ± 0,20 ^{ij} |
| | 10 | 20,68 ± 0,42 ^e | 8,29 ± 0,11 ^{jk} |
| | 12 | 19,15 ± 0,70 ^d | 7,82 ± 0,51 ⁱ |
| 9 | 1 | 27,15 ± 0,36 ^j | 4,55 ± 0,14 ^b |
| | 2 | 26,66 ± 0,57 ^{ij} | 4,51 ± 0,01 ^b |
| | 4 | 26,73 ± 0,85 ^{ij} | 5,63 ± 0,07 ^d |
| | 6 | 23,13 ± 0,60 ^g | 5,06 ± 0,30 ^c |
| | 8 | 23,15 ± 0,33 ^g | 4,72 ± 0,11 ^{bc} |
| | 10 | 23,13 ± 0,44 ^g | 4,68 ± 0,08 ^{bc} |
| | 12 | 22,55 ± 0,25 ^{fg} | 3,45 ± 0,47 ^a |
| pH | | S | S |
| S_0 | | S | S |
| Interacción pH- S_0 | | S | S |

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. S: Efecto significativo ($p < 0,05$). ^{a-k} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Respecto a las preparaciones enzimáticas, los WPHs FLA presentaron valores de DH significativamente menores, con un rango de $3,45 \pm 0,47\%$ a $8,67 \pm 0,03\%$, mientras que los WPHs ALC alcanzaron valores más altos, entre $14,48 \pm 0,42\%$ y $27,15 \pm 0,36\%$. Estos resultados concuerdan con los reportados por [Zhang et al. \(2013\)](#), [Mann et al. \(2015\)](#) y [da Rosa et al. \(2018\)](#), quienes obtuvieron valores de DH similares para sus WPHs (empleando las mismas

preparaciones enzimáticas). El mayor DH alcanzado con el uso de ALC en comparación con FLA también se informó en hidrolizados de diversas fuentes proteicas, como carne de jurel de rayas amarillas (*Selaroides leptolepis*) (Klompong *et al.*, 2007), canola (Cumby *et al.*, 2008), harina de ave (Nchienzia *et al.*, 2010), torta de sésamo (Demirhan *et al.*, 2011), harina de gluten de maíz (Jin *et al.*, 2016), hongos comestibles (*Agaricus bisporus*) (Kimatu *et al.*, 2017) y okara (Justus *et al.*, 2019). Estas diferencias pueden atribuirse a las diferentes acciones catalíticas y la especificidad de cada formulación enzimática respecto a la cadena proteica. ALC es una endopeptidasa caracterizada por su amplia especificidad y baja selectividad en la hidrólisis de enlaces peptídicos. Por otro lado, FLA es una mezcla enzimática más compleja compuesta por amino-, dipeptidil- y endopeptidasas, que confieren una acción más selectiva (Merz *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2019). De este modo, ALC rompe los enlaces peptídicos de manera más amplia y eficiente, lo que da lugar a una hidrólisis mayor. En cambio, FLA se dirige principalmente a los enlaces peptídicos terminales, lo que resulta en un DH más bajo (Rezvankhah *et al.*, 2021).

En cuanto al pH de reacción, el efecto sobre el DH fue diferente según la enzima utilizada (Tabla 11). Para los WPHs FLA, los valores más altos de DH se alcanzaron a pH 8, seguido de pH 7 y pH 9, respectivamente; mientras que para los WPHs ALC, los valores más altos de DH se lograron a pH 9, valores intermedios a pH 8 y los más bajos a pH 7 (Figura 25). Los cambios en el pH pueden modificar tanto la estructura del sustrato como la de la enzima, afectando la accesibilidad de la proteasa a los enlaces peptídicos específicos (Apar & Özbek, 2008).

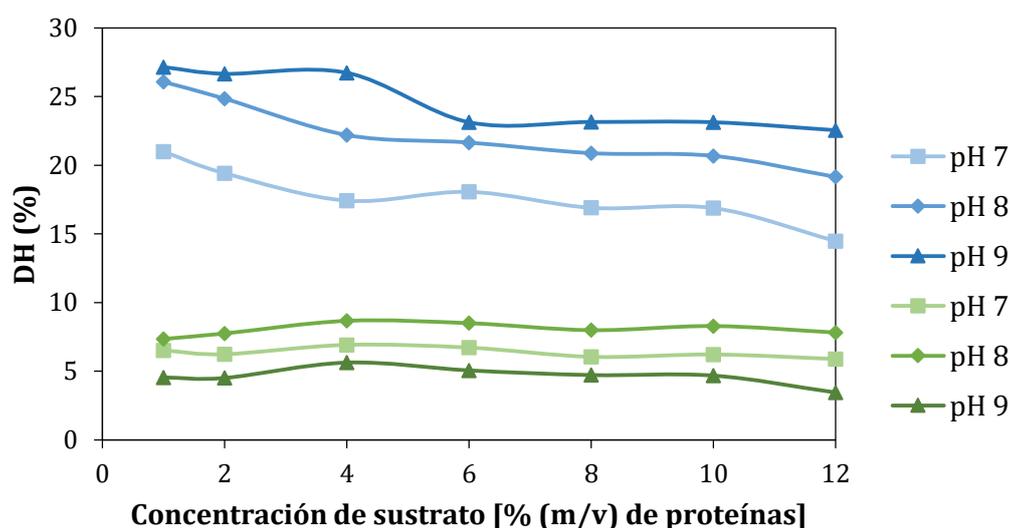


Figura 25. Efecto de la concentración de sustrato y del pH de reacción sobre el DH (%) alcanzado por los WPHs ALC (tonos azules) y los WPHs FLA (tonos verdes) tras 180 min de reacción.

La variación de la concentración de sustrato a una cantidad de enzima constante, influye significativamente en el DH máximo alcanzado por diversas proteasas (Deng *et al.*, 2018). En la hidrólisis de WPC-80 con dos proteasas diferentes, los valores de DH variaron según la concentración proteica del sustrato (**Tabla 11**). En los WPHs ALC, el DH disminuyó a medida que aumentó la concentración de proteína (**Figura 23 y 25**), comportamiento que también fue observado por Butré *et al.* (2012) en la hidrólisis de WPI utilizando ALC. Por el contrario, en los WPHs FLA, se registraron valores más altos de DH a concentraciones intermedias de 4% y 6% (m/v) de proteínas, mientras que a concentraciones inferiores y superiores se observó una disminución del DH (**Figura 24 y 25**). En la hidrólisis de α -LA, Deng *et al.* (2018) encontraron que el efecto de la concentración de sustrato sobre el DH dependía de la enzima utilizada. En sus experimentos, el uso de tripsina bovina y porcina, así como α -quimotripsina bovina, resultó en un aumento de los valores de DH con el incremento de la concentración de sustrato, mientras que la proteasa de *B. licheniformis* produjo un DH más bajo. En contraste, la hidrólisis con tripsina humana no fue sensible a los cambios en la concentración de sustrato. Asimismo, el uso de ALC en la hidrólisis de proteína de colza (Chabanon *et al.*, 2007), torta de sésamo (Demirhan *et al.*, 2011), grano de sorgo dulce (Wu *et al.*, 2016) y aislado de proteína de nuez pecan (Hu *et al.*, 2018), también resultó en una disminución de los valores de DH con el aumento de la concentración. Esta observación sugiere que el sustrato puede estar involucrado en la desactivación enzimática (por fenómenos inhibitorios de ciertos componentes presentes en tales matrices, principalmente) y que la cantidad de enlaces hidrolizables no es el factor clave que controla la tasa de hidrólisis (González-Tello *et al.*, 1994).

Por otro lado, las curvas de progresión del DH obtenidas en la **Etapa II**, donde se evaluó la variación de la relación enzima/sustrato, se muestran en la **Figura 26**, mientras que los valores finales de DH alcanzados por los WPHs tras 180 min de reacción se detallan en la **Tabla 12**. La relación enzima/sustrato también mostró una influencia significativa sobre el grado de hidrólisis, con un aumento del DH en función de su incremento. En los WPHs ALC, el DH aumentó de $21,53 \pm 1,07\%$ a $23,15 \pm 0,33\%$ y $25,57 \pm 0,85\%$ para las relaciones E/S de 1%, 2% y 3% (m/m) de proteínas, respectivamente. En los WPHs FLA, se evidenció un aumento de $5,10 \pm 0,18\%$ a $7,99 \pm 0,20\%$ y $7,32 \pm 0,75\%$ para las relaciones E/S de 4%, 5,5% y 7% (m/m) de proteínas, sin diferencias significativas entre las relaciones E/S más altas. De igual manera, se observaron valores de DH más altos con el aumento de la relación E/S en la hidrólisis de Lactoalbúmina 75L con Alcalase 0.6L y otras proteasas (González-Tello *et al.*, 1994), así como en la hidrólisis de otras fuentes proteicas utilizando ALC (Márquez & Vázquez, 1999; Chabanon *et al.*, 2007; Demirhan *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2018) y otras enzimas (Apar & Özbek, 2007; Ruan *et al.*, 2010). Por lo tanto, con una concentración adecuada de sustrato, un incremento en la concentración de enzima eleva la tasa de ruptura de los enlaces peptídicos, lo que resulta en un mayor DH. Sin

embargo, no se observaron diferencias significativas en los WPHs FLA entre las relaciones E/S de 5,5% y 7% (m/m) de proteínas, en concordancia con los datos reportados por Apar & Özbek (2007, 2008) y Demirhan *et al.* (2011). Estos autores señalaron que el aumento en los valores de DH se detuvieron tras alcanzar un cierto nivel de concentración de enzima, sugiriendo una velocidad máxima de conversión dada la saturación del sustrato. La aplicación de estrategias secuenciales de hidrólisis podría representar una alternativa para salvaguardar estas limitaciones y así generar mayores DH.

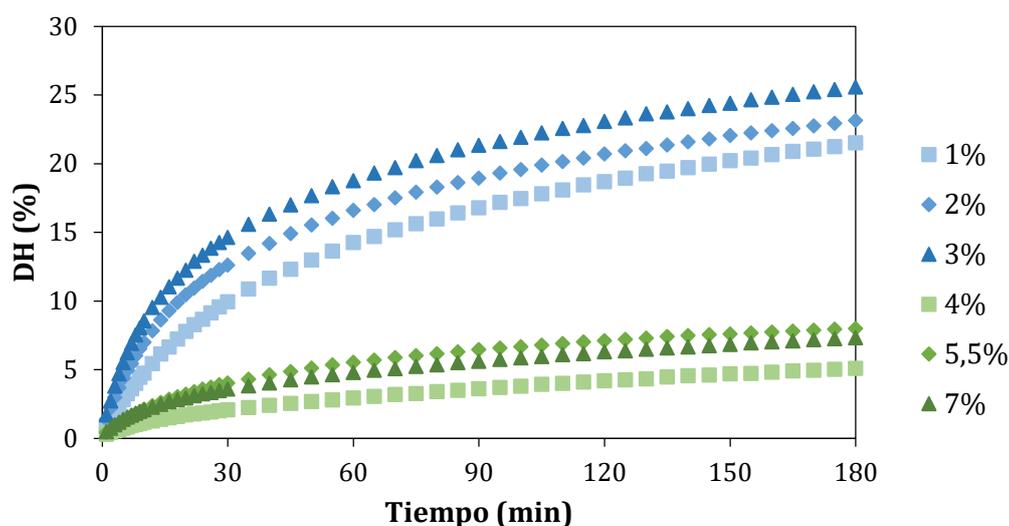


Figura 26. Curvas promedio de progresión del DH (%) alcanzado por los WPHs ALC (tonos azules) y los WPHs FLA (tonos verdes), en función de la relación E/S [% (m/m) de proteínas], con una concentración de sustrato fija de 8% (m/v) de proteínas y valores de pH 9 para ALC y 8 para FLA.

Tabla 12. Valores promedio y desviación estándar correspondientes al DH (%) alcanzado por los hidrolizados tras 180 min de reacción, en función de la relación E/S [% (m/m) de proteínas], con una concentración de sustrato fija de 8% (m/v) de proteínas y pH 9 para ALC y pH 8 para FLA.

| WPHs | Relación E/S [% (m/m)] | DH (%) |
|---------|------------------------|---------------------------|
| WPH ALC | 1 | 21,53 ± 1,07 ^c |
| | 2 | 23,15 ± 0,33 ^d |
| | 3 | 25,57 ± 0,85 ^e |
| WPH FLA | 4 | 5,10 ± 0,18 ^a |
| | 5,5 | 7,99 ± 0,20 ^b |
| | 7 | 7,32 ± 0,75 ^b |

^{a-e} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Finalmente, los controles de proteínas de suero sin hidrolizar (CSHs) presentaron niveles de hidrólisis mínimos, con valores de DH que oscilaron entre $0,22 \pm 0,31\%$ y $1,91 \pm 0,75\%$ (**Anexo 6**). Este grado de hidrólisis observado podría atribuirse al calentamiento al que se expusieron las proteínas del suero, provocando una escisión inespecífica de los enlaces peptídicos ([Adjonu et al., 2013](#)).

❖ *Cinética de hidrólisis enzimática*

Las curvas de progresión del DH (%) obtenidas para los WPHs (**Figuras 23, 24 y 26**) se emplearon para el estudio de la cinética de hidrólisis enzimática. Dichas curvas exhibieron el comportamiento característico de este tipo de procesos, con una velocidad de hidrólisis elevada en la fase inicial, que posteriormente disminuyó de manera progresiva. Esta reducción en la velocidad de reacción podría atribuirse a diversos factores, tales como la disminución de los enlaces peptídicos susceptibles, la inhibición enzimática causada por los productos o el sustrato, y la posible desactivación de las enzimas ([Chabanon et al., 2007](#)).

Con el propósito de describir adecuadamente este comportamiento y determinar las condiciones óptimas de proteólisis, se han desarrollado diversos modelos cinéticos. El modelo clásico de Michaelis-Menten resulta apropiado para sistemas homogéneos; sin embargo, la hidrólisis enzimática de proteínas ocurre generalmente en sistemas heterogéneos y más complejos, donde intervienen factores como la inhibición por productos, la inhibición por sustrato y la desactivación de la enzima. Por este motivo, varios investigadores han propuesto modificaciones al modelo de Michaelis-Menten con el fin de describir con mayor precisión la cinética de hidrólisis y la formación de productos ([Wu et al., 2016](#)).

En este trabajo, se utilizó una ecuación exponencial simple (**Ecuación 4**, sección **3.2.A.1**), previamente empleada en estudios de hidrólisis de Lactoalbúmina 75L ([González-Tello et al., 1994](#)), hemoglobina ([Márquez & Vázquez, 1999](#)), torta de sésamo ([Demirhan et al., 2011](#)) y grano de sorgo dulce ([Wu et al., 2016](#)). Así, las curvas de progresión del DH se ajustaron utilizando dicha ecuación. Según [Márquez & Vázquez \(1999\)](#), esta ecuación representa un modelo de hidrólisis de orden cero con inactivación enzimática simultánea de segundo orden, definiéndose los parámetros cinéticos a y b mediante las **Ecuaciones 16 y 17**:

$$a = \frac{k_2 e_0}{s_0} \quad (16)$$

donde k_2 es la constante de velocidad de la reacción de hidrólisis, e_0 es la concentración inicial de la enzima y s_0 es la concentración inicial del sustrato. El parámetro a está relacionado con la

pendiente inicial de la curva de progresión del DH (%) en función del tiempo, indicando la rapidez con que se produce la hidrólisis al inicio de la reacción.

$$b = \frac{k_3 k_M}{k_2} \quad (17)$$

donde k_3 es la constante de velocidad de la reacción de inactivación, y k_M es la constante de Michaelis-Menten. El parámetro b está relacionado con la constante de Michaelis-Menten (k_M), inversamente proporcional a la afinidad de la enzima por el sustrato, e integra además el efecto de posibles inhibiciones y desactivaciones enzimáticas, representadas por las constantes k_3 y k_2 .

Los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de las curvas de DH bajo diferentes condiciones experimentales, junto con los valores de R^2 , se presentan en las **Tablas 13, 14, 15 y 16**. Los valores de R^2 cercanos a 1 indican que la ecuación cinética empleada permitió modelar adecuadamente la reacción de hidrólisis en las experiencias preliminares.

El **parámetro a** estuvo influenciado tanto por el pH de reacción como por la concentración de sustrato en la hidrólisis con ALC (**Tabla 13**), mientras que en los WPHs FLA, solo el pH tuvo un efecto significativo (**Tabla 14**). En ambos casos, este parámetro aumentó con el pH, registrándose los valores máximos a pH 9. En los WPHs ALC, los valores más altos del parámetro a se registraron a bajas concentraciones de sustrato [1% y 2% (m/v)] (**Tabla 13**), disminuyendo con el incremento de la concentración. A pH 9 y concentración de sustrato de 1%, el parámetro a alcanzó su valor máximo ($2,049 \pm 0,004 \text{ min}^{-1}$), en concordancia con el mayor valor de DH ($27,15 \pm 0,36$), sugiriendo que el pH 9 fue el óptimo para la actividad enzimática de ALC y que el aumento en la concentración de sustrato podría generar un efecto de saturación enzimática o inhibición por sustrato.

Por otro lado, la relación E/S mostró un efecto directamente proporcional sobre el parámetro a en los WPH-A (**Tabla 15**), indicando que, a mayor cantidad de enzima disponible, mayor velocidad inicial. En los WPHs FLA, el parámetro a aumentó entre las relaciones E/S de 4% y 5,5% (m/m) de proteínas, pero no hubo diferencias significativas entre 5,5% y 7% (**Tabla 16**), en concordancia con lo observado en el DH. Respecto a los preparados enzimáticos, los valores del parámetro a fueron significativamente mayores en la hidrólisis con ALC, lo que claramente sugiere una mayor velocidad inicial de reacción en este sistema enzimático, que a su vez registró los valores más altos de DH.

Tabla 13. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a los parámetros cinéticos *a* y *b* de los WPHs ALC, en función del pH de reacción y de la concentración de sustrato [*S*₀, % (m/v) de proteínas].

| pH | <i>S</i> ₀ [% (m/v)] | <i>a</i> (min ⁻¹) | <i>b</i> | R ² |
|---------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------|
| 7 | 1 | 1,439 ± 0,113 ^{cde} | 0,189 ± 0,002 ^{cdefg} | 0,994 |
| | 2 | 1,244 ± 0,360 ^{abcd} | 0,200 ± 0,006 ^{efg} | 0,994 |
| | 4 | 1,024 ± 0,581 ^{abc} | 0,208 ± 0,043 ^{fg} | 0,997 |
| | 6 | 0,978 ± 0,412 ^{abc} | 0,198 ± 0,042 ^{defg} | 0,997 |
| | 8 | 0,890 ± 0,304 ^{ab} | 0,211 ± 0,029 ^{fgh} | 0,996 |
| | 10 | 1,102 ± 0,022 ^{abc} | 0,227 ± 0,005 ^{gh} | 0,999 |
| | 12 | 0,774 ± 0,151 ^a | 0,249 ± 0,031 ^h | 0,994 |
| 8 | 1 | 1,998 ± 0,303 ^f | 0,151 ± 0,005 ^{ab} | 0,998 |
| | 2 | 1,703 ± 0,347 ^{def} | 0,155 ± 0,007 ^{abc} | 0,999 |
| | 4 | 1,330 ± 0,344 ^{bcde} | 0,165 ± 0,019 ^{abcde} | 0,999 |
| | 6 | 1,379 ± 0,135 ^{bcde} | 0,173 ± 0,006 ^{abcdef} | 1,000 |
| | 8 | 1,211 ± 0,225 ^{abcd} | 0,174 ± 0,018 ^{abcdef} | 1,000 |
| | 10 | 1,209 ± 0,184 ^{abcd} | 0,175 ± 0,016 ^{abcdef} | 1,000 |
| | 12 | 1,093 ± 0,010 ^{abc} | 0,187 ± 0,009 ^{bcdef} | 0,999 |
| 9 | 1 | 2,049 ± 0,004 ^f | 0,147 ± 0,000 ^a | 0,997 |
| | 2 | 1,850 ± 0,122 ^{ef} | 0,147 ± 0,007 ^a | 0,999 |
| | 4 | 1,330 ± 0,344 ^{bcde} | 0,165 ± 0,019 ^{abcde} | 0,999 |
| | 6 | 1,376 ± 0,083 ^{bcde} | 0,160 ± 0,009 ^{abcd} | 1,000 |
| | 8 | 1,308 ± 0,118 ^{bcd} | 0,157 ± 0,008 ^{abc} | 1,000 |
| | 10 | 1,307 ± 0,091 ^{bcd} | 0,157 ± 0,008 ^{abc} | 1,000 |
| | 12 | 1,217 ± 0,085 ^{abcd} | 0,158 ± 0,002 ^{abc} | 1,000 |
| pH | | S | S | |
| <i>S</i> ₀ | | S | NS | |
| Interacción pH- <i>S</i> ₀ | | NS | NS | |

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA; S: Efecto significativo ($p < 0,05$); NS: Efecto no significativo ($p > 0,05$). ^{a-h} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 14. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a los parámetros cinéticos *a* y *b* de los WPHs FLA, en función del pH de reacción y de la concentración de sustrato [*S*₀, % (m/v) de proteínas].

| pH | <i>S</i> ₀ [% (m/v)] | <i>a</i> (min ⁻¹) | <i>b</i> | R ² |
|---------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------|----------------|
| 7 | 1 | 0,424 ± 0,010 ^{abcd} | 0,562 ± 0,003 ^{de} | 0,993 |
| | 2 | 0,378 ± 0,013 ^{abcd} | 0,585 ± 0,007 ^{de} | 0,999 |
| | 4 | 0,393 ± 0,013 ^{abcd} | 0,528 ± 0,003 ^{bcd} | 1,000 |
| | 6 | 0,381 ± 0,002 ^{abcd} | 0,543 ± 0,001 ^{cde} | 0,999 |
| | 8 | 0,343 ± 0,038 ^{abc} | 0,618 ± 0,021 ^{de} | 0,999 |
| | 10 | 0,352 ± 0,074 ^{abc} | 0,597 ± 0,047 ^{de} | 0,999 |
| | 12 | 0,365 ± 0,044 ^{abc} | 0,637 ± 0,062 ^e | 0,999 |
| 8 | 1 | 0,350 ± 0,035 ^{abc} | 0,455 ± 0,019 ^{abc} | 0,999 |
| | 2 | 0,348 ± 0,012 ^{abc} | 0,427 ± 0,012 ^{ab} | 0,999 |
| | 4 | 0,362 ± 0,005 ^{abc} | 0,369 ± 0,000 ^a | 0,999 |
| | 6 | 0,369 ± 0,002 ^{abc} | 0,385 ± 0,000 ^a | 1,000 |
| | 8 | 0,335 ± 0,006 ^{ab} | 0,400 ± 0,012 ^a | 1,000 |
| | 10 | 0,339 ± 0,011 ^{abc} | 0,388 ± 0,013 ^a | 1,000 |
| | 12 | 0,317 ± 0,002 ^a | 0,420 ± 0,036 ^a | 0,999 |
| 9 | 1 | 0,449 ± 0,047 ^{cd} | 1,048 ± 0,049 ^h | 0,981 |
| | 2 | 0,486 ± 0,090 ^d | 1,060 ± 0,042 ^h | 0,983 |
| | 4 | 0,445 ± 0,101 ^{bcd} | 0,760 ± 0,057 ^f | 0,991 |
| | 6 | 0,420 ± 0,054 ^{abcd} | 0,881 ± 0,036 ^g | 0,982 |
| | 8 | 0,316 ± 0,056 ^a | 0,880 ± 0,010 ^g | 0,988 |
| | 10 | 0,449 ± 0,134 ^{cd} | 0,970 ± 0,061 ^{gh} | 0,991 |
| | 12 | 0,436 ± 0,060 ^{bcd} | 1,393 ± 0,180 ⁱ | 0,996 |
| pH | | S | S | |
| <i>S</i> ₀ | | NS | S | |
| Interacción pH- <i>S</i> ₀ | | NS | S | |

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA; S: Efecto significativo (*p* < 0,05); NS: Efecto no significativo (*p* > 0,05). ^{a-i} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (*p* < 0,05).

Tabla 15. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a los parámetros cinéticos a y b de los WPHs ALC, en función de la relación E/S [% (m/m) de proteínas].

| pH | Relación E/S [% (m/m)] | a (min ⁻¹) | b | R ² |
|----|------------------------|----------------------------|---------------|----------------|
| 9 | 1 | 0,689 ± 0,114 ^a | 0,132 ± 0,000 | 1,000 |
| | 2 | 1,308 ± 0,118 ^b | 0,157 ± 0,008 | 1,000 |
| | 3 | 1,800 ± 0,120 ^c | 0,153 ± 0,010 | 1,000 |

^{a-c} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Columnas sin letras indican que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Tabla 16. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a los parámetros cinéticos a y b de los WPHs FLA, en función de la relación E/S [% (m/m) de proteínas].

| pH | Relación E/S [% (m/m)] | a (min ⁻¹) | b | R ² |
|----|------------------------|----------------------------|---------------|----------------|
| 8 | 4 | 0,131 ± 0,022 ^a | 0,529 ± 0,081 | 0,992 |
| | 5,5 | 0,335 ± 0,006 ^b | 0,400 ± 0,012 | 1,000 |
| | 7 | 0,322 ± 0,003 ^b | 0,473 ± 0,076 | 0,997 |

^{a-b} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Columnas sin letras indican que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

El **parámetro b** también estuvo influenciado por el pH, aunque con un comportamiento específico para cada preparado enzimático. En los WPHs FLA, los valores más altos se registraron a pH 9, seguidos de pH 7 y pH 8, respectivamente (**Tabla 14**). En cambio, en los WPHs ALC, los mayores valores se observaron a pH 7, seguido de pH 8 y pH 9, sin diferencias significativas entre estos últimos (**Tabla 13**). Las tendencias en el efecto del pH sobre el parámetro b fueron opuestas a las observadas en el DH, sugiriendo una posible relación inversa entre ambos parámetros. Es decir, un mayor DH podría estar asociado con una menor inactivación enzimática (valores más bajos del parámetro b). La concentración de sustrato tuvo un efecto significativo solo en las hidrólisis con FLA; sin embargo, no se identificó una tendencia clara en su aumento o disminución (**Tabla 14**). La relación E/S no presentó un efecto significativo sobre el parámetro b (**Tablas 15 y 16**). Además, los valores del parámetro b fueron notablemente mayores en los WPHs FLA en comparación con los WPHs ALC, lo que podría indicar una mayor desactivación enzimática en FLA y, por ende, un menor grado de hidrólisis.

Diversos autores han determinado los parámetros cinéticos a y b en la hidrólisis de proteínas con ALC, obteniendo tendencias similares a las observadas en este trabajo para los WPHs ALC. En general, el parámetro a aumentó con la relación E/S y disminuyó con la concentración de sustrato, mientras que el parámetro b no estuvo influenciado por estas variables, lo que concuerda con lo observado en la hidrólisis de suero lácteo (González-Tello *et al.*, 1994; Martínez-Araiza *et al.*,

2012), hemoglobina (Márquez & Vázquez, 1999), gluten de maíz (Apar & Özbek, 2008), torta de sésamo (Demirhan *et al.*, 2011) y grano de sorgo dulce (Wu *et al.*, 2016). Sin embargo, estas tendencias no pudieron extrapolarse completamente a los WPHs FLA en donde, a diferencia de los WPHs ALC, el parámetro a no estuvo afectado por la concentración de sustrato, mientras que el parámetro b sí presentó diferencias con cambios en esta variable. En cambio, el efecto de la relación E/S fue similar en ambos preparados enzimáticos, ya que el parámetro a aumentó, pero el parámetro b no se vio afectado. El efecto del pH sobre ambos parámetros cinéticos obtenidos en los WPHs ALC fue similar al reportado por Demirhan *et al.* (2011), quienes observaron que un aumento en el pH de reacción de la hidrólisis de la torta de sésamo con ALC provocó un aumento en el valor a y una disminución en el parámetro b .

Finalmente, el modelo aplicado permitió representar matemáticamente la hidrólisis de proteínas de suero con ALC y FLA bajo diferentes condiciones experimentales, logrando describir y potencialmente predecir el comportamiento cinético en diversas condiciones de operación.

4.1.B.2. Perfil peptídico

Los perfiles peptídicos de los WPHs seleccionados (Figura 22), junto con sus respectivos CSHs y los estándares BSA, α -LA y β -LG, se presentan en las Figuras 27 y 28. Los cromatogramas obtenidos revelaron que todos los WPHs exhibieron numerosos picos, correspondientes a los componentes peptídicos liberados tras la hidrólisis enzimática. Además, se observaron diferencias en los perfiles peptídicos según el preparado enzimático utilizado.

Los WPHs ALC eluyeron principalmente entre 17 y 41 min (Figuras 27.A y 28.A), mientras que los WPHs FLA lo hicieron en un rango de tiempo más amplio (Figuras 27.B y 28.B). En los cromatogramas de los WPHs ALC, se evidenció una degradación prácticamente completa de BSA y α -LA, así como una degradación parcial de β -LG. En contraste, los perfiles peptídicos de los WPHs FLA mostraron una degradación incompleta de estas proteínas, evidenciada por la presencia de señales más intensas en la región de 50-60 min. Estas observaciones concuerdan con las reportadas por da Rosa *et al.* (2018).

Al analizar el efecto de la concentración de sustrato a una relación E/S constante (Figura 27), se observó que la forma de los picos cromatográficos fue similar dentro de cada grupo de muestra (WPHs ALC, WPHs FLA o CSHs). Sin embargo, a medida que aumentó la concentración de proteína, también lo hizo el área total del cromatograma, lo que sugiere una mayor cantidad de péptidos generados en función del aumento de sustrato.

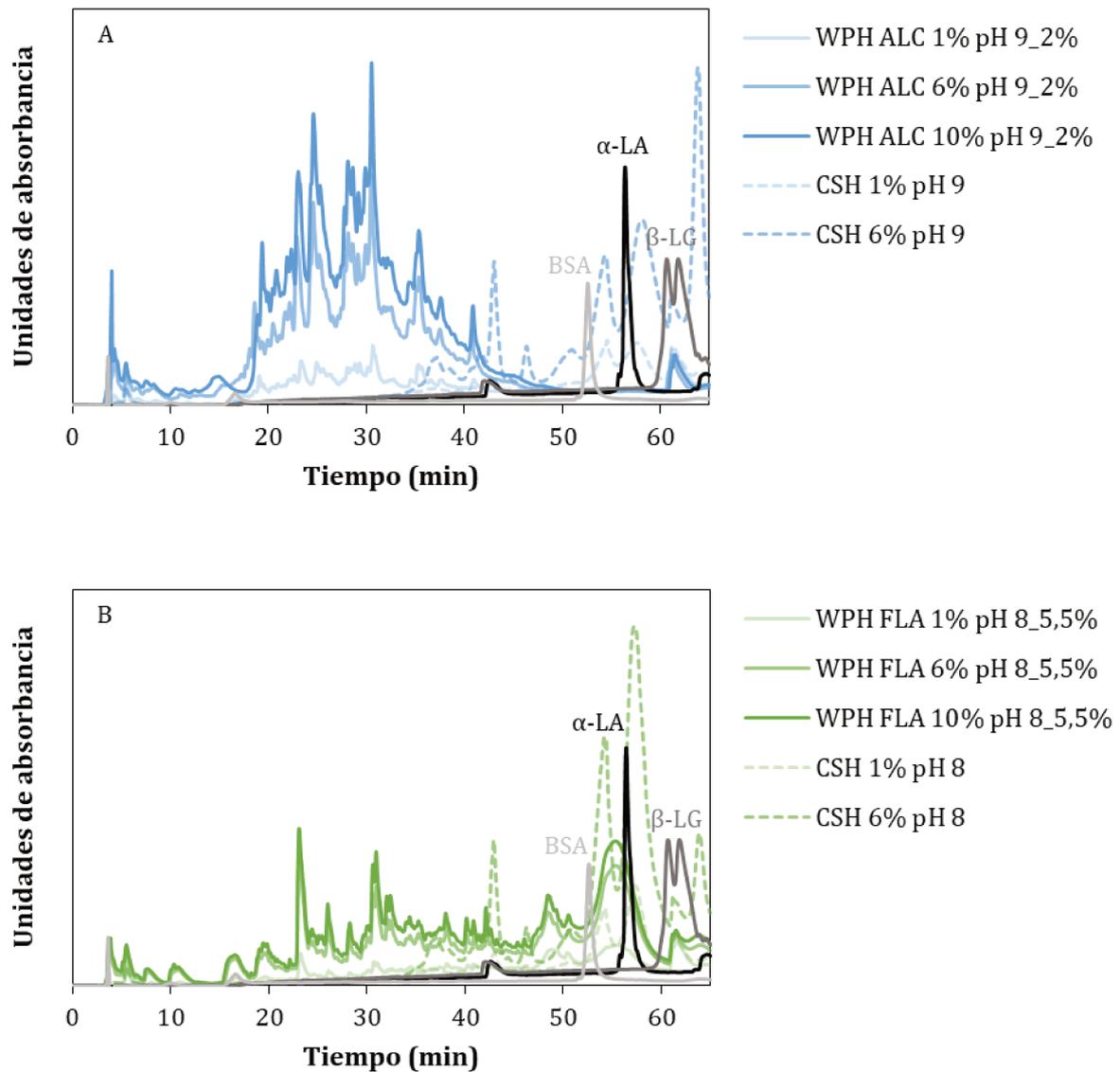


Figura 27. Perfil peptídico de los WPHs obtenidos con una relación E/S fija [ALC: 2% (m/m) de proteínas, FLA: 5,5% (m/m) de proteínas] y distintas concentraciones de sustrato [1%, 6% y 10% (m/v) de proteínas]. (A) WPHs ALC. (B) WPHs FLA.

Al comparar diferentes relaciones E/S a una concentración de sustrato constante (**Figura 28**), los WPHs ALC y los WPHs FLA presentaron perfiles peptídicos similares a simple vista. No obstante, se identificaron pequeñas variaciones en las áreas del cromatograma dependiendo de la región analizada, lo que indica que la concentración enzimática influyó en la actividad catalítica y, en consecuencia, en la proporción de péptidos obtenidos tras la hidrólisis.

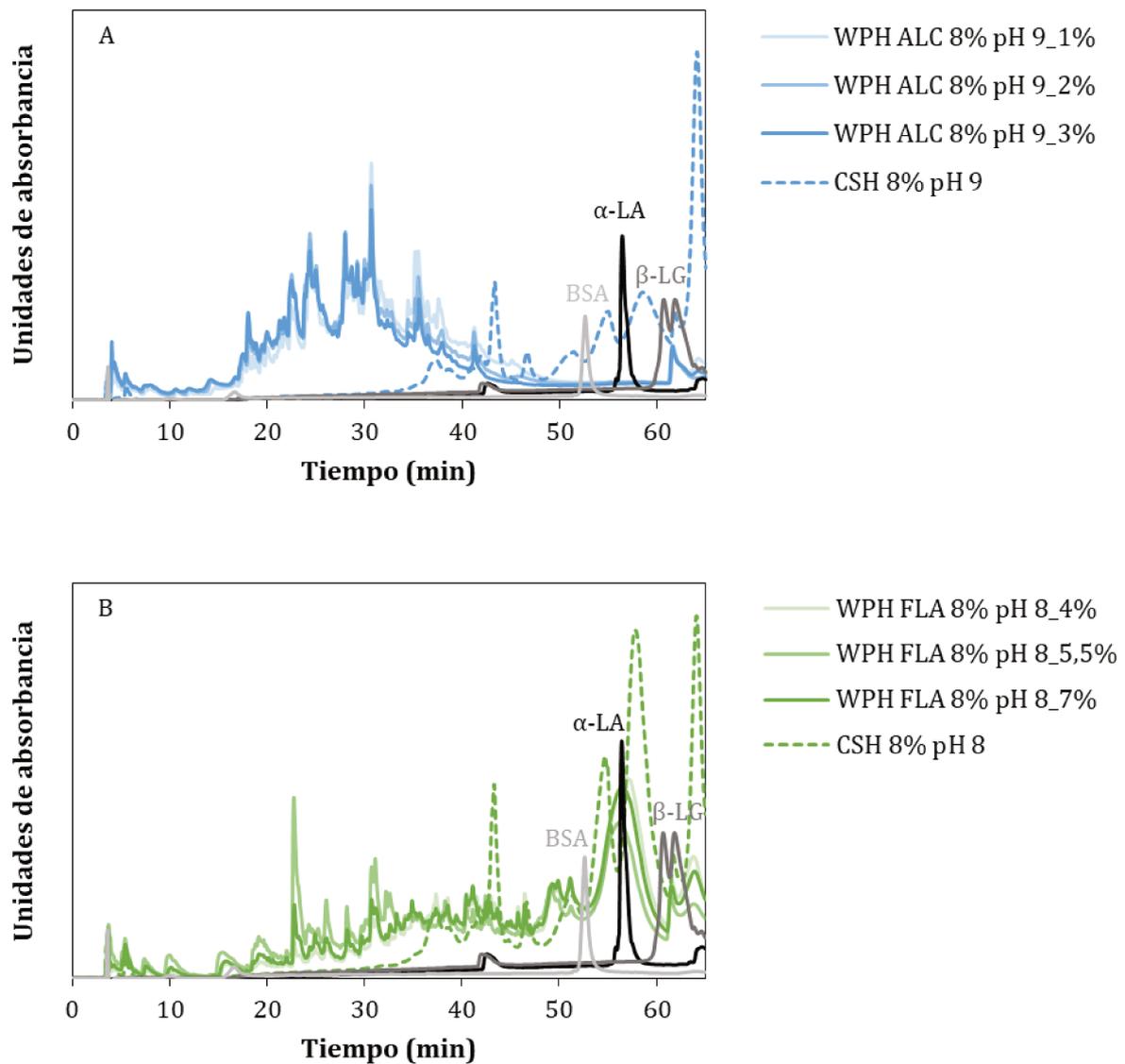


Figura 28. Perfil peptídico de los WPHs obtenidos con una concentración de sustrato fija [8% (m/v) de proteínas] y diferentes relaciones E/S [ALC: 1%, 2% y 3% (m/m) de proteínas; FLA: 4%, 5,5% y 7% (m/m) de proteínas]. **(A)** WPHs ALC. **(B)** WPHs FLA.

Finalmente, los CSHs exhibieron una menor cantidad de componentes peptídicos, con señales bien definidas en la región más hidrofóbica del cromatograma, correspondientes a proteínas de suero intactas. Además, los CSHs al 10% (m/v) no pudieron ser procesados por RP-HPLC debido a la gelificación ocurrida durante el tratamiento previo, lo que impidió la separación cromatográfica.

4.1.B.3. Índice de hidrofobicidad

Los cromatogramas obtenidos en la evaluación del perfil peptídico se utilizaron para determinar el índice de hidrofobicidad de los péptidos generados, clasificando los perfiles de elución de los WPHs en tres categorías de hidrofobicidad: baja (HB), media (HM) y alta (HA). Esta determinación es relevante para su potencial uso como ingrediente alimentario, ya que la presencia de péptidos hidrófobos se ha asociado con el desarrollo y/o la posible aparición de sabor amargo ([Spellman *et al.*, 2005](#)).

Los índices de hidrofobicidad obtenidos se presentan en las **Tablas 17 y 18**, así como en la **Figura 29**. En general, los resultados mostraron una reducción en la hidrofobicidad tras la hidrólisis, evidenciada por una menor proporción de péptidos en la región de HA y un incremento en las regiones de HM e HB. La baja presencia de péptidos en la región de HA en los perfiles de elución de los WPHs podría estar asociada a una reducción en la percepción del sabor amargo, lo que refuerza su potencial aplicación en formulaciones alimentarias. En contraste, los CSHs presentaron los valores más altos en la fracción HA, lo que indica que las proteínas intactas son predominantemente hidrófobas antes de la hidrólisis.

En cuanto a las preparaciones enzimáticas, los WPHs generados con ALC presentaron un índice de hidrofobicidad más bajo, mientras que los obtenidos con FLA mostraron una mayor proporción de péptidos en la región de HA y una menor en la región de HB. Estos resultados podrían estar relacionados con el DH, ya que los WPHs ALC alcanzaron mayores valores de DH y un menor índice de hidrofobicidad, mientras que los WPHs FLA presentaron menores DH y mayor hidrofobicidad. Esto sugiere que ALC favorece la generación de péptidos más cortos y con predominio de residuos hidrófilos, mientras que FLA produce péptidos de mayor tamaño y con mayor carácter hidrófobo. [Da Costa *et al.* \(2007\)](#) reportaron que el perfil de elución de los WPHs varía según la enzima utilizada, señalando que la hidrólisis de WPI con ALC generó un perfil más hidrófobo en comparación con otros sistemas enzimáticos como α -quimotripsina y Proteomix® (tripsina y quimotripsina). Sin embargo, los perfiles de hidrofobicidad obtenidos en dicho estudio fueron superiores a los del presente trabajo, lo que podría atribuirse a diferencias en el DH, en concordancia con datos previamente informados ([Eberhardt *et al.*, 2019](#)). [Pessato *et al.* \(2016\)](#) reportaron que los WPHs generados con ALC libre bajo distintas condiciones de hidrólisis presentaron pocos picos en la región de HA, con la mayoría de los péptidos eluyendo en las regiones de HB e HM. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente trabajo y sugieren que la amplia especificidad de ALC favorece la formación de pequeños péptidos con carácter predominantemente hidrófilo.

Respecto a la concentración de sustrato, se observó que su aumento, especialmente por encima del 1% (m/v) de proteínas, redujo la proporción de péptidos en la región de HA y aumentó la de HB (**Tabla 17** y **Figura 29.A**). Esta tendencia fue más pronunciada en los WPHs ALC, donde la fracción de HA disminuyó drásticamente a medida que se incrementó la concentración de sustrato, mientras que en los WPHs FLA esta reducción fue más moderada. Estos resultados sugieren que una mayor concentración de sustrato favorece una redistribución de los péptidos en el cromatograma, posiblemente debido a una mayor disponibilidad de sitio de hidrólisis.

Tabla 17. Valores promedio y desviación estándar correspondientes al índice de hidrofobicidad de los WPHs y sus respectivos CSHs, en función de la concentración de sustrato [S_0 , % (m/v) de proteínas].

| Muestra | S_0 [% (m/v)] | Índice de hidrofobicidad (%) | | |
|----------|-----------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | HB | HM | HA |
| WPHs ALC | 1 | 11,03 ± 0,50 ^f | 8,59 ± 0,05 ^{gh} | 35,76 ± 4,58 ^b |
| | 6 | 13,79 ± 0,01 ^g | 8,91 ± 0,13 ^{hi} | 14,93 ± 0,95 ^a |
| | 8 | 14,06 ± 0,12 ^g | 9,03 ± 0,05 ⁱ | 15,93 ± 0,69 ^a |
| | 10 | 13,88 ± 0,30 ^g | 8,71 ± 0,01 ^{hi} | 14,97 ± 2,17 ^a |
| WPHs FLA | 1 | 7,65 ± 0,08 ^d | 8,53 ± 0,08 ^{fgh} | 63,62 ± 0,55 ^e |
| | 6 | 8,95 ± 0,05 ^e | 7,77 ± 0,46 ^e | 54,10 ± 0,78 ^{cd} |
| | 8 | 8,99 ± 0,06 ^e | 8,15 ± 0,11 ^{ef} | 55,74 ± 0,34 ^d |
| | 10 | 9,43 ± 0,13 ^e | 8,20 ± 0,11 ^{fg} | 52,33 ± 0,41 ^c |
| CSHs ALC | 1 | 5,11 ± 0,32 ^c | 6,99 ± 0,22 ^{cd} | 78,60 ± 0,94 ^f |
| | 6 | 3,13 ± 0,32 ^b | 6,57 ± 0,18 ^b | 85,57 ± 1,46 ^g |
| | 8 | 3,05 ± 0,19 ^{ab} | 7,05 ± 0,21 ^d | 85,50 ± 0,68 ^g |
| CSHs FLA | 1 | 4,83 ± 0,22 ^c | 6,61 ± 0,00 ^{bc} | 79,46 ± 0,59 ^f |
| | 6 | 2,65 ± 0,09 ^a | 5,87 ± 0,09 ^a | 88,21 ± 0,29 ^g |
| | 8 | 2,60 ± 0,13 ^a | 6,42 ± 0,28 ^b | 87,34 ± 0,78 ^g |

^{a-i} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

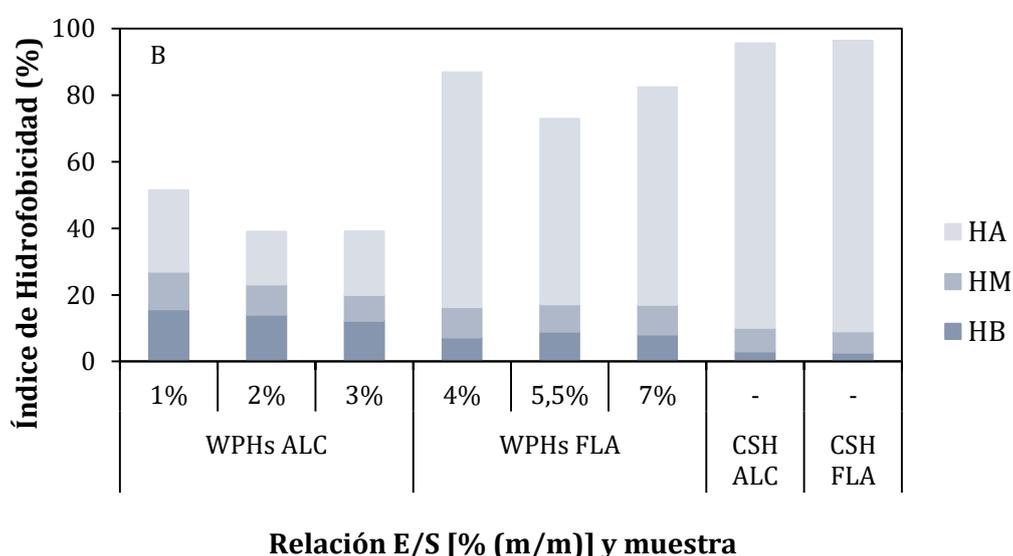
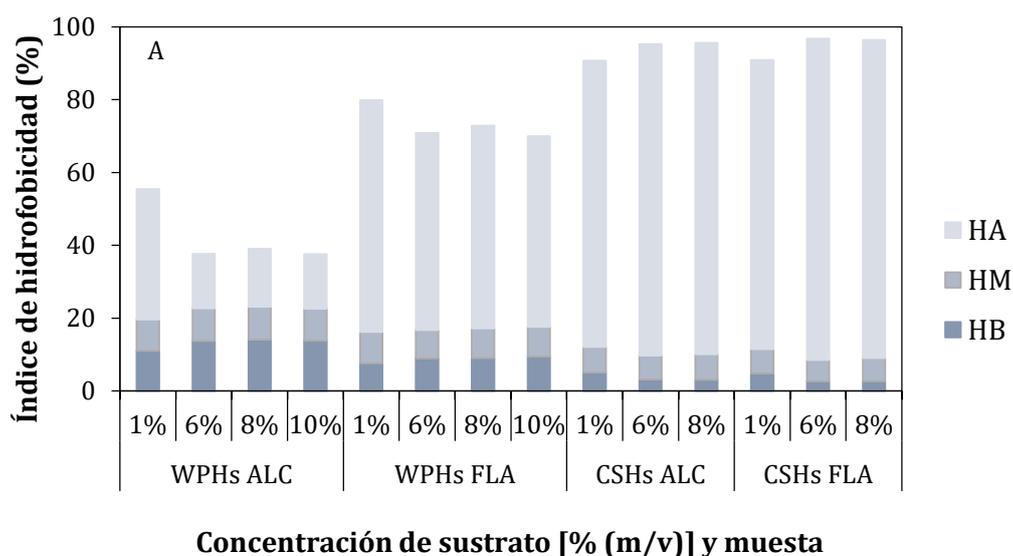


Figura 29 Índice de hidrofobicidad promedio de los WPHs y sus respectivos CSHs. (A) Efecto de la concentración de sustrato [% (m/v) de proteínas]. (B) Efecto de la relación E/S [% (m/m) de proteínas]. HA: hidrofobicidad alta; HM: hidrofobicidad media; HB: hidrofobicidad baja.

En cuanto a la relación E/S, en los WPHs ALC, su incremento resultó en una menor proporción de péptidos en las regiones de HB e HM. No obstante, la relación E/S más baja utilizada [1% (m/m) de proteínas] presentó la mayor proporción de péptidos en la región de HA, mientras que a una relación intermedia de 2% (m/m) se observó la menor presencia de péptidos en esta región (Tabla 18 y Figura 29.B). En los WPHs FLA, no se observó una tendencia clara en el índice de hidrofobicidad con el aumento o disminución de la relación E/S. Sin embargo, la menor hidrofobicidad se registró a una relación E/S intermedia de 5,5% (m/m) de proteínas, ya que mostró una menor proporción de componentes en la región de HA y una mayor presencia en la región de HB.

Tabla 18. Valores promedio y desviación estándar correspondientes al índice de hidrofobicidad de los WPHs y sus respectivos CSHs, en función de la relación E/S [% (m/m) de proteínas].

| Muestra | Relación E/S [% (m/m)] | Índice de hidrofobicidad (%) | | |
|----------|------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | HB | HM | HA |
| WPHs ALC | 0* | 3,05 ± 0,19 ^b | 7,05 ± 0,21 ^b | 85,50 ± 0,68 ^g |
| | 1 | 15,66 ± 0,07 ^h | 11,31 ± 0,02 ^f | 24,46 ± 0,59 ^c |
| | 2 | 14,06 ± 0,12 ^g | 9,03 ± 0,05 ^e | 15,93 ± 0,69 ^a |
| | 3 | 12,24 ± 0,03 ^f | 7,71 ± 0,06 ^c | 19,09 ± 0,26 ^b |
| WPHs FLA | 0* | 2,60 ± 0,13 ^a | 6,42 ± 0,28 ^a | 87,34 ± 0,78 ^h |
| | 4 | 7,24 ± 0,09 ^c | 9,03 ± 0,31 ^e | 70,60 ± 0,74 ^f |
| | 5,5 | 8,99 ± 0,06 ^e | 8,15 ± 0,11 ^d | 55,74 ± 0,34 ^d |
| | 7 | 8,12 ± 0,25 ^d | 8,90 ± 0,04 ^e | 65,30 ± 1,31 ^e |

*La relación E/S de 0% (m/m) de proteínas, representan a los correspondientes CSHs. ^{a-h} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos sugieren que la hidrólisis con ALC permite generar péptidos con menor hidrofobicidad en comparación con FLA, lo que podría reducir la potencial percepción de sabor amargo en formulaciones alimentarias. Además, tanto la concentración de sustrato como la relación E/S demostraron ser factores determinantes en la hidrofobicidad de los hidrolizados. En este sentido, los WPHs ALC obtenidos con una relación E/S de 2% (m/m) de proteínas y con una concentración de sustrato entre 6% y 10% (m/v) de proteínas aparecen como las opciones más promisorias para evaluar su incorporación en formulaciones alimentarias.

4.1.B.4. Actividad antihipertensiva

La presión arterial elevada, o hipertensión, es uno de los principales factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares (Brandelli *et al.*, 2015). La enzima convertidora de angiotensina I (ECA, EC 3.4.15.1) desempeña un papel esencial en la regulación de la presión arterial dentro del sistema renina-angiotensina, ya que su actividad contribuye a un incremento de la misma (Wang *et al.*, 2010). Su mecanismo de acción se basa en la conversión de angiotensina I en el potente vasoconstrictor angiotensina II, además de inactivar el vasodilatador bradicinina (Madureira *et al.*, 2010). En la práctica clínica, los inhibidores sintéticos de la ECA, como el captopril, enalapril, lisinopril y alacepril, se utilizan para regular la presión arterial. Sin embargo, su uso puede generar efectos secundarios adversos, como reacciones alérgicas, erupciones cutáneas, tos y alteraciones del gusto, lo que ha impulsado la búsqueda de inhibidores naturales de la ECA (Brandelli *et al.*, 2015).

En este contexto, diversos péptidos bioactivos derivados de proteínas alimentarias han sido evaluados por su capacidad de inhibir la ECA, constituyendo una opción viable frente a los fármacos sintéticos (Brandelli *et al.*, 2015). En particular, algunos estudios han demostrado que los hidrolizados y péptidos derivados de proteínas lácteas presentan actividad antihipertensiva (Morais *et al.*, 2014; Hernández-Ledesma *et al.*, 2011). Un ejemplo concreto es el de los péptidos VPP e IPP, presentes en leches fermentadas con *Lactobacillus helveticus*, cuyo efecto en la reducción de la presión arterial ha sido comprobado en productos comerciales en Japón (Ameal S® /Calpis®) y Finlandia (Valio Evolus® Double Effect) (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011).

En este trabajo, se evaluó la inhibición de la ECA en los WPHs ALC (pH 9) y los WPHs FLA (pH 8), así como en sus respectivos CSHs, considerando dos variables de la reacción de hidrólisis: concentración de sustrato y relación E/S. Los resultados se presentan en las **Tablas 19 y 20** y en la **Figura 30**. En general, los WPHs mostraron un porcentaje de inhibición de la ECA significativamente superior al de los CSHs, con valores de inhibición en un rango de 52-67% para los WPHs y de 11-29% para los CSHs, lo que sugiere que la hidrólisis enzimática fue efectiva en la liberación de péptidos bioactivos con actividad inhibidora de la ECA. En estudios previos, se ha reportado que el WPC no hidrolizado presenta una inhibición muy baja (< 10%) (Wang *et al.*, 2010; Morais *et al.*, 2014). Estas diferencias pueden atribuirse a factores como la composición del WPC, el método de análisis empleado y las condiciones experimentales utilizadas para determinar la AAH. En el presente trabajo de Tesis, el WPC-80 fue sometido a las mismas condiciones de procesamiento que los WPHs (50°C durante 3 h), lo que pudo haber generado tanto la liberación de pequeñas fracciones peptídicas como una reorganización estructural de las proteínas, contribuyendo a la actividad inhibitoria de la ECA.

Respecto a la concentración de sustrato utilizado en la hidrólisis, no se observaron diferencias significativas en la AAH (**Tabla 19 y Figura 30.A**). Del mismo modo, la relación E/S no influyó de manera significativa en la inhibición de la ECA (**Tabla 20 y Figura 30.B**). En cuanto a la comparación entre las preparaciones enzimáticas, los valores de inhibición de la ECA fueron similares entre los diferentes WPHs, aunque las concentraciones utilizadas para la prueba de AAH fueron distintas. Por ello, se seleccionó un hidrolizado representativo de cada tratamiento enzimático para determinar su concentración inhibitoria IC₅₀ (concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la ECA).

Los valores de IC₅₀ revelaron diferencias significativas entre los WPHs, con una actividad antihipertensiva superior en el WPH ALC (2,54 ± 0,08 mg/mL) en comparación con el WPH FLA (21,65 ± 0,78 mg/mL). Estos resultados muestran la importancia de estimar la concentración de hidrolizado necesaria para lograr inhibir a un 50% la actividad de la enzima y no solo tener en cuenta el porcentaje de inhibición.

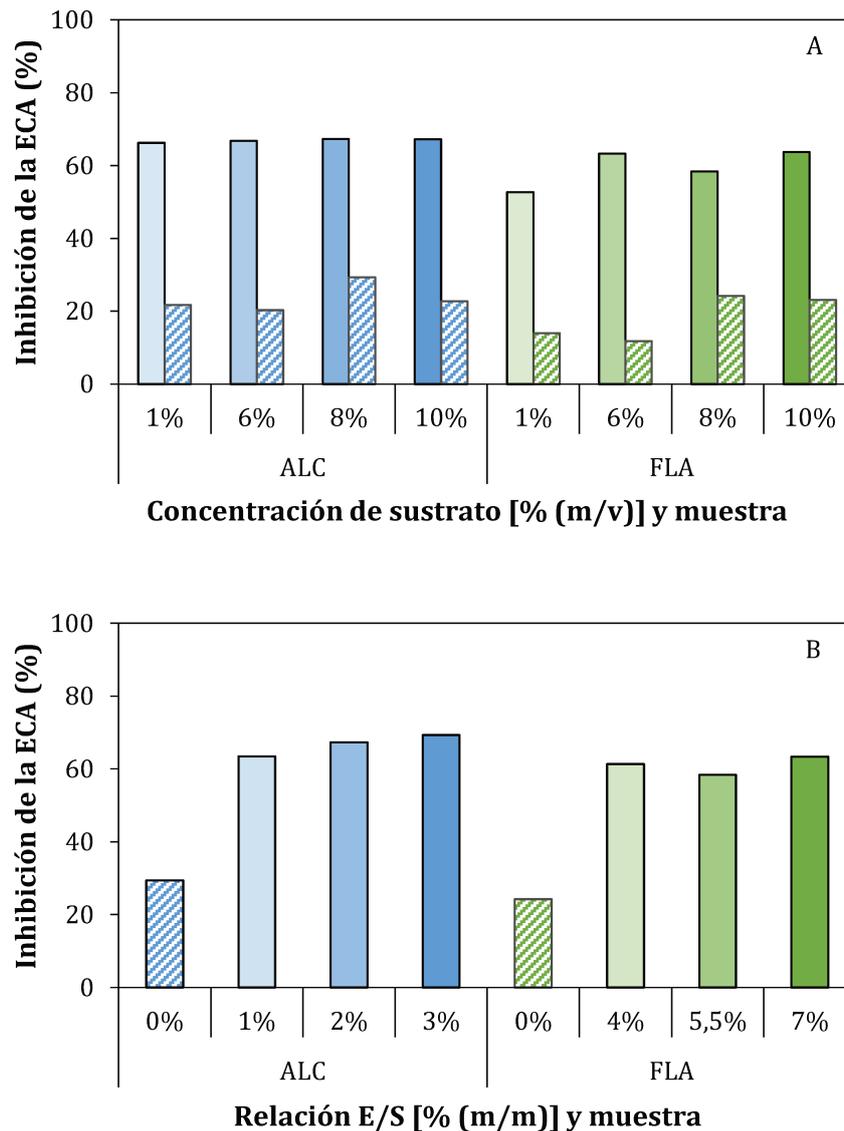


Figura 30. Inhibición de la ECA promedio de los WPHs (barras sólidas) y CSHs (barras con líneas). **(A)** Efecto de la concentración de sustrato [% (m/v) de proteínas]. **(B)** Efecto de la relación E/S [% (m/m) de proteínas]. La relación E/S de 0% representa al CSH. El ensayo de inhibición se realizó a la concentración de 5 mg/mL (WPHs ALC y CSHs ALC) y de 30 mg/mL (WPHs FLA y CSHs FLA).

La elección de la enzima para la hidrólisis de proteínas influye directamente en la generación de péptidos con actividad inhibidora de la ECA, ya que cada proteasa escinde la proteína en sitios específicos. Los inhibidores más potentes suelen contener aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina, fenilalanina), alifáticos (prolina) o básicos (lisina o arginina) en la posición C-terminal (López *et al.*, 2022). En este sentido, los resultados obtenidos para el preparado enzimático de *B. licheniformis* (ALC) eran en cierta medida esperables, ya que esta endopeptidasa muestra preferencia por los enlaces peptídicos que involucran aminoácidos hidrofóbicos, lo que podría favorecer la generación de péptidos con mayor afinidad por el sitio activo de la ECA (Morais *et al.*, 2014).

Tabla 19. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la inhibición de la ECA para los WPHs y sus respectivos CSHs, en función de la concentración de sustrato [S₀, % (m/v) de proteínas].

| S ₀ [% (m/v)] | Inhibición de la ECA (%) | | | |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| | ALC | | FLA | |
| | WPHs | CSHs | WPHs | CSHs |
| 1 | 66,21 ± 1,04 ^{fgh} | 21,72 ± 5,97 ^{bcd} | 52,66 ± 1,13 ^e | 13,97 ± 2,99 ^{ab} |
| 2 | 65,87 ± 1,69 ^{fgh} | * | 52,61 ± 5,89 ^e | * |
| 4 | 67,34 ± 0,84 ^h | * | 58,16 ± 5,41 ^{ef} | * |
| 6 | 66,73 ± 1,77 ^{gh} | 20,27 ± 4,56 ^{abc} | 63,24 ± 5,82 ^{fgh} | 11,80 ± 1,14 ^a |
| 8 | 67,30 ± 3,05 ^h | 29,34 ± 0,20 ^d | 58,32 ± 2,30 ^{efg} | 24,20 ± 4,84 ^{cd} |
| 10 | 67,18 ± 1,76 ^h | 22,70 ± 0,80 ^{cd} | 63,66 ± 1,30 ^{fgh} | 23,10 ± 6,89 ^{cd} |
| 12 | 66,03 ± 9,90 ^{fgh} | * | 60,96 ± 3,36 ^{efgh} | * |

(*): valor no determinado. El ensayo de inhibición se realizó a la concentración de 5 mg/mL (WPHs ALC y CSHs ALC) y de 30 mg/mL (WPHs FLA y CSHs FLA). ^{a-h} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 20. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la inhibición de la ECA para los WPHs, en función de la relación E/S [% (m/m) de proteínas].

| Muestra | Relación E/S [% (m/m)] | Inhibición de la ECA (%) |
|----------|------------------------|----------------------------|
| WPHs ALC | 0* | 29,34 ± 0,20 ^a |
| | 1 | 63,44 ± 6,30 ^{bc} |
| | 2 | 67,30 ± 3,05 ^{bc} |
| | 3 | 69,32 ± 8,33 ^c |
| WPHs FLA | 0* | 24,20 ± 4,84 ^a |
| | 4 | 61,31 ± 4,73 ^{bc} |
| | 5,5 | 58,32 ± 2,30 ^b |
| | 7 | 63,37 ± 0,80 ^{bc} |

*La relación E/S de 0% (m/m) representa al CSH. El ensayo de inhibición se realizó a la concentración de 5 mg/mL (WPHs ALC) y de 30 mg/mL (WPHs FLA). ^{a-c} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos confirmaron que la hidrólisis enzimática mejora la AAH de los WPHs en comparación con sus respectivos CSHs, y que la selección de la proteasa tiene un impacto determinante en la generación de péptidos bioactivos inhibidores de la ECA. En particular, la proteasa de *B. licheniformis* (ALC) permitió obtener un hidrolizado con mayor AAH que la proteasa fúngica (FLA), resaltando la importancia de seleccionar correctamente el tipo de enzima y las condiciones de hidrólisis para potenciar esta bioactividad.

4.1.B.5. Actividad antioxidante

Los procesos de oxidación, tanto en el organismo humano como en matrices alimentarias, tienen un impacto significativo en la salud y en la calidad de los alimentos. El estrés oxidativo, causado por especies reactivas de oxígeno, está asociado con diversas enfermedades, como el cáncer, la aterosclerosis, la diabetes y los trastornos neurodegenerativos. En los alimentos, las reacciones oxidativas pueden comprometer su calidad, generando sabores y texturas indeseables, cambios de color, pérdida de valor nutritivo y reducción de la vida útil. Por ello, la inhibición de la peroxidación lipídica es fundamental tanto para preservar la estabilidad de los alimentos como para prevenir el daño oxidativo en el organismo (Dryáková *et al.*, 2010).

Para abordar este problema, la industria alimentaria ha empleado antioxidantes sintéticos como el hidroxianisol butilado, el galato de propilo y el hidroxitolueno butilado. Sin embargo, su uso excesivo plantea problemas de estabilidad en los alimentos además de posibles riesgos para la salud, lo que ha impulsado la búsqueda de antioxidantes naturales como alternativa (Tacias-Pascacio *et al.*, 2020). En este contexto, los péptidos bioactivos derivados de hidrolizados proteicos han demostrado poseer actividad antioxidante mediante distintos mecanismos, tales como la neutralización de especies reactivas de oxígeno, la captura de radicales libres, la inhibición de la peroxidación lipídica y la quelación de iones metálicos (Brandelli *et al.*, 2015). La actividad antioxidante de estos péptidos depende de su composición de aminoácidos, la cual está determinada por la especificidad de la proteasa utilizada en la hidrólisis (Pihlanto, 2006).

En el presente estudio, se evaluó la actividad antioxidante (AAO) mediante el ensayo colorimétrico ABTS^{•+}, expresando los resultados en términos de capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC). El Trolox, un análogo sintético soluble de la vitamina E, ha sido empleado ampliamente como un agente antioxidante sintético de referencia en este tipo de ensayos *in vitro*. Se analizaron los efectos de la concentración de sustrato y la relación E/S empleados en la hidrólisis sobre la AAO de los hidrolizados. Los resultados se presentan en las **Tablas 21 y 22**, y en la **Figura 31**. Los WPHs mostraron un incremento significativo en la AAO en comparación con los CSHs, con valores de TEAC entre 0,12 y 0,51 mM de Trolox/g, mientras que los CSHs alcanzaron un valor promedio de $0,06 \pm 0,01$ mM de Trolox/g. Este aumento en la AAO se atribuye a la hidrólisis enzimática, la cual expone residuos de aminoácidos con capacidad de donar electrones, permitiendo la estabilización de radicales libres y la interrupción de su reacción en cadena (Peng *et al.*, 2010), resultados que coinciden con los reportados en estudios previos (Dryáková *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2010; de Castro & Sato, 2014; Mann *et al.*, 2015; Eberhardt *et al.*, 2019; Ballatore *et al.*, 2020).

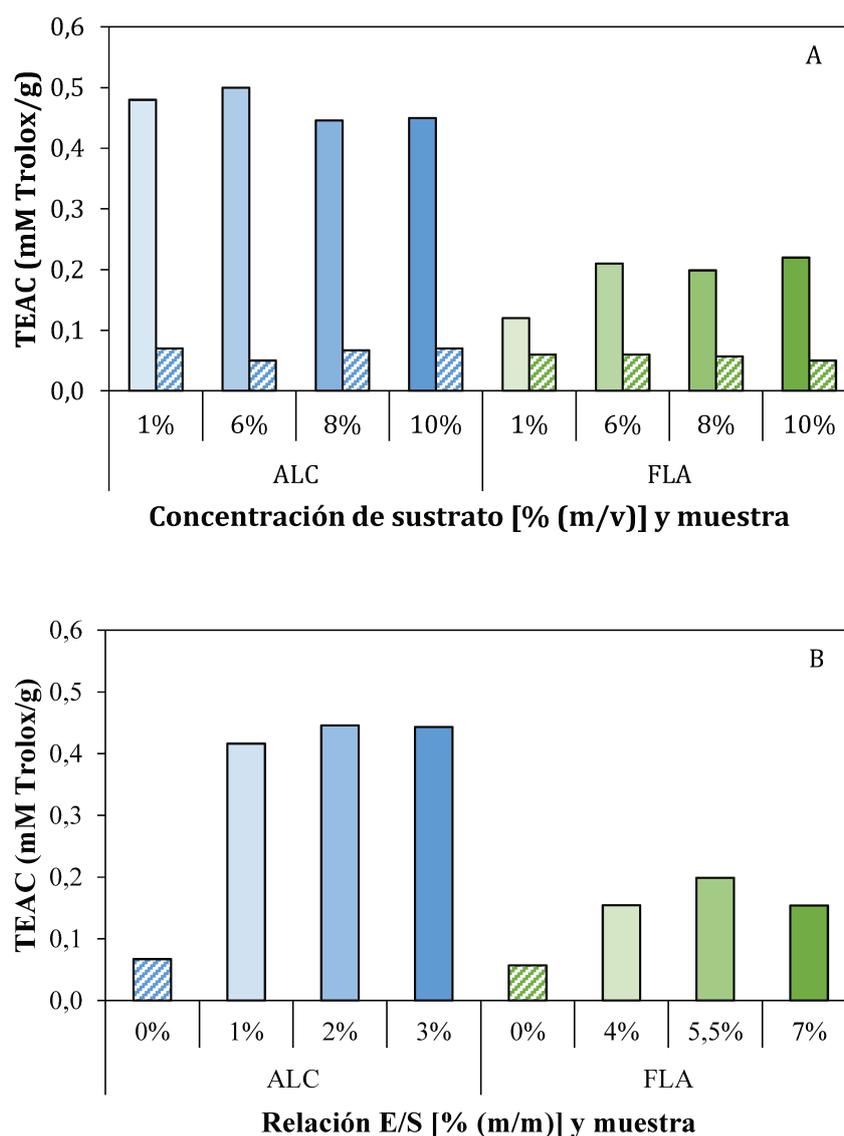


Figura 31. Actividad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) promedio de los WPHs (barras sólidas) y CSHs (barras con líneas). (A) Efecto de la concentración de sustrato [% (m/v) de proteínas]. (B) Efecto de la relación E/S [% (m/m) de proteínas]. La relación E/S de 0% (m/m) representa al CSH.

Respecto al efecto del tipo de enzima, los WPHs obtenidos con ALC presentaron valores de TEAC entre 2 y 4 veces superiores a los generados con FLA, en concordancia con estudios previos sobre hidrolizados de proteínas de suero (Zhang *et al.*, 2013; Mann *et al.*, 2015; da Rosa *et al.*, 2018). Asimismo, se ha informado que ALC favorece la liberación de péptidos con mayor AAO en comparación con FLA en la hidrólisis de aislado proteico de la torta de aceite de calabaza (Vaštag *et al.*, 2011), proteína de okara (Justus *et al.*, 2019) y proteína de maíz (Jin *et al.*, 2016). Estas diferencias pueden atribuirse a la especificidad de cada enzima sobre el sustrato proteico, lo que influye en la liberación de péptidos con distintas masas moleculares, secuencias de aminoácidos y actividades antioxidantes (de Castro & Sato, 2014).

En cuanto a las variables de hidrólisis, en los WPHs ALC no se observó una tendencia clara en función de la concentración de sustrato. Sin embargo, en los WPHs FLA, la AAO fue mayor en el rango de 6-12% (m/v) de proteínas, en comparación con concentraciones inferiores (**Tabla 21** y **Figura 31.A**). La relación E/S no mostró un efecto significativo en la AAO de los WPHs (**Tabla 22** y **Figura 31.B**).

Tabla 21. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la actividad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) de los WPHs y sus respectivos CSHs, en función de la concentración de sustrato [So, % (m/v) de proteínas].

| So [% (m/v)] | TEAC (mM Trolox/g) | | | |
|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | ALC | | FLA | |
| | WPHs | CSHs | WPHs | CSHs |
| 1 | 0,48 ± 0,04 ^{fg} | 0,07 ± 0,00 ^{ab} | 0,12 ± 0,01 ^{bc} | 0,06 ± 0,01 ^a |
| 2 | 0,43 ± 0,04 ^{ef} | * | 0,13 ± 0,00 ^c | * |
| 4 | 0,42 ± 0,01 ^e | * | 0,13 ± 0,00 ^c | * |
| 6 | 0,50 ± 0,00 ^g | 0,05 ± 0,00 ^a | 0,21 ± 0,01 ^d | 0,06 ± 0,01 ^a |
| 8 | 0,45 ± 0,06 ^{ef} | 0,07 ± 0,00 ^a | 0,20 ± 0,00 ^d | 0,06 ± 0,00 ^a |
| 10 | 0,45 ± 0,01 ^{ef} | 0,07 ± 0,02 ^a | 0,22 ± 0,01 ^d | 0,05 ± 0,01 ^a |
| 12 | 0,51 ± 0,02 ^g | * | 0,20 ± 0,01 ^d | * |

(*): valor no determinado. ^{a-g} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 22. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la actividad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) en función de la relación E/S [% (m/m) de proteínas].

| Muestra | Relación E/S [% (m/m)] | TEAC (mM Trolox/g) |
|----------|------------------------|--------------------------|
| WPHs ALC | 0* | 0,07 ± 0,00 ^a |
| | 1 | 0,42 ± 0,02 ^c |
| | 2 | 0,45 ± 0,06 ^c |
| | 3 | 0,44 ± 0,02 ^c |
| WPHs FLA | 0* | 0,06 ± 0,00 ^a |
| | 4 | 0,15 ± 0,00 ^b |
| | 5,5 | 0,20 ± 0,00 ^b |
| | 7 | 0,15 ± 0,00 ^b |

*La relación E/S de 0% (m/m) de proteínas, representa a los correspondientes CSHs. ^{a-c} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

La menor bioactividad observada en los WPHs FLA, en comparación con los WPHs ALC, tanto en AAH como AAO, puede justificarse por las diferencias en el grado de hidrólisis (DH) obtenido en cada grupo de hidrolizados. Un mayor grado de hidrólisis, generalmente superior al 10%, facilita la liberación de péptidos de menor tamaño y mayor actividad biológica (Vioque & Millán, 2005). De esta forma, los hidrolizados WPHs ALC, al poseer un DH más alto, presentaron una mayor concentración y variedad de péptidos bioactivos, lo cual explica la mayor actividad observada. En cambio, el menor grado de hidrólisis de los WPHs FLA ($3,45 \pm 0,47\%$ a $8,67 \pm 0,03\%$) se asocia con la formación de péptidos de mayor tamaño, con menor potencial bioactivo, resultando en una disminución significativa de dichas actividades biológicas.

Los resultados de la **caracterización de los WPHs producidos en experiencias preliminares** de hidrólisis enzimática indicaron que el uso de diferentes preparados enzimáticos de manera individual generó variaciones significativas en las propiedades de los hidrolizados. Los WPHs generados con ALC mostraron un mayor grado de hidrólisis, una degradación más pronunciada de las proteínas nativas del suero, menores índices de hidrofobicidad y una mayor bioactividad en términos de la determinación *in vitro* de las actividades antioxidante y antihipertensiva. Por su parte, a partir de las observaciones realizadas, el uso del preparado enzimático FLA en forma individual no resultó lo suficientemente atractivo como para ser considerado en etapas posteriores del estudio, al menos bajo las condiciones evaluadas en los ensayos preliminares.

Por esta razón, se optó por continuar con la obtención de un ingrediente potencialmente funcional utilizando ALC de manera individual, limitando el uso de FLA en un proceso de combinación enzimática secuencial. Como se mencionó anteriormente, la producción de hidrolizados mediante la combinación de enzimas es un área poco explorada cuando se utiliza WPC como sustrato de hidrólisis. La combinación secuencial de ALC seguida de FLA podría aportar ventajas al perfil sensorial resultante, gracias a la acción específica (y complementaria) de FLA. El empleo de ambos preparados enzimáticos a través de un proceso individual y otro de combinación secuencial permitirá evaluar las diferencias en las propiedades de interés tecnológico y funcional de los WPHs obtenidos, con un enfoque particular en su perfil sensorial tras su incorporación en un alimento.

En cuanto a la **concentración de proteína en el sustrato**, en el rango de trabajo evaluado no se observó una influencia significativa en el perfil de bioactividad obtenido para cada caso en particular. Sin embargo, los menores valores de índice de hidrofobicidad observados para las concentraciones de 6% a 10% (m/v) impulsaron a la selección de la concentración de 8% (m/v) de proteínas para la obtención de los potenciales ingredientes funcionales.

En igual sentido, se seleccionaron las **relaciones E/S** [% (m/m) de proteínas] de 2% para ALC y 5,5% para FLA como las más adecuadas, nuevamente teniendo en cuenta los resultados observados en los índices de hidrofobicidad (ya que en general no afectaron las propiedades bioactivas evaluadas en esta etapa). Finalmente, el **pH** seleccionado para las reacciones enzimáticas posteriores fue de 8,5, un valor intermedio entre los óptimos observados para ALC (pH 9) y FLA (pH 8).

4.2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS INGREDIENTES FUNCIONALES

4.2.A. Obtención de los ingredientes funcionales

Se obtuvieron dos hidrolizados de proteínas de suero como potenciales ingredientes funcionales a partir de soluciones de WPC-80 al 8% (m/v) de proteínas, ajustadas a pH 8,5. El primer hidrolizado, denominado WPH-A, se produjo mediante hidrólisis con ALC durante 60 min. El segundo, llamado WPH-AF, resultó de una hidrólisis secuencial: primero con ALC durante 60 min y luego con FLA durante 120 min. Los tiempos seleccionados para esta combinación secuencial han sido utilizados anteriormente en la hidrólisis de diversas fuentes proteicas, como proteína de colza (Vioque *et al.*, 1999), proteína de canola (Cumby *et al.*, 2008), aislado proteico de torta de aceite de calabaza (Vaštag *et al.*, 2011), proteína de semillas de dátil (Ambigaipalan *et al.*, 2015) y aislado de proteína de garbanzo (Xu *et al.*, 2020).

La combinación enzimática de ALC y FLA en la hidrólisis de proteínas de suero lácteo propuesta en esta Tesis, resulta relevante como alternativa para mitigar el posible desarrollo de sabor amargo asociado al proceso de hidrólisis. Además, el uso de enzimas diferentes podría generar hidrolizados con características distintivas. A su vez, esta estrategia enzimática aporta conocimiento a un área aún poco explorada para el sustrato utilizado.

4.2.B. Caracterización de los ingredientes funcionales

4.2.B.1. Determinación de las propiedades fisicoquímicas

❖ Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis fue monitoreado a lo largo de toda la reacción. En la **Figura 32** se presentan las curvas promedio de la evolución del DH, diferenciadas por lote de obtención del hidrolizado (lote 1 y lote 2). Durante los primeros 60 min (etapa de hidrólisis con ALC), las curvas del ingrediente WPH-AF prácticamente coincidieron con las del WPH-A, un resultado

esperable dado que las condiciones de hidrólisis fueron idénticas para ambos ingredientes en este período.

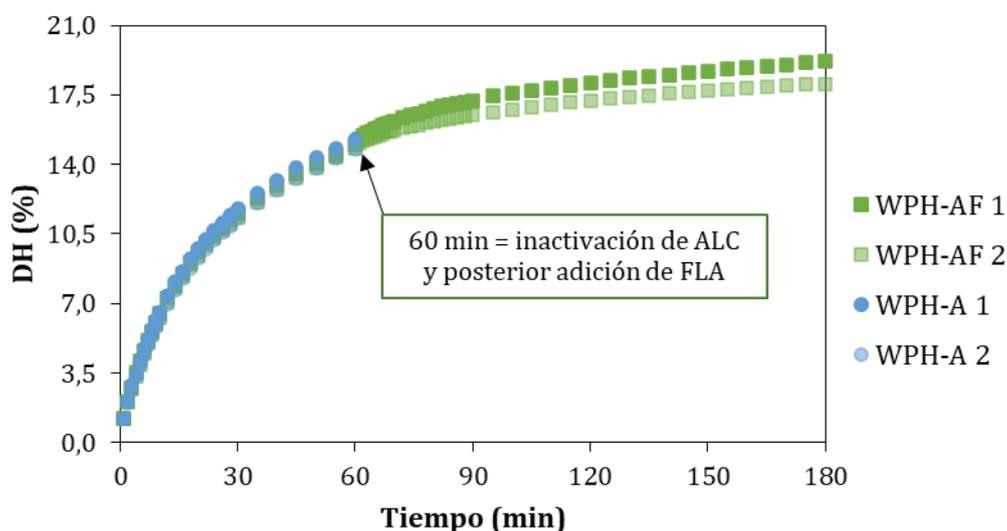


Figura 32. Curvas promedio de progresión del DH de los ingredientes funcionales. Los números 1 y 2 indican el lote de obtención.

La **Tabla 23** muestra el DH final promedio de los ingredientes en cada lote, así como el promedio general. El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre lotes, con un DH mayor en los ingredientes obtenidos en el lote 1. No obstante, estas diferencias pueden considerarse menores y absolutamente lógicas para este tipo de experiencias. Una posible causa de esta variabilidad podría estar relacionada con factores asociados al intervalo transcurrido entre ambos lotes, como una posible disminución en la actividad de los preparados enzimáticos. A pesar de estas diferencias, el DH final alcanzado por el WPH-A fue de $14,94 \pm 0,30\%$, mientras que el del WPH-AF fue de $18,46 \pm 0,80\%$. La hidrólisis adicional con FLA durante 120 min en el WPH-AF, permitió alcanzar un DH superior como resultado de la mayor duración del proceso de hidrólisis.

Tabla 23. Valores promedio y desviación estándar correspondientes al DH (%).

| | WPH-A | WPH-AF |
|-------------------------|------------------|------------------|
| Lote 1 (n=5) | $15,29 \pm 0,15$ | $19,18 \pm 1,00$ |
| Lote 2 (n=9) | $14,74 \pm 0,13$ | $18,07 \pm 0,23$ |
| Promedio general (n=14) | $14,94 \pm 0,30$ | $18,46 \pm 0,80$ |

La combinación de endo y exopeptidasas se prefiere a menudo en lugar de una sola enzima, ya que, en general, permite alcanzar un grado de hidrólisis elevado en un tiempo razonable. En este contexto, la hidrólisis inicial con endopeptidasas incrementa el número de sitios N-terminales, facilitando el posterior ataque de las exopeptidasas (Nchienzia *et al.*, 2010). Sin embargo, en este trabajo, la acción secuencial de endo y exopeptidasas (ALC seguido de FLA) no resultó en una hidrólisis más extensa de las WP, ya que el DH alcanzado fue de $18,46 \pm 0,80\%$, mientras que el WPH obtenido únicamente con ALC, bajo condiciones de hidrólisis similares [concentración de sustrato de 8% (m/v) de proteínas, pH 9, 180 min], presentó un DH superior de $20,88 \pm 0,63\%$ (sección 4.1.B.1.).

Este fenómeno ha sido reportado en estudios sobre la hidrólisis de proteínas de canola (Cumby *et al.*, 2008), semillas de dátil (Ambigaipalan *et al.*, 2015), hongos comestibles (*Agaricus bisporus*) (Kimatu *et al.*, 2017) y okara (Justus *et al.*, 2019). Por el contrario, investigaciones sobre la hidrólisis de hemoglobina porcina (Chang *et al.*, 2007), harina de ave (Nchienzia *et al.*, 2010), harina de gluten de maíz (Jin *et al.*, 2016), proteínas de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) (Chirinos *et al.*, 2018) y garbanzos (Xu *et al.*, 2020), han mostrado que la combinación secuencial de ALC y FLA favoreció la obtención de hidrolizados con valores de DH más altos. Pang *et al.* (2024a) indicaron que la hidrólisis de WPI con una mezcla de endo y exopeptidasas mejoró la eficiencia del proceso, logrando un DH más alto en comparación con el uso de cada proteasa por separado. Estas discrepancias en los resultados pueden atribuirse a los múltiples factores que afectan el DH, como la especificidad de las enzimas utilizadas, el origen del sustrato, la relación enzima/sustrato, la duración de la hidrólisis y otros parámetros de reacción (Kimatu *et al.*, 2017).

❖ Potencial zeta

Las proteínas contienen grupos ionizables, como los grupos carboxilo y amino, cuya ionización varía según el pH del medio (Xia, 2007). Por lo tanto, la carga total de una molécula proteica depende del pH de la solución y de la composición relativa de sus aminoácidos (Peña Díaz *et al.*, 1980). El pH en el que la carga neta de la proteína es cero se denomina punto isoeléctrico (pI) (Xia, 2007). En este estado, el número total de cargas negativas se equilibra con el de cargas positivas presentes en la molécula, lo que puede reducir su solubilidad e incluso provocar su precipitación (Peña Díaz *et al.*, 1980). Por lo tanto, el pI influye en la estabilidad y funcionalidad de las proteínas, lo que hace esencial su comprensión para aplicaciones como ingrediente alimentario.

Los valores de potencial zeta de los ingredientes se determinaron en un rango de pH de 3 a 7, y los resultados se presentan en la **Figura 33**. Los valores de pI obtenidos fueron de 3,40 para el

WPH-AF, de 3,55 para el WPH-A y de 4,05 para el WPC-80. Esto indica que, en esos pH, los compuestos presentes en cada muestra podrían ser menos solubles y más propensos a la precipitación. La reducción del pI en los WPHs en comparación con el WPC-80 también se ha observado en la hidrólisis de concentrado de proteína de lenteja y aislado de proteína de garbanzo con ALC, lo que sugiere diferencias en la exposición de grupos ionizables y una menor cantidad de grupos cargados positivamente en los hidrolizados a pH bajo (Ghribi *et al.*, 2015; Vogelsang-O'Dwyer *et al.*, 2023).

Ambos WPH exhibieron un comportamiento muy similar, con curvas de potencial zeta cercanas entre sí. En el rango de pH entre 4,5 y 7, las curvas de los WPHs fueron semejantes a la de la del WPC-80, lo que sugiere que la hidrólisis enzimática, tanto en el proceso individual como en el secuencial, no generó cambios significativos en el potencial zeta de las WP en ese intervalo de pH.

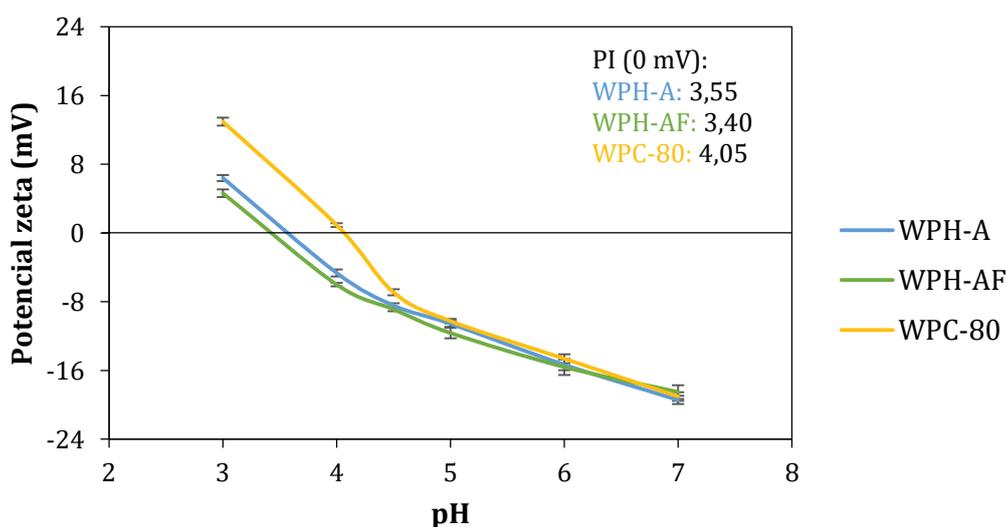


Figura 33. Valores de potencial zeta en función del pH y pI de las muestras analizadas.

❖ Distribución de tamaño molecular

La distribución del tamaño de partícula y el diámetro hidrodinámico de los ingredientes funcionales y del WPC-80 se presentan en la **Figura 34**. Los resultados reflejan que la hidrólisis con ALC en el WPH-A redujo levemente el tamaño de partícula respecto al WPC-80, lo cual es consistente con la fragmentación de las proteínas. Por el contrario, la hidrólisis secuencial en el WPH-AF no generó una reducción adicional en el diámetro hidrodinámico respecto al WPH-A y, de hecho, este resultó similar al del WPC-80.

En concordancia con lo observado para el WPH-A, Pang *et al.* (2024a, 2024b) reportaron que, en sus hidrolizados de WPI obtenidos con diversas proteasas, la hidrólisis enzimática, tanto en aplicaciones individuales como combinadas, generalmente resultó en una reducción del tamaño de partícula. Sin embargo, en un hidrolizado obtenido mediante hidrólisis individual con Protina AY50C (endopeptidasa de *Bacillus licheniformis*), se observó un aumento del tamaño de partícula, lo que sugiere que la modificación de la estructura proteica inducida por esta proteasa favoreció la agregación de los péptidos generados durante el proceso (Pang *et al.*, 2024a). Este último comportamiento podría explicar el tamaño de partícula del WPH-AF.

Más allá de las pequeñas diferencias observadas, los diámetros obtenidos en este trabajo estuvieron dentro del mismo orden de magnitud y, en términos generales, fueron bastante similares.

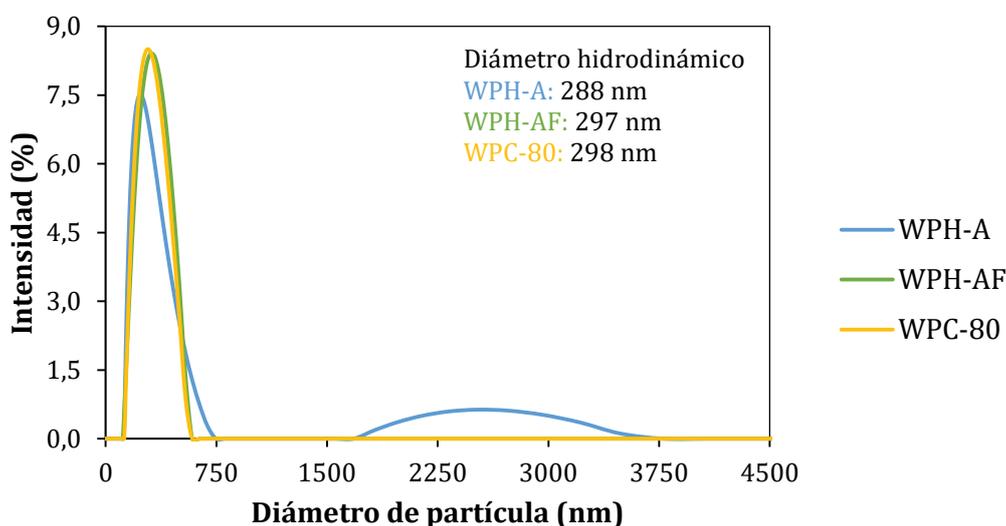


Figura 34. Distribución de tamaño de partícula según intensidad y diámetro hidrodinámico.

❖ Electroforesis

El perfil proteico (distribución aproximada del peso molecular) obtenido por SDS-PAGE se presenta en la **Figura 35**. Este análisis confirma la degradación de β -LG y α -LA en los hidrolizados (carriles 3 y 4), así como la escisión de otras proteínas de mayor peso molecular presentes en el WPC-80 (carril 2).

En ambos hidrolizados, se detectó la formación de péptidos de baja masa molecular, lo que indica una hidrólisis eficiente. Además, se observó una diferencia mínima en la intensidad del color de las bandas entre los hidrolizados. En el WPH-A (carril 3), las bandas fueron ligeramente más intensas, lo que sugiere que, en el WPH-AF (carril 4), la hidrólisis adicional con FLA pudo

haber fragmentado aún más los péptidos, generando compuestos de menor peso molecular que no quedaron retenidos en el gel (y por lo tanto no interaccionaron con el colorante de tinción). Esta reducción en la intensidad de color se debe a la menor disponibilidad de sitios de unión para el colorante Coomassie Blue R-250, consecuencia de la intensificación de la hidrólisis enzimática.

Estos resultados son coherentes con el mayor DH observado en el WPH-AF, ya que ello conduce a la fragmentación en péptidos más pequeños, reduciendo la cantidad de estructuras detectables en SDS-PAGE. Asimismo, la reducción en el tamaño proteico y la exposición de nuevos grupos ionizables podrían explicar las diferencias en el potencial zeta, donde los WPHs mostraron un pI menor que el WPC-80.

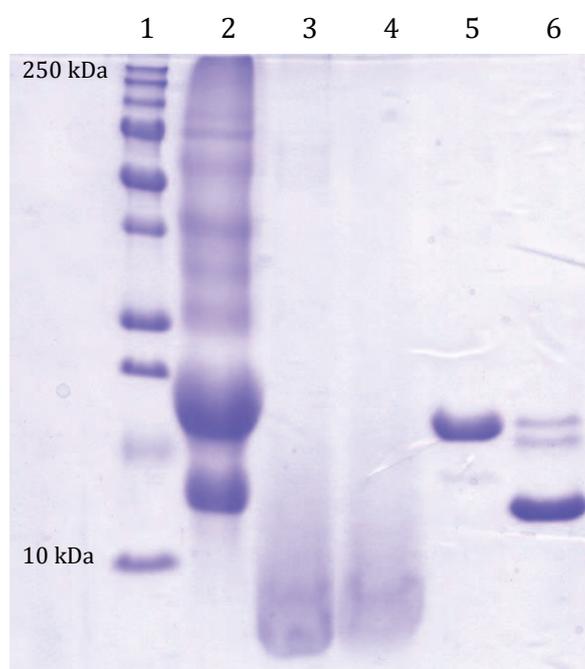


Figura 35. Perfil SDS-PAGE. **Carril 1:** marcadores de pesos moleculares Bio-rad; **Carril 2:** WPC-80 (10 mg/mL); **Carril 3:** WPH-A (30 mg/mL); **Carril 4:** WPH-AF (30 mg/mL); **Carril 5:** β -LG; **Carril 6:** α -LA.

❖ Perfil peptídico

Los cromatogramas obtenidos por RP-HPLC se presentan en la **Figura 36**. El perfil peptídico de ambos ingredientes funcionales mostró un patrón general similar, con una distribución compleja de numerosos picos entre 20 y 45 min, lo que indica la presencia de una mezcla heterogénea de péptidos con diferente grado de hidrofobicidad y confirma la hidrólisis de las proteínas nativas del lactosuero.

En contraste, el WPC-80 exhibió un perfil característico de proteicas intactas, con picos coincidentes con los estándares de BSA, α -LA y β -LG. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en SDS-PAGE, donde se evidenciaron las proteínas nativas en el WPC-80 y su degradación en los WPHs, confirmando la fragmentación proteica inducida por la hidrólisis enzimática.

Si bien el WPH-A y el WPH-AF presentaron perfiles cromatográficos similares, se observaron diferencias en la intensidad relativa de ciertos picos (como en la región de 30 min de corrida), lo que podría indicar una mayor acumulación de algunos péptidos específicos en esa zona (**Figura 36**). Estas variaciones sutiles probablemente se deban a las diferencias en la especificidad de las enzimas intervinientes para obtener cada hidrolizado.

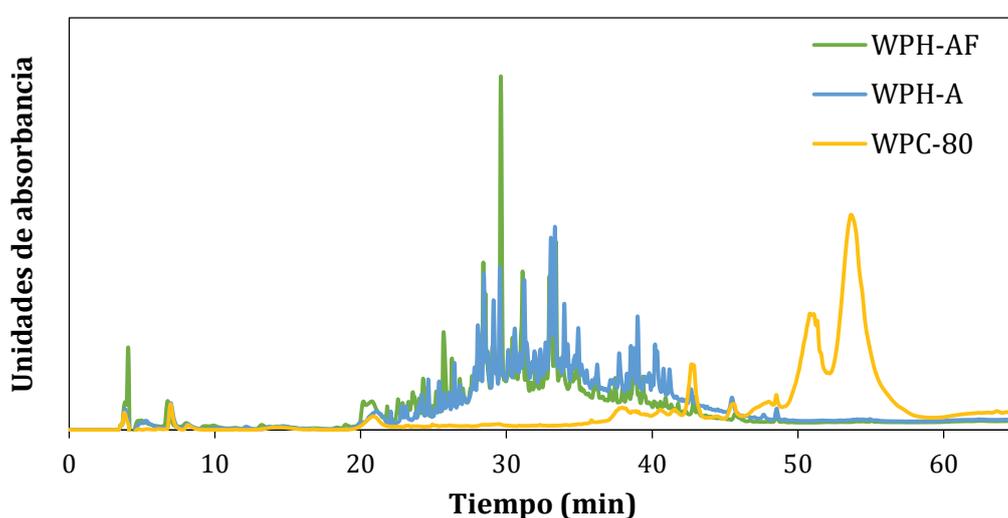


Figura 36. Perfiles cromatográficos obtenidos por RP-HPLC.

❖ Índice de hidrofobicidad

Los valores del índice de hidrofobicidad obtenidos a partir de los perfiles cromatográficos (RP-HPLC), se presentan en la **Tabla 24** y en la **Figura 37**. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras en la distribución de péptidos/proteínas en las zonas de hidrofobicidad baja (HB), media (HM) y alta (HA).

Las principales diferencias se observaron entre los ingredientes funcionales y el WPC-80, donde los WPHs mostraron un índice de hidrofobicidad significativamente menor en la zona de HA y un mayor índice en la zona de HB. Este comportamiento es coherente con lo esperado de la hidrólisis enzimática, ya que la fragmentación de las proteínas tiende a generar péptidos más pequeños y con mayor afinidad por la fase acuosa.

Además, los ingredientes funcionales se diferenciaron principalmente en la zona de HM, donde el WPH-A presentó una mayor proporción de compuestos (16,37%) en comparación con el WPH-AF (11,99%), lo que sugiere que la hidrólisis con ALC generó una mayor cantidad de péptidos que se ubican en la zona de hidrofobicidad intermedia del cromatograma. Por otra parte, en el WPH-AF se observó una menor proporción de péptidos en la zona de HA y un aumento en la de HB respecto al WPH-A. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

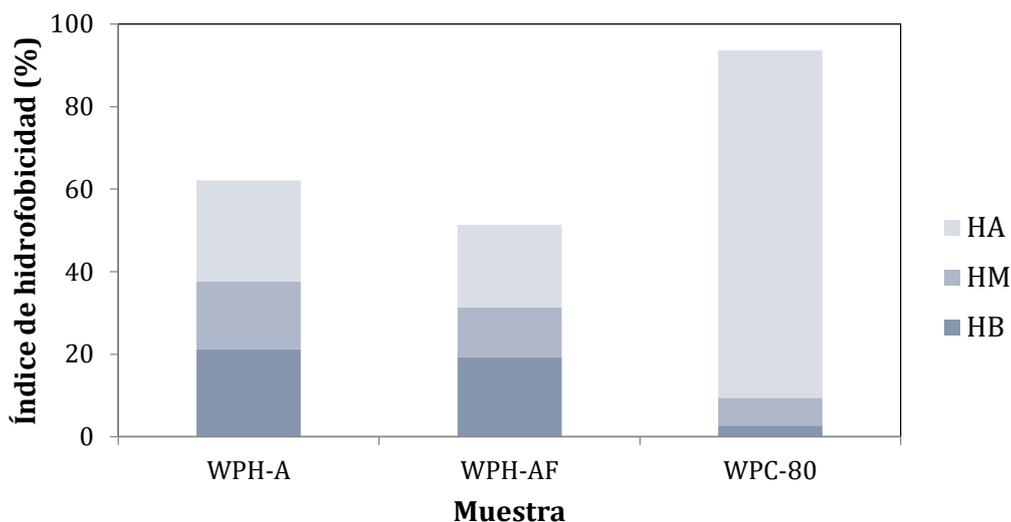


Figura 37. Índice de hidrofobicidad promedio. **HA:** hidrofobicidad alta; **HM:** hidrofobicidad media; **HB:** hidrofobicidad baja.

Tabla 24. Valores promedio y desviación estándar correspondientes al índice de hidrofobicidad.

| Muestra | Índice de hidrofobicidad (%) | | |
|---------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | HB | HM | HA |
| WPH-A | 21,19 ± 3,10 ^b | 16,37 ± 0,65 ^c | 24,58 ± 2,10 ^a |
| WPH-AF | 19,32 ± 1,86 ^b | 11,99 ± 0,28 ^b | 20,06 ± 1,46 ^a |
| WPC-80 | 2,69 ± 0,81 ^a | 6,74 ± 0,57 ^a | 84,21 ± 0,95 ^b |

^{a-c} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Por otra parte, el WPC-80 mostró índices de hidrofobicidad similares a los obtenidos en los CSHs a una concentración de sustrato de 8% (m/v) de proteínas y pH 8 y 9 (sección 4.1.B.3), lo que sugiere que el calentamiento a 50°C durante 180 min no produjo cambios significativos en la estructura de las WP y, en consecuencia, no alteró su hidrofobicidad (evaluada por RP-HPLC).

Finalmente, tanto la hidrólisis con ALC como la secuencial con ALC y FLA resultaron en compuestos de menor hidrofobicidad, en comparación con el WPC-80. Esto sugiere que la hidrólisis no solo modificó el tamaño de los péptidos, sino también su perfil de hidrofobicidad, lo que podría luego tener implicancias funcionales en términos de solubilidad y perfil sensorial.

Desde una perspectiva sensorial, la baja presencia de componentes en la zona de HA es favorable, ya que los péptidos hidrófobos están comúnmente asociados con el desarrollo de sabor amargo. Aunque esta metodología permite identificar la posible presencia de compuestos hidrófobos (con potencial impacto en el sabor de un alimento), el perfil sensorial de las muestras de hidrolizados incorporadas a una matriz se evaluó en la etapa final de este trabajo de Tesis.

❖ Perfil de aminoácidos libres

Se evaluó la presencia de 18 aminoácidos libres en los ingredientes funcionales obtenidos. Las concentraciones medias (mg de aminoácido/g de ingrediente) y la desviación estándar de cada aminoácido detectado, así como la suma total, se presentan en la **Tabla 25**. En el WPH-A, se identificaron solo 3 aminoácidos, con una concentración total de $1,83 \pm 0,52$ mg/g. En contraste, en el WPH-AF se detectaron 15 aminoácidos, alcanzando una concentración total de $58,38 \pm 3,18$ mg/g (**Figura 38**).

La diferencia en el contenido de aminoácidos libres entre ambos WPHs puede atribuirse al tipo de proteasa empleada en su obtención. La hidrólisis con ALC se basa en la ruptura de enlaces peptídicos en regiones internas de la cadena polipeptídica, generando principalmente péptidos de mayor tamaño. En cambio, FLA actúa tanto como endoproteasa como exopeptidasa, lo que permite la hidrólisis desde los extremos de la cadena, favoreciendo la liberación de aminoácidos libres. Asimismo, el tiempo adicional de hidrólisis empleado con FLA podría haber influido en la liberación diferencial de los aminoácidos presentes en las proteínas lácteas.

Como era de esperarse, el uso individual de ALC (WPH-A) resultó en una producción muy baja de aminoácidos libres, mientras que la combinación con FLA (WPH-AF) promovió una liberación significativamente mayor de estos compuestos. En línea con estos resultados, [Nchienzia et al. \(2010\)](#) reportaron que la hidrólisis secuencial con FLA de proteínas de subproductos avícolas previamente hidrolizadas con ALC, también resultó en un aumento significativo del contenido de aminoácidos libres, en comparación con el uso individual de cada proteasa.

La mayor cantidad de aminoácidos libres en el WPH-AF se correlaciona con los resultados previos:

- *Perfil peptídico (RP-HPLC)*: Aunque el WPH-A y el WPH-AF presentaron un patrón peptídico similar, las diferencias en la intensidad de algunos picos sugiere una mayor fragmentación en el WPH-AF, lo que estaría asociado con una mayor liberación de aminoácidos.
- *SDS-PAGE*: La reducción adicional en la intensidad de bandas en el WPH-AF indica una degradación proteica más extensa, con la generación de fragmentos de menor peso molecular, en línea con el aumento de aminoácidos libres.
- *Potencial zeta y pI*: El pI más bajo en el WPH-AF concuerda con una mayor exposición de grupos ionizables, reflejando el incremento en la cantidad de aminoácidos liberados.

En conjunto, estos resultados confirman que la hidrólisis adicional con FLA no solo promovió una mayor fragmentación peptídica, sino que también favoreció la liberación de aminoácidos libres, lo que podría tener implicancias en la funcionalidad, la solubilidad y el perfil sensorial de los hidrolizados.

Tabla 25. Valores promedio y desviación estándar correspondientes al contenido de aminoácidos libres.

| Aminoácido | Tiempo de retención (min) | mg de aminoácido/g de ingrediente | |
|--------------------|---------------------------|-----------------------------------|--------------|
| | | WPH-A | WPH-AF |
| Asparagina (Asn) | 10,07 | | 2,88 ± 0,11 |
| Serina (Ser) | 11,56 | | 3,84 ± 0,10 |
| Histidina (His) | 12,63 | | 2,44 ± 0,43 |
| Glutamina (Gln) | 13,06 | | 2,95 ± 0,10 |
| Glicina (Gly) | 17,60 | | 0,44 ± 0,06 |
| Arginina (Arg) | 18,35 | | 1,72 ± 0,05 |
| Alanina (Ala) | 21,03 | 0,38 ± 0,12 | 2,56 ± 0,10 |
| Tirosina (Tyr) | 21,47 | | 2,66 ± 0,03 |
| Triptófano (Trp) | 26,17 | 0,94 ± 0,23 | 2,86 ± 0,29 |
| Metionina (Met) | 26,91 | | 1,84 ± 0,12 |
| Valina (Val) | 27,47 | | 4,55 ± 0,06 |
| Fenilalanina (Phe) | 28,53 | | 3,49 ± 0,04 |
| Isoleucina (Ile) | 30,33 | | 4,35 ± 0,06 |
| Leucina (Leu) | 31,12 | 0,51 ± 0,17 | 10,99 ± 0,37 |
| Lisina (Lys) | 35,24 | | 10,81 ± 1,39 |
| Total | | 1,83 ± 0,52 | 58,38 ± 3,18 |

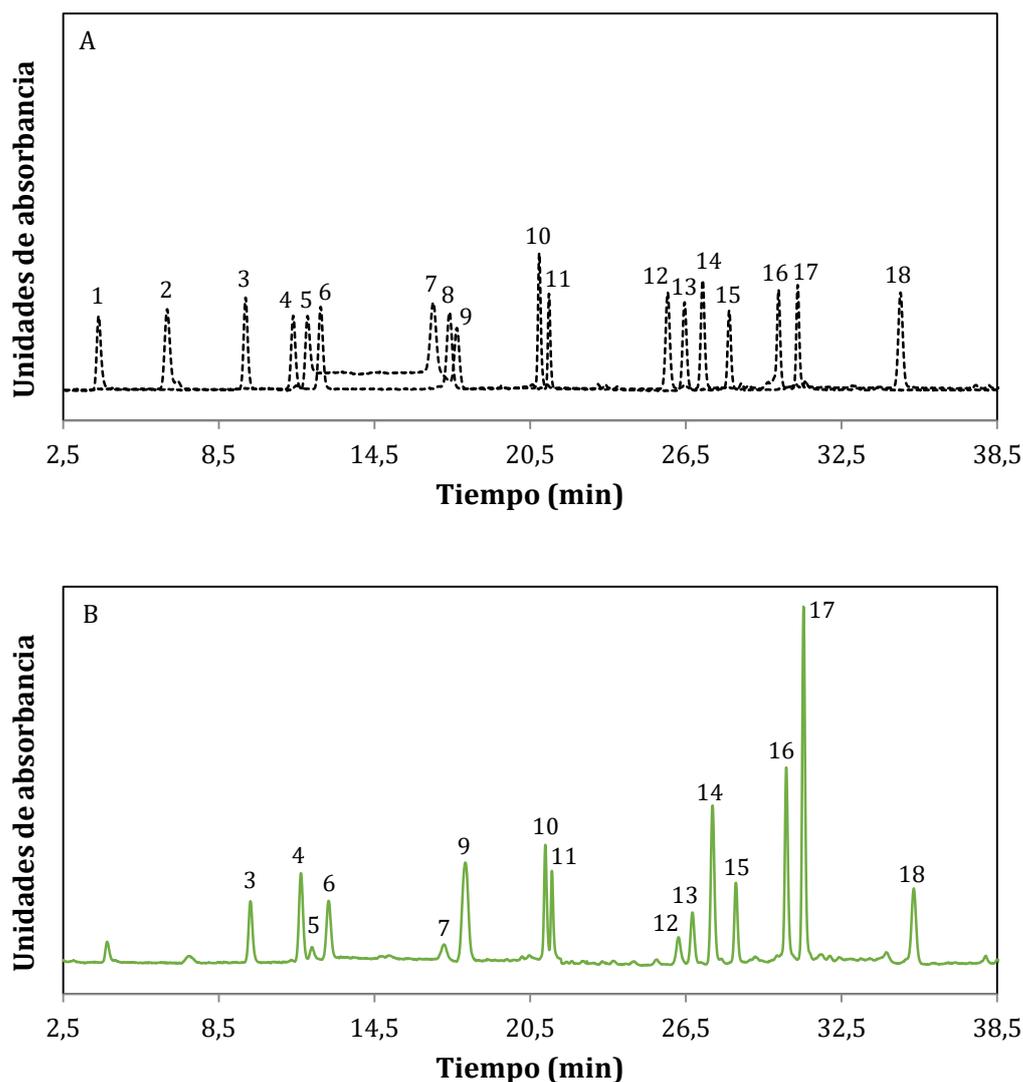


Figura 38. Perfil de aminoácidos libres obtenidos por RP-HPLC. (A) Mezcla de estándares de aminoácidos. (B) WPH-AF. **1** (Asp); **2** (Glu); **3** (Asn); **4** (Ser); **5** (His); **6** (Gln); **7** (Gly); **8** (Thr); **9** (Arg); **10** (Ala); **11** (Tyr); **12** (Trp); **13** (Met); **14** (Val); **15** (Phe); **16** (Ile); **17** (Leu); **18** (Lys).

La **caracterización fisicoquímica** de los ingredientes funcionales mostró que tanto la hidrólisis con ALC como la hidrólisis secuencial con ALC seguida de FLA redujeron el pI, promovieron la degradación de las proteínas del suero y generaron compuestos con hidrofobicidad baja a media en comparación con el WPC-80.

Si bien las diferencias entre el WPH-A y el WPH-AF fueron sutiles, el WPH-AF presentó los valores más altos en el grado de hidrólisis, así como en el perfil y contenido de aminoácidos libres. Estas observaciones podrían influir en sus propiedades funcionales y bioactividad, aspectos que se abordarán en secciones posteriores.

4.2.B.2. Determinación de la composición

❖ Contenido de materia grasa, proteínas y humedad

Los valores promedio de materia grasa, proteínas y humedad se presentan en la **Tabla 26**. El contenido de **materia grasa** no mostró diferencias significativas entre las muestras, con un valor promedio de $4,94 \pm 1,04\%$.

En cuanto al **contenido de proteína láctea**, se encontraron algunas diferencias estadísticamente significativas, siendo mayor en el WPC-80 y WPH-A, y menor en el WPH-AF, aunque todas las muestras presentaron valores en el mismo orden de magnitud (alrededor del 65%). En concordancia con lo observado para WPH-AF, [Severin & Xia \(2006\)](#) reportaron que el contenido de proteína en los WPHs obtenidos con Alcalase o Protamex disminuyó tras la hidrólisis, posiblemente debido a un mayor contenido de cenizas. En el presente estudio, se observó que el contenido de cenizas fue de $6,79 \pm 1,57\%$ en WPC-80, $13,52 \pm 1,19\%$ en WPH-A y $20,19 \pm 0,21\%$ en WPH-AF, lo cual es consistente, ya que WPH-AF presentó un mayor DH y experimentó un proceso de obtención más prolongado, requiriendo un mayor consumo de NaOH. La adición de NaOH durante la hidrólisis favorece la acumulación de cenizas y, en consecuencia, reduce la cantidad de nitrógeno por unidad másica, reflejándose en una aparente disminución del contenido proteico.

Finalmente, los ingredientes funcionales presentaron un menor **contenido de humedad** en comparación con el WPC-80, en concordancia con lo reportado por [Severin & Xia \(2006\)](#). Esto podría estar relacionado con diferencias en el proceso de secado. Dado que el WPC-80 se obtiene mediante secado por aspersión, es posible que sea más susceptible a la absorción de humedad en comparación con los hidrolizados, que fueron obtenidos por liofilización.

Tabla 26. Valores promedio y desviación estándar correspondientes al contenido de materia grasa, proteínas y humedad.

| Muestra | Materia grasa (%) | Proteínas (%) | Humedad (%) |
|---------|-------------------|--------------------|-------------------|
| WPH-A | $5,58 \pm 0,08$ | $65,75 \pm 0,97^b$ | $5,00 \pm 0,40^a$ |
| WPH-AF | $5,51 \pm 0,76$ | $62,30 \pm 0,68^a$ | $5,57 \pm 0,02^a$ |
| WPC-80 | $3,71 \pm 0,55$ | $67,81 \pm 0,74^b$ | $7,14 \pm 0,53^b$ |

^{a-b} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Columnas sin letras indican que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

❖ *Contenido de carbono*

Los valores determinados para carbono total (TC), carbono orgánico (TOC) y carbono inorgánico (TIC) se presentan en la **Tabla 27**. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en estas mediciones entre las muestras evaluadas. Esto indica que el WPC-80 y sus hidrolizados presentan un perfil de carbono similar, lo que sugiere una homogeneidad en su composición química.

Tabla 27. Valores promedio y desviación estándar correspondientes al contenido de carbono total (TC), orgánico (TOC) e inorgánico (TIC).

| Muestra | Contenido de carbono (mg/g) | | |
|---------|-----------------------------|----------------|----------------|
| | TIC | TOC | TC |
| WPH-A | 3,45 ± 0,08 | 499,77 ± 13,31 | 503,21 ± 13,40 |
| WPH-AF | 3,37 ± 0,45 | 629,03 ± 84,08 | 632,40 ± 83,93 |
| WPC-80 | 3,01 ± 0,03 | 508,96 ± 3,23 | 511,97 ± 3,26 |

Columnas sin letras indican que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

❖ *Contenido de cationes*

El contenido de cationes se presenta en la **Tabla 28**. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de Ca, P, K y Mg entre las muestras. Sin embargo, el contenido de Na fue significativamente mayor en los hidrolizados, con valores entre 17 y 22 veces superiores al del WPC-80. Esto se debe principalmente a la adición de NaOH, tanto para el ajuste de pH del sustrato antes de la hidrólisis como durante la reacción enzimática para mantener un pH constante.

El mayor contenido de Na en el WPH-AF, en comparación con el WPH-A, se explica porque esta muestra requirió un ajuste adicional de pH antes de la adición de FLA, además de haber experimentado una hidrólisis más extensa, lo que implicó un mayor uso de NaOH durante el proceso. Este mayor contenido de sodio es consistente con el contenido de ceniza observado en las muestras, siendo mayor en el WPH-AF ($20,19 \pm 0,21\%$), seguido de WPH-A ($13,52 \pm 1,19\%$) y WPC-80 ($6,79 \pm 1,57\%$). La acumulación de cenizas, producto de la adición de NaOH durante la obtención de los hidrolizados, podría afectar ciertas propiedades sensoriales de los ingredientes, particularmente la percepción de algunos sabores desagradables (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011). Esto podría condicionar su aplicación en matrices alimentarias, dependiendo de la cantidad utilizada, aspecto que se evaluará debidamente y con más detalle a través del análisis sensorial realizado en la etapa final del presente trabajo de Tesis.

Tabla 28. Valores promedio y desviación estándar correspondientes al contenido de cationes.

| Muestra | Contenido de cationes (%) | | | | |
|---------|---------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------------------|
| | Ca | P | K | Mg | Na |
| WPH-A | 0,42 ± 0,05 | 0,30 ± 0,01 | 0,52 ± 0,04 | 0,18 ± 0,01 | 1,83 ± 0,06 ^b |
| WPH-AF | 0,41 ± 0,03 | 0,30 ± 0,01 | 0,53 ± 0,04 | 0,17 ± 0,00 | 2,40 ± 0,09 ^c |
| WPC-80 | 0,43 ± 0,05 | 0,30 ± 0,01 | 0,52 ± 0,05 | 0,18 ± 0,00 | 0,11 ± 0,00 ^a |

^{a-c} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Columnas sin letras indican que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

4.2.B.3. Determinación de las propiedades funcionales

Las propiedades funcionales de las proteínas determinan su utilidad en la industria alimentaria, ya que influyen tanto en la experiencia sensorial del consumidor como en la estabilidad del producto a lo largo de su vida útil (Kilara & Vaghela, 2018). Estas propiedades pueden clasificarse en dos grupos principales: (1) propiedades hidrodinámicas, relacionadas con la hidratación, que incluyen la absorción de agua, solubilidad, viscosidad y gelificación; (2) propiedades tensioactivas, que abarcan la emulsificación, formación de espuma y de películas (de Castro *et al.*, 2015).

La modificación de proteínas mediante tratamientos físicos, químicos o enzimáticos altera su conformación y estructura, impactando directamente en sus propiedades fisicoquímicas y funcionales. Los péptidos generados por hidrólisis enzimática suelen tener tamaños moleculares más pequeños y una estructura secundaria menos compleja en comparación con las proteínas nativas. Como resultado, se espera que presenten mayor solubilidad cerca del pI, menor viscosidad y modificaciones en sus propiedades espumantes, gelificantes y emulsionantes (Severin & Xia, 2006).

En el presente trabajo de Tesis, se evaluaron diversas propiedades funcionales de los ingredientes obtenidos, comparándolos con el WPC-80 para analizar el impacto de la hidrólisis enzimática, tanto de manera individual como mediante la combinación secuencial de proteasas. Además, se consideraron distintas variables que pueden influir en estas propiedades.

❖ Solubilidad

La solubilidad es una propiedad clave para la aplicación de proteínas en la industria alimentaria, ya que influye en la textura, estabilidad y aceptación sensorial de los productos. Proteínas poco solubles pueden generar una textura arenosa y una apariencia poco atractiva,

mientras que proteínas altamente solubles mejoran la dispersabilidad y estabilidad coloidal, lo que es especialmente relevante en bebidas y suplementos nutricionales (Chabanon *et al.*, 2007; Aryee *et al.*, 2018). Además, otras propiedades funcionales como la formación de espuma, emulsificación y gelificación dependen de una solubilidad adecuada (Krunic *et al.*, 2018).

Los valores de solubilidad de las suspensiones al 8% (m/v) en función del pH se presentan en la **Tabla 29** y la **Figura 39**. Todas las muestras mostraron una alta solubilidad (mayor al 80%). En particular, los ingredientes funcionales alcanzaron valores superiores al 98%, sin diferencias significativas entre el WPH-A y el WPH-AF ($98,86 \pm 1,96\%$ y $99,02 \pm 2,29\%$, respectivamente). En contraste, el WPC-80 presentó valores más bajos ($92,48 \pm 5,07\%$), lo que confirma que la hidrólisis enzimática mejora la solubilidad de las proteínas del suero. Estos resultados coinciden con los reportados por Severin & Xia (2006) y Di Filippo *et al.* (2024), quienes observaron un incremento en la solubilidad tras la hidrólisis de WPC-80 y WPI con ALC y Protamex. Asimismo, Xu *et al.* (2020) informaron que los hidrolizados de proteínas de garbanzo obtenidos con ALC mostraron una solubilidad comparable a los generados mediante una hidrólisis secuencial ALC-FLA. Los resultados sugieren que la hidrólisis con ALC fue suficiente para mejorar la solubilidad, no apreciándose cambios significativos luego de la hidrólisis adicional con FLA.

Tabla 29. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la solubilidad en función del pH.

| pH | Solubilidad (%) | | |
|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | WPH-A | WPH-AF | WPC-80 |
| 3,5 | $100,00 \pm 0,00^c$ | $100,00 \pm 0,00^c$ | $87,20 \pm 8,02^a$ |
| 4,5 | $95,40 \pm 0,46^{bc}$ | $96,43 \pm 5,04^{bc}$ | $90,01 \pm 1,83^{ab}$ |
| 6,5 | $100,00 \pm 0,00^c$ | $100,00 \pm 0,00^c$ | $96,05 \pm 5,59^{bc}$ |
| 7,0 | $100,00 \pm 0,00^c$ | $100,00 \pm 0,00^c$ | $94,88 \pm 3,71^{bc}$ |
| 8,5 | $98,88 \pm 1,59^c$ | $98,65 \pm 1,56^c$ | $94,28 \pm 2,65^{bc}$ |
| Muestra (M) | | | S |
| pH | | | NS |
| Interacción M-pH | | | NS |

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. S: Efecto significativo ($p < 0,05$). NS: Efecto no significativo ($p > 0,05$). ^{a-c} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

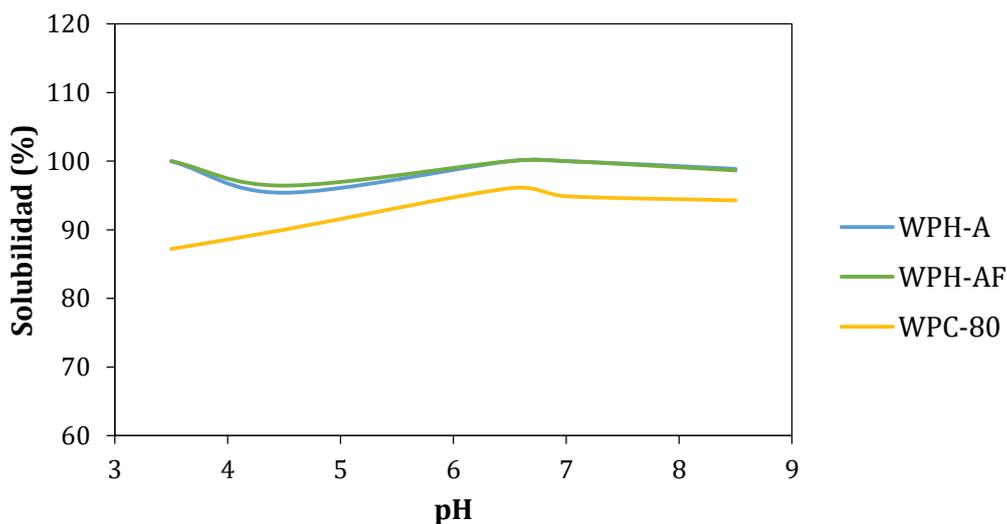


Figura 39. Solubilidad promedio en función del pH.

El efecto del pH sobre la solubilidad no fue estadísticamente significativo. Sin embargo, es relevante destacar que los ingredientes funcionales alcanzaron una solubilidad del 100% a pH 3,5, cercano a sus respectivos pI (3,55 para el WPH-A y 3,40 para el WPH-AF). En comparación, el WPC-80, cuyo pI fue 4,05, mostró una solubilidad inferior en torno a este valor, con $87,20 \pm 8,02\%$ a pH 3,5 y $90,01 \pm 1,83\%$ a pH 4,5. La solubilidad de las proteínas está influenciada por su carga neta, que varía con el pH. En general, las proteínas son más solubles en condiciones ácidas o alcalinas, ya que la repulsión electrostática entre las moléculas favorece su disolución (Pelegri & Gasparetto, 2005). En cambio, en el pI, la solubilidad disminuye porque la interacción proteína-proteína se vuelve más favorable que la interacción proteína-agua, lo que promueve la agregación e incluso la precipitación (Kronic *et al.*, 2018; Piornos *et al.*, 2015).

Las proteínas del lactosuero se destacan por su alta solubilidad en un amplio rango de pH, permaneciendo solubles cerca de su pI, lo que las hace particularmente útiles en aplicaciones como bebidas (Kilara & Vaghela, 2018). La mejora en solubilidad observada en los WPHs en comparación con el WPC-80 resalta su potencial de empleo como ingredientes funcionales, especialmente en productos líquidos o ácidos. El incremento de la solubilidad en los hidrolizados se atribuye a la reducción del tamaño molecular y la exposición de nuevos grupos ionizables, lo que aumenta su hidrofiliidad (Mahmoud & Cordle, 2000). No obstante, algunos estudios han reportado que la hidrólisis puede reducir la solubilidad si se exponen demasiados grupos hidrofóbicos, dependiendo del tipo de enzima utilizada y las condiciones de reacción (de Castro *et al.*, 2015; Pang *et al.*, 2024a; Pang *et al.*, 2024b).

❖ *Estabilidad térmica*

Los tratamientos térmicos son fundamentales en la industria alimentaria, ya que permiten controlar el crecimiento microbiano y modificar la estructura de los alimentos (Ashaolu *et al.*, 2023). Las proteínas del suero son particularmente susceptibles a alteraciones estructurales durante el calentamiento, lo que puede llevar a su desnaturalización y pérdida de solubilidad (Jeewanthi *et al.*, 2015). La desnaturalización inducida por calor vuelve insolubles a las proteínas del suero cerca de su pI, lo que hace que la solubilidad a pH 4,6 sea útil como indicador de desnaturalización (Morr & Ha, 1993).

El aumento de la temperatura incrementa la energía cinética de las moléculas, provocando vibraciones que afectan los enlaces no covalentes responsables de estabilizar la estructura proteica (Zhang *et al.*, 2021). La ruptura de las estructuras secundaria y terciaria expone los grupos hidrófobos originalmente ocultos, favoreciendo la agregación, coagulación y precipitación de las proteínas (Pelegrine & Gasparetto, 2005). La desnaturalización de las proteínas puede ser reversible o irreversible, dependiendo de la temperatura y la duración del tratamiento térmico. En general, entre 60°C y 70°C, las proteínas del suero sufren un desdoblamiento estructural reversible, mientras que a temperaturas más altas se observa una agregación irreversible (Gauthier *et al.*, 1993).

La estabilidad térmica de las proteínas depende de múltiples factores, como la estrategia de calentamiento, la temperatura, el tiempo de exposición, el pH y la fuerza iónica (Zhang *et al.*, 2021). Si bien los cambios irreversibles en la estructura proteica pueden ser útiles en aplicaciones como la mejora de la textura o la formación de geles, en otros casos pueden resultar perjudiciales (Aryee *et al.*, 2018). La formación de agregados, por ejemplo, puede causar la pérdida de solubilidad, lo que genera problemas de turbidez y sedimentación indeseables en productos como bebidas. Además, estos agregados pueden obstruir los intercambiadores de calor, reduciendo la eficiencia de los procesos térmicos (Wijayanti *et al.*, 2014). Por ello, la estabilidad térmica de las proteínas y sus hidrolizados es clave en aplicaciones alimentarias, ya que determina su capacidad para mantener sus características estructurales y funcionales durante el procesamiento térmico.

En el presente estudio, la estabilidad térmica se evaluó mediante la determinación del porcentaje de proteínas desnaturalizadas (PD) considerando diferentes condiciones de temperatura, pH y concentración. Los resultados se presentan en la **Tabla 30** y en la **Figura 40**. En todas las condiciones evaluadas, los ingredientes funcionales mostraron valores de PD significativamente más bajos que el WPC-80, lo cual resulta un claro indicio de que la hidrólisis enzimática mejora la estabilidad térmica de los hidrolizados generados respecto a la proteína sin hidrolizar.

Tabla 30. Valores promedio y desviación estándar correspondientes al porcentaje de proteínas desnaturalizadas en función de la concentración [S₀, % (m/v)], del pH y de la temperatura (°C).

| S ₀ [% (m/v)] | pH | Temperatura (°C) | Proteínas desnaturalizadas (%) | | |
|--------------------------|-----|------------------|--------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| | | | WPH-A | WPH-AF | WPC-80 |
| 1 | 4,5 | 65 | 1,64 ± 1,50 | 1,51 ± 2,40 ^b | 25,97 ± 0,73 ^c |
| | | 80 | 2,44 ± 2,50 | 0,80 ± 0,56 ^{ab} | 59,07 ± 2,54 ^f |
| | | 95 | 0,23 ± 0,41 | 0,00 ± 0,00 ^a | 80,60 ± 0,28 ^{kl} |
| | 6,0 | 65 | 1,87 ± 2,48 | 0,00 ± 0,00 ^a | 5,22 ± 5,20 ^a |
| | | 80 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 ^a | 32,28 ± 5,82 ^d |
| | | 95 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 ^a | 63,39 ± 6,64 ^{fg} |
| | 7,5 | 65 | 2,91 ± 2,88 | 0,00 ± 0,00 ^a | 8,53 ± 0,66 ^{ab} |
| | | 80 | 1,01 ± 1,44 | 0,00 ± 0,00 ^a | 46,00 ± 13,27 ^e |
| | | 95 | 1,38 ± 1,83 | 0,00 ± 0,00 ^a | 67,34 ± 1,92 ^{gh} |
| 4 | 4,5 | 65 | 0,19 ± 0,33 | 0,33 ± 0,58 ^{ab} | 34,38 ± 0,80 ^d |
| | | 80 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 ^a | 72,04 ± 0,83 ^{hi} |
| | | 95 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 ^a | 86,74 ± 0,11 ^m |
| | 6,0 | 65 | 0,05 ± 0,08 | 0,93 ± 0,82 ^{ab} | 11,05 ± 3,52 ^{ab} |
| | | 80 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 ^a | 64,36 ± 0,67 ^{fg} |
| | | 95 | 0,00 ± 0,00 | 0,07 ± 0,12 ^a | 79,28 ± 0,25 ^{jk} |
| | 7,5 | 65 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 ^a | 14,34 ± 5,23 ^b |
| | | 80 | 0,00 ± 0,00 | 0,11 ± 0,20 ^{ab} | 80,52 ± 0,23 ^{kl} |
| | | 95 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 ^a | 85,72 ± 0,21 ^{lm} |
| 8 | 4,5 | 65 | 2,39 ± 2,30 | 0,00 ± 0,00 ^a | 38,23 ± 1,01 ^d |
| | | 80 | 0,25 ± 0,43 | 1,40 ± 1,22 ^{ab} | 75,13 ± 0,12 ^{ijk} |
| | | 95 | 1,10 ± 1,90 | 0,00 ± 0,00 ^a | * |
| | 6,0 | 65 | 0,83 ± 1,13 | 1,31 ± 2,27 ^{ab} | 12,83 ± 0,35 ^b |
| | | 80 | 0,68 ± 1,17 | 0,00 ± 0,00 ^a | 74,34 ± 0,69 ^{ij} |
| | | 95 | 0,00 ± 0,00 | 0,60 ± 1,04 ^{ab} | 78,90 ± 0,16 ^{jk} |
| | 7,5 | 65 | 2,86 ± 3,46 | 5,61 ± 1,06 ^c | 36,72 ± 1,15 ^d |
| | | 80 | 0,48 ± 0,84 | 7,02 ± 2,06 ^c | 87,13 ± 0,29 ^m |
| | | 95 | 0,12 ± 0,21 | 0,00 ± 0,00 ^a | 87,36 ± 0,12 ^m |

En todos los casos, el tiempo de tratamiento térmico aplicado fue de 30 min. (*): valor no determinado debido a que la muestra gelificó. ^{a-m} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Columnas sin letras indican que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

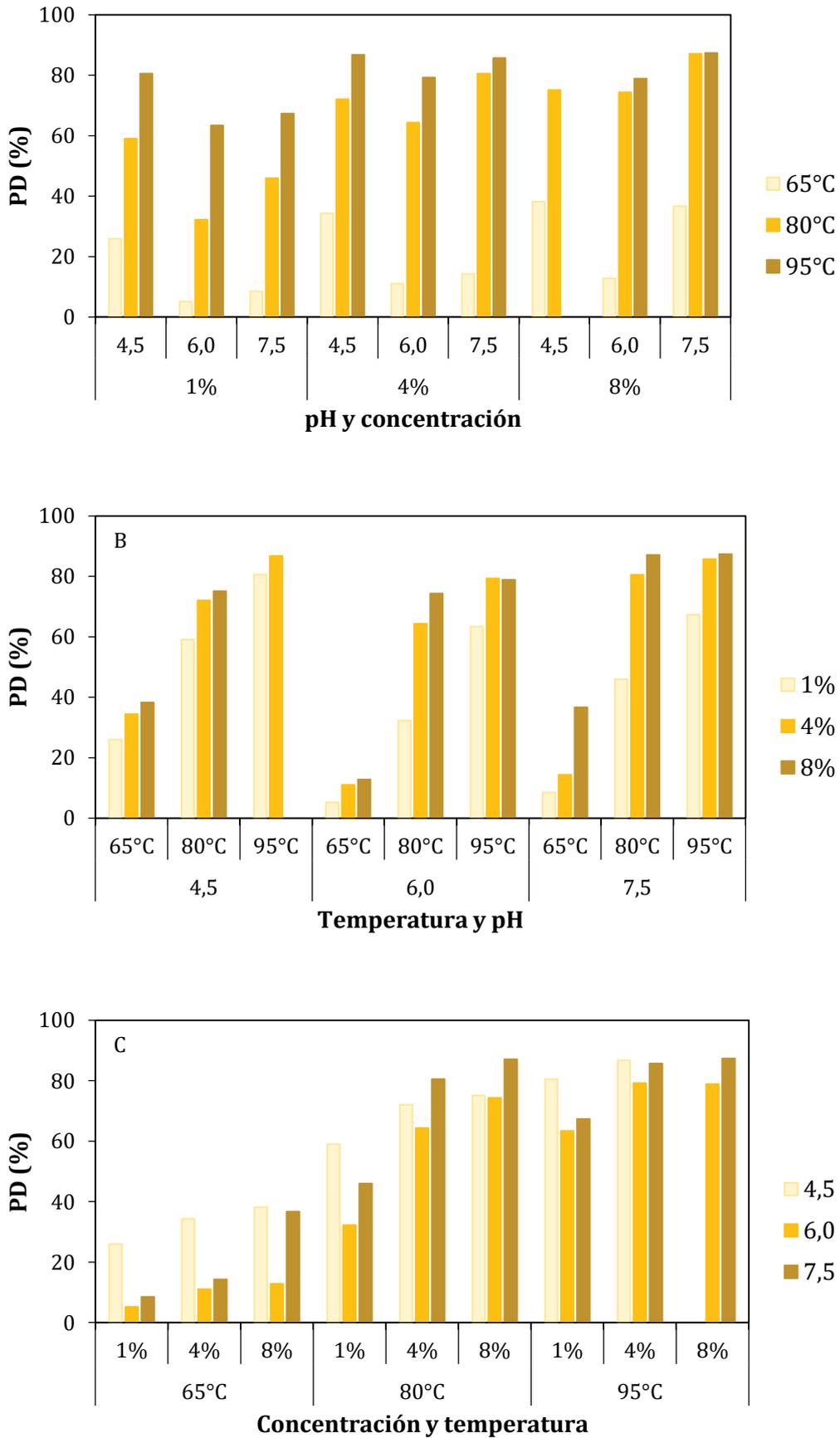


Figura 40. Estabilidad térmica del WPC-80 expresada como porcentaje de proteínas desnaturadas. (A) Efecto de la temperatura. (B) Efecto de la concentración [% (m/v)]. (C) Efecto del pH.

En particular, el WPH-A alcanzó un valor máximo de PD de $2,91 \pm 2,88\%$, sin diferencias significativas entre las diversas condiciones evaluadas. Por su parte, el WPH-AF presentó un valor máximo de $7,02 \pm 2,06\%$, aunque en la mayoría de las condiciones analizadas el PD se mantuvo por debajo del 1,5%. Si bien se encontraron diferencias estadísticas entre los hidrolizados, estas no parecen tener una relevancia práctica significativa, ya que ambos mostraron baja susceptibilidad a la desnaturalización térmica.

En contraste, el WPC-80 presentó una alta susceptibilidad a la desnaturalización térmica, con valores que aumentaron progresivamente con la temperatura y la concentración de la muestra, alcanzando hasta $87,36 \pm 0,12\%$ a 95°C y 8% (m/v) de concentración (**Figura 40**). Además, los mayores valores de PD en el WPC-80 se observaron a pH 4,5 (cerca a su pI), lo que sugiere que las condiciones ácidas favorecen la desnaturalización térmica de la proteína. Bajo las condiciones más extremas (8% de concentración, pH 4,5 y 95°C), se formó un gel tras el tratamiento térmico, impidiendo la determinación del PD debido a la solidificación del sistema.

Estos resultados demuestran que la hidrólisis enzimática de las proteínas del suero mejora significativamente su estabilidad térmica, lo que puede atribuirse a la pérdida de la estructura secundaria inducida por la hidrólisis, reduciendo los cambios estructurales durante el calentamiento (Jeewanthi *et al.*, 2015). La generación de péptidos de menor tamaño (confirmada por SDS-PAGE y RP-HPLC) reduce la tendencia a la agregación térmica y disminuye la probabilidad de precipitación.

En conjunto, estas observaciones sin dudas muestran que los ingredientes funcionales presentan una mejor estabilidad térmica en comparación con el WPC-80, lo que amplía su potencial de aplicación en productos que requieren tratamientos térmicos intensivos, como bebidas procesadas, sopas instantáneas o productos lácteos UHT. Además, la menor formación de agregados en los WPHs podría evitar problemas de turbidez y sedimentación, mejorando la estabilidad y apariencia de los productos finales.

❖ Viscosidad

La viscosidad es una medida de la resistencia a fluir y depende de diversos factores, como la temperatura, la concentración y el tamaño molecular de los componentes disueltos. En general, la viscosidad disminuye con el aumento de la temperatura y la reducción del tamaño molecular (Walstra, 2002). Sin embargo, en el caso de las proteínas, un incremento suficiente de la temperatura puede inducir su desnaturalización, favoreciendo interacciones proteína-proteína que, en algunos casos, pueden aumentar la viscosidad (Pelegrine & Gasparetto, 2005). Dado que el tratamiento térmico es ampliamente utilizado en la industria alimentaria, resulta fundamental

evaluar el comportamiento del WPC-80 y sus hidrolizados en términos de viscosidad, especialmente al considerarlos como potenciales ingredientes funcionales. La importancia de esta propiedad varía según la aplicación: en bebidas y salsas se prefieren viscosidades bajas, mientras que, en productos como cremas o aderezos, todo aporte para obtener mayores valores de viscosidad contribuiría a lograr una textura más deseable.

Los valores de viscosidad obtenidos para las muestras analizadas se presentan en el **Anexo 7**, mientras que las **Figuras 41, 42 y 43** ilustran los barridos de temperatura en cada condición evaluada. El análisis estadístico reveló que la temperatura, la concentración y el pH tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre la viscosidad. En general, la viscosidad de las suspensiones disminuyó con el aumento de la temperatura, lo que se debe a una mayor energía cinética de las moléculas, favoreciendo su movilidad (*Zhang et al., 2021*). No obstante, el WPC-80 presentó un comportamiento particular a la concentración de 10% (m/v) y pH 4, donde se observó un incremento de la viscosidad entre 40°C y 45°C, sugiriendo un fenómeno de agregación proteica. Este comportamiento es consistente con los resultados de estabilidad térmica, donde el WPC-80 mostró una alta susceptibilidad a la desnaturalización en condiciones de alta concentración y pH cercano a su pI.

En cuanto a la concentración, se observó un aumento progresivo de la viscosidad a medida que se incrementaba el contenido proteico (**Figura 41**), lo cual era esperable, ya que una mayor cantidad de proteínas intensifica las interacciones moleculares y la resistencia al flujo. Respecto al efecto del pH, la viscosidad alcanzó su valor máximo a pH 4 y disminuyó posteriormente a medida que el pH aumentó (**Figura 42**). Esto se debe a la influencia del pH en la carga de las proteínas: cerca del pI las fuerzas repulsivas disminuyen, favoreciendo la agregación proteica y, por lo tanto, incrementando la viscosidad.

La hidrólisis enzimática tuvo un efecto notorio sobre la viscosidad. Los ingredientes funcionales mostraron una menor viscosidad en comparación con el WPC-80, siendo más pronunciado este efecto en el WPH-AF. La ruptura de la estructura proteica nativa, evidenciada en el análisis SDS-PAGE, redujo la viscosidad debido al menor tamaño molecular de los péptidos generados. La mayor disminución en el WPH-AF podría estar relacionada con su mayor grado de hidrólisis, lo que sugiere una mayor fragmentación proteica en comparación con el WPH-A. Además, el mayor contenido de aminoácidos libres generado por la acción de FLA también podría haber contribuido a la reducción de la viscosidad.

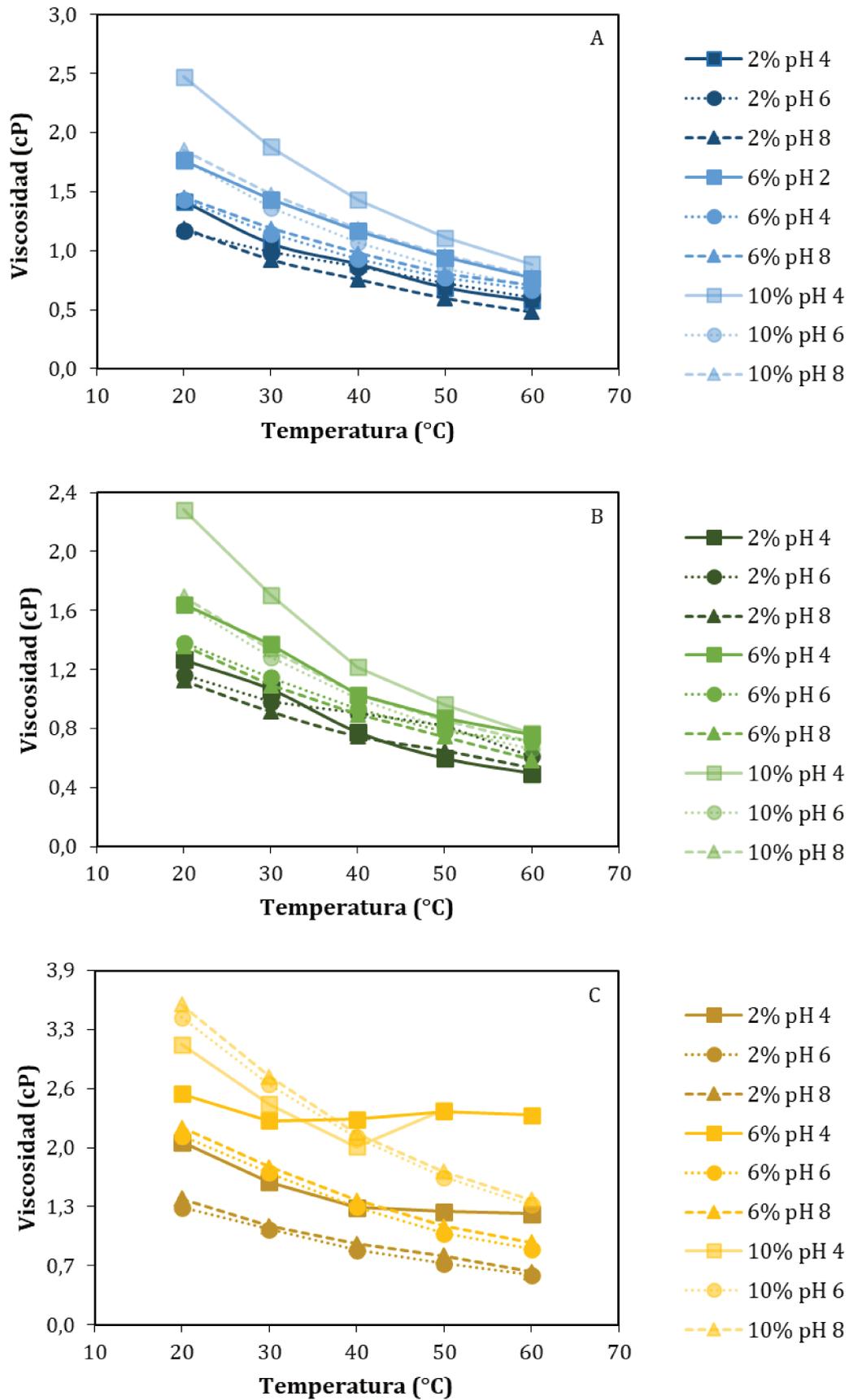


Figura 41. Barridos de temperatura para diferentes muestras: (A) WPH-A. (B) WPH-AF. (C) WPC-80. Efecto de la concentración [% (m/v)] y del pH.

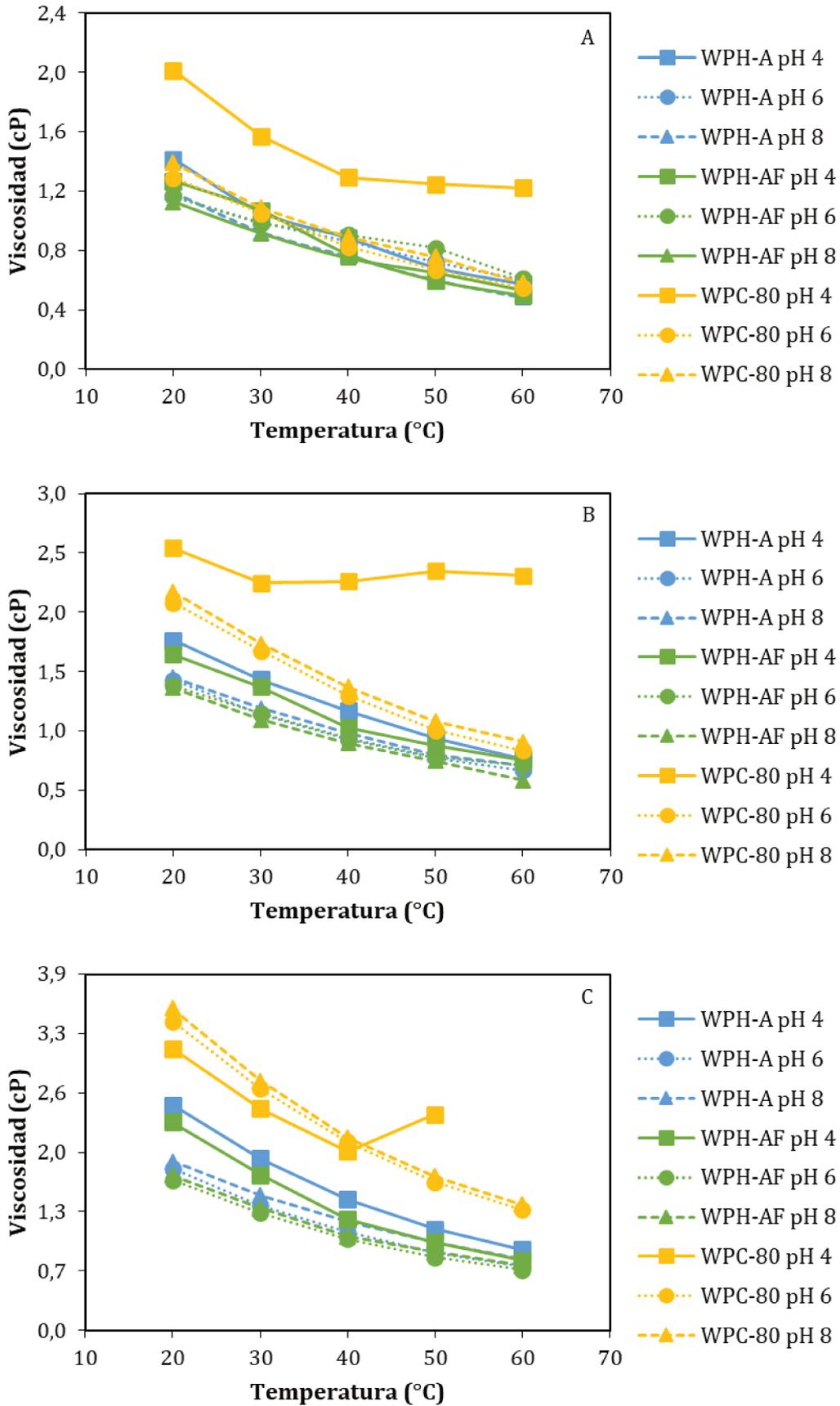


Figura 42. Barridos de temperatura para concentraciones [% (m/v)]: (A) 2%. (B) 6%. (C) 10%. Efecto del tipo de muestra y del pH.

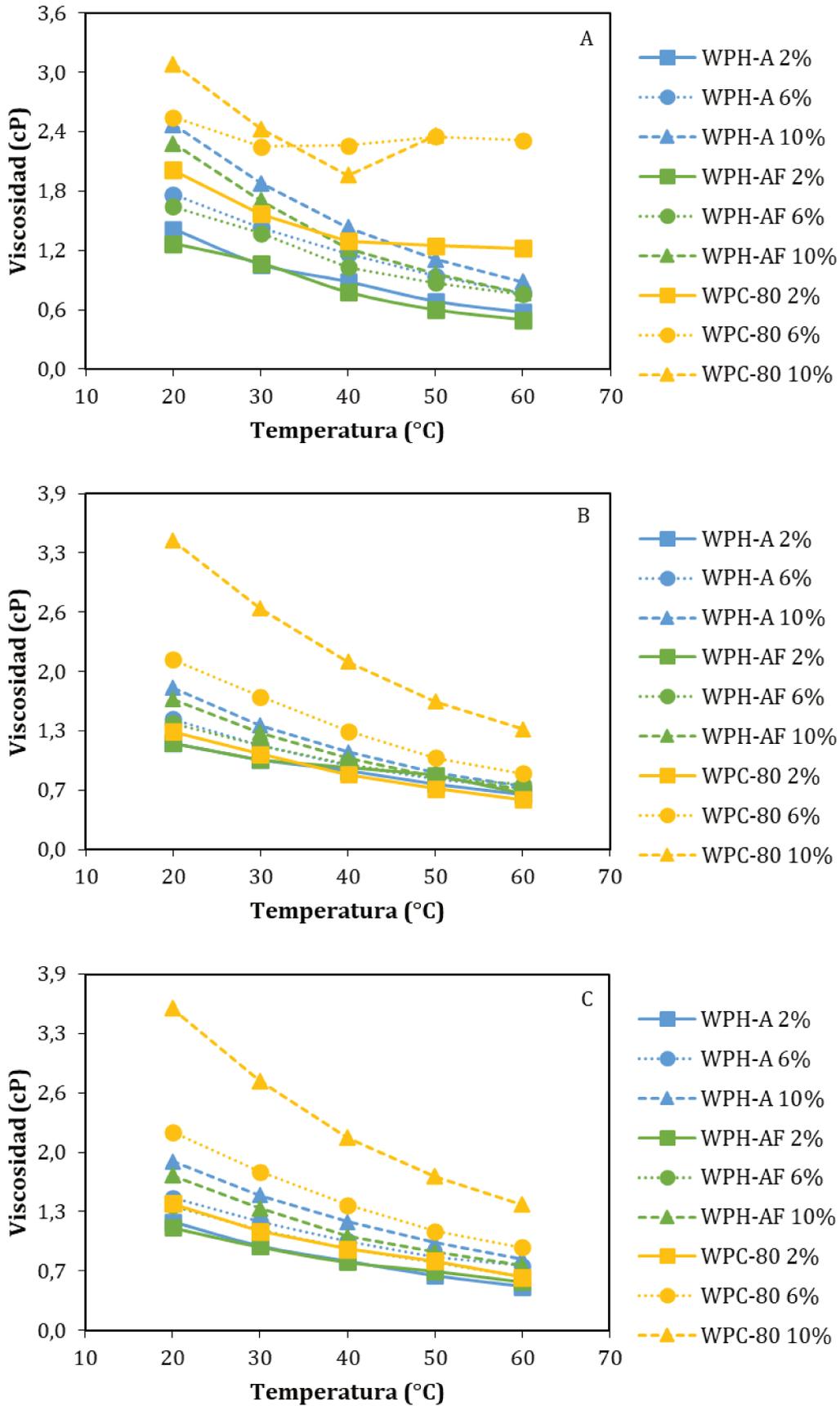


Figura 43. Barridos de temperatura para diferentes pH: (A) pH 4. (B) pH 6. (C) pH 8. Efecto del tipo de muestra y de la concentración [% (m/v)].

En términos de aplicaciones alimentarias, los WPHs obtenidos podrían ser adecuados, por ejemplo, para ser empleados en formulaciones líquidas, ya que presentan una viscosidad baja y estable en las condiciones evaluadas. Además, la ausencia de agregados en los ingredientes funcionales sugiere una mayor estabilidad térmica en comparación con el WPC-80, cuyas implicancias se discutieron previamente.

❖ Capacidad de absorción de aceite

Definida como la cantidad de aceite que una muestra puede retener por unidad de peso, es una propiedad clave para describir el perfil de textura y las características sensoriales de los alimentos (Aryee *et al.*, 2018). La capacidad de absorción de aceite representa la capacidad de las proteínas/péptidos para interactuar con compuestos lipídicos, contribuyendo a mejorar la sensación en boca y a la retención del sabor (Ozorio *et al.*, 2019). En particular, se ha reportado que las proteínas del suero con buenas capacidades de absorción de aceite y de agua pueden utilizarse como alternativas a las proteínas cárnicas (Krunic *et al.*, 2018).

Los resultados de la capacidad de absorción de aceite (g aceite/g muestra) se presentan en la **Figura 44** y en la **Tabla 31**. Se encontraron diferencias significativas entre las muestras analizadas, mostrando ambos ingredientes funcionales una mayor capacidad de absorción en comparación con el WPC-80. En particular, el WPH-AF presentó el mayor valor ($1,98 \pm 0,05$ g aceite/g muestra), seguido por el WPH-A ($1,57 \pm 0,10$ g aceite/g muestra), mientras que el WPC-80 registró la menor capacidad ($1,29 \pm 0,17$ g aceite/g muestra).

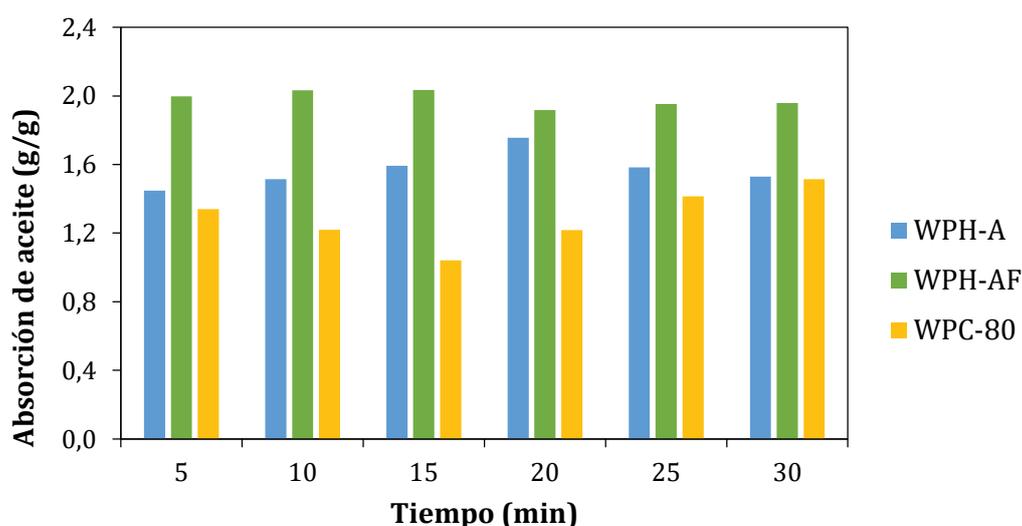


Figura 44. Capacidad de absorción de aceite en función del tiempo de agitación.

Tabla 31. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la capacidad de absorción de aceite (g aceite absorbido/g muestra), en función del tiempo de agitación.

| Tiempo de agitación (min) | Absorción de aceite (g/g) | | |
|------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | WPH-A | WPH- AF | WPC-80 |
| 5 | 1,45 ± 0,04 ^{de} | 2,00 ± 0,03 ^{hi} | 1,34 ± 0,08 ^c |
| 10 | 1,51 ± 0,04 ^{def} | 2,03 ± 0,07 ⁱ | 1,22 ± 0,08 ^b |
| 15 | 1,59 ± 0,03 ^f | 2,03 ± 0,05 ⁱ | 1,04 ± 0,07 ^a |
| 20 | 1,76 ± 0,03 ^g | 1,92 ± 0,01 ^h | 1,22 ± 0,05 ^b |
| 25 | 1,58 ± 0,03 ^f | 1,95 ± 0,05 ^{hi} | 1,41 ± 0,05 ^{cd} |
| 30 | 1,53 ± 0,03 ^{ef} | 1,96 ± 0,00 ^{hi} | 1,51 ± 0,05 ^{def} |
| Muestra (M) | | | S |
| Tiempo de agitación (T) | | | S |
| Interacción M-T | | | S |

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. S: Efecto significativo ($p < 0,05$). ^{a-i} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

El aumento en la capacidad de absorción de aceite en los WPHs puede atribuirse a la alteración estructural de las proteínas durante la hidrólisis enzimática, lo que expone grupos hidrofóbicos previamente ocultos y facilita su interacción con las grasas (Chabanon *et al.*, 2007). Además, la reducción del tamaño molecular en los WPHs, podría facilitar la interacción con el aceite, permitiendo una mejor retención. Este efecto fue más pronunciado en el WPH-AF, lo que sugiere que la hidrólisis secuencial con FLA promovió una mayor exposición de regiones hidrofóbicas en comparación con el WPH-A.

Además, se observó que la capacidad de absorción de aceite se modificó con el tiempo de agitación, siendo este efecto más marcado en el WPH-A y en el WPC-80. En el WPH-A, la mayor absorción se registró a los 20 min, mientras que en el WPC-80 ocurrió a los 30 min. Esto sugiere que tiempos de agitación más largos favorecen una mayor interacción entre las proteínas y el aceite. Estos resultados indican que la hidrólisis enzimática ha mejorado significativamente la capacidad de absorción de aceite de las proteínas del suero lácteo, lo que podría ser una ventaja en aplicaciones alimentarias que requieren una mayor retención de grasa, como productos cárnicos, salsas o emulsiones.

❖ *Capacidad emulsionante*

La capacidad emulsionante es una propiedad funcional clave en alimentos tales como aderezos, donde la separación de fases puede afectar negativamente la calidad y apariencia del producto (Xu *et al.*, 2020). Las proteínas, por su naturaleza anfifílica, estabilizan emulsiones al adsorberse en la interfaz aceite-agua, formando películas protectoras alrededor de las gotas de aceite (Aryee *et al.*, 2018). Las proteínas del suero, se emplean en productos como fórmulas infantiles, bebidas sustitutivas de comidas, sopas y salsas, generalmente en combinación con otros emulsionantes (Kilara & Vaghela, 2018). Sin embargo, la hidrólisis enzimática puede modificar sus propiedades emulsionantes en función del grado de hidrólisis, la solubilidad y la flexibilidad molecular de los péptidos generados (Mahmoud & Cordle, 2000; Xu *et al.*, 2020).

En este trabajo, se evaluaron la capacidad emulsionante (CE) y la estabilidad de la emulsión (EE) en función del pH. Los resultados se presentan en la **Tabla 32** y en la **Figura 45**.

Tabla 32. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la capacidad emulsionante (CE) y estabilidad de la emulsión (EE) en función del pH.

| Muestra | pH | CE (%) | EE (%) |
|------------------|-----|------------------------------|-----------------------------|
| WPH-A | 4,5 | 50,00 ± 0,00 ^{ab} | 47,37 ± 0,00 ^a |
| | 5,5 | 48,24 ± 1,66 ^a | 49,46 ± 0,77 ^{ab} |
| | 6,5 | 50,00 ± 0,00 ^{ab} | 51,67 ± 2,36 ^{bcd} |
| WPH-AF | 4,5 | 52,03 ± 1,29 ^{abcd} | 49,21 ± 1,12 ^{ab} |
| | 5,5 | 55,90 ± 0,49 ^d | 51,32 ± 1,86 ^{abc} |
| | 6,5 | 54,25 ± 1,85 ^{cd} | 52,78 ± 3,93 ^{bcd} |
| WPC-80 | 4,5 | 51,50 ± 2,12 ^{abc} | 55,79 ± 0,00 ^d |
| | 5,5 | 55,73 ± 0,25 ^d | 54,04 ± 0,99 ^{cd} |
| | 6,5 | 52,78 ± 3,93 ^{bcd} | 54,09 ± 2,07 ^{cd} |
| Muestra (M) | | S | S |
| pH | | NS | NS |
| Interacción M-pH | | NS | NS |

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. S: Efecto significativo ($p < 0,05$). NS: Efecto no significativo ($p > 0,05$). ^{a-d} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

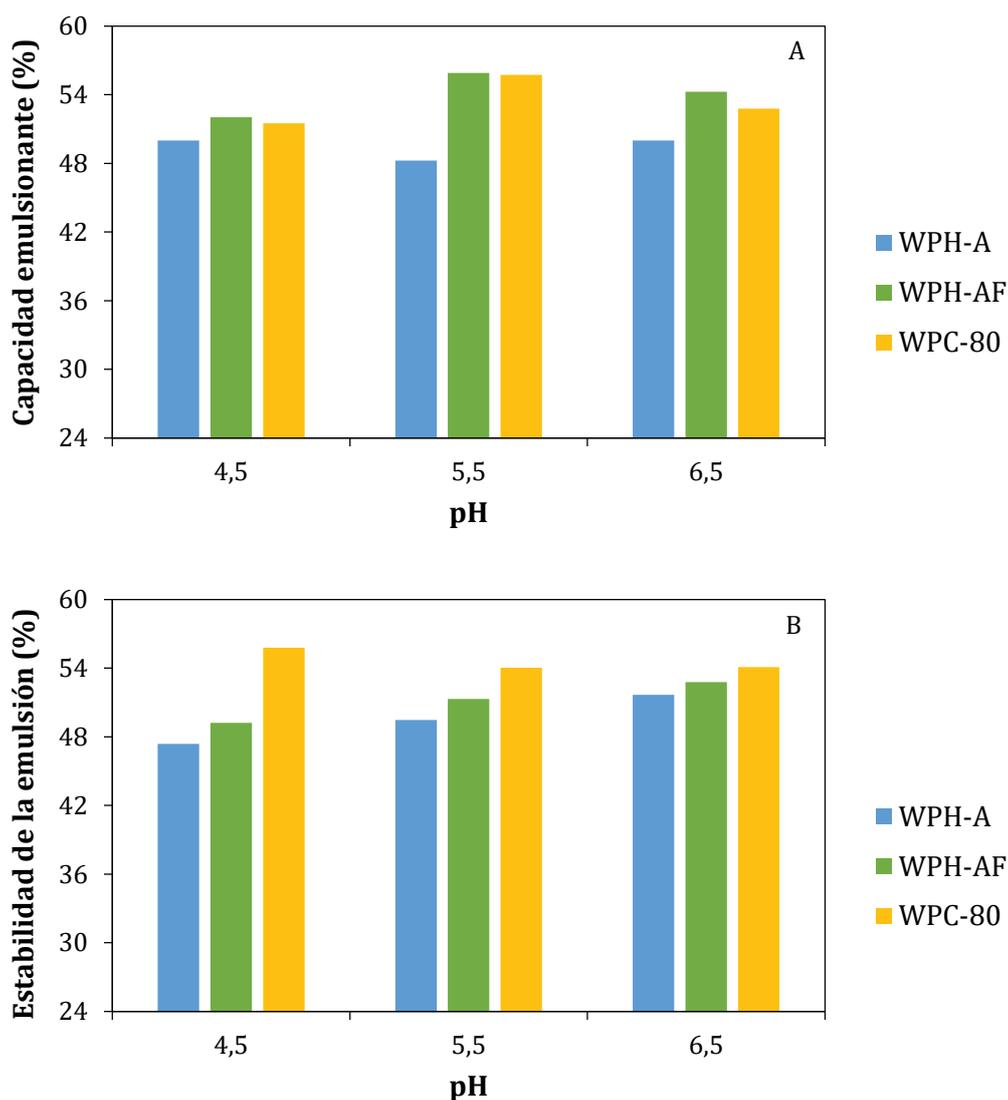


Figura 45. (A) Capacidad emulsionante. (B) Estabilidad de la emulsión.

Aunque el pH no tuvo un efecto significativo sobre la CE ni la EE, se encontraron algunas diferencias entre las muestras. El WPC-80 y el WPH-AF presentaron valores similares de CE ($53,34 \pm 2,79\%$ y $51,10 \pm 2,57\%$, respectivamente), superiores a los del WPH-A ($49,41 \pm 1,18\%$). Sin embargo, las emulsiones formadas con los ingredientes funcionales fueron menos estables que las del WPC-80, sin diferencias significativas entre los WPHs. La mayor CE observada en el WPH-AF respecto a WPH-A, coincide con lo reportado en hidrolizados de proteína de lenteja (Rezvankhah *et al.*, 2021), quienes atribuyeron este comportamiento a la mayor hidrofobicidad de los hidrolizados mediante la combinación secuencial de ALC y FLA. No obstante, en el presente estudio, la hidrofobicidad de los ingredientes evaluada a través de los perfiles cromatográficos no mostró diferencias sustanciales entre ambos.

En la literatura se ha reportado que un DH superior al 10% disminuye la CE debido al menor tamaño molecular de los péptidos y al aumento de la solubilidad. Los péptidos de bajo peso molecular pueden difundirse y adsorberse rápidamente en la interfaz, pero su capacidad para estabilizar emulsiones es limitada, ya que no pueden desplegarse ni reorientarse adecuadamente en la interfaz debido a las repulsiones electrostáticas entre sus cargas (Rezvankhah *et al.*, 2021). En línea con estos resultados, Severin & Xia (2006) observaron que los WPHs obtenidos mediante hidrólisis con ALC mostraron menor capacidad emulsionante en comparación con el WPC-80, excepto en un hidrolizado con DH 5% que presentó una CE comparable al de la proteína no hidrolizada. Además, las emulsiones formadas por los hidrolizados eran menos estables.

Estudios previos han sugerido que un DH moderado (< 10%) puede mejorar la CE, debido al desdoblamiento parcial de las moléculas de proteína, lo que incrementa su flexibilidad molecular y facilita su reorganización en la interfaz aceite-agua, evitando la coalescencia de las gotas (Xu *et al.*, 2020). En este sentido, Chobert *et al.* (1988) reportaron que los hidrolizados trípticos de WPC con DH de 2,5%, 3,9% y 5,3% presentaron mejores propiedades emulsionantes que la proteína no hidrolizada, sugiriendo que el peso molecular juega un rol muy importante.

Aunque la hidrólisis enzimática modificó la CE de los ingredientes funcionales en comparación con el WPC-80, no se observaron alteraciones drásticas o muy marcadas en su capacidad para formar y/o estabilizar emulsiones. Estos resultados sugieren que los ingredientes obtenidos podrían ser utilizados en aplicaciones emulsionantes, aunque su menor estabilidad podría requerir su combinación con otros estabilizantes.

❖ Capacidad espumante

Las proteínas actúan como surfactantes naturales en la formación y estabilización de espumas, desempeñando un rol clave en productos horneados y cremas de confitería (Kilara & Vaghela, 2018). Si bien la clara de huevo ha sido históricamente la fuente más utilizada para esta función en la industria alimentaria, las proteínas del suero han ganado relevancia como alternativa viable (Davis *et al.*, 2005). Su capacidad espumante depende de su estructura molecular y características de superficie, como tamaño, flexibilidad e hidrofobicidad (Vogelsang-O'Dwyer *et al.*, 2023). En este sentido, la hidrólisis enzimática puede modificar estas propiedades, alterando la funcionalidad de los hidrolizados respecto a la proteína intacta (Van der Ven *et al.*, 2002).

En este trabajo, se evaluó la capacidad espumante (CF) y la estabilidad de la espuma (EF) en función de la concentración, el pH y la fuerza iónica. Los resultados se presentan en las **Tablas 33, 34 y 35**, y en la **Figura 46**. Se observó que la hidrólisis enzimática redujo la CF, siendo este efecto más pronunciado en el WPH-AF, que en algunas condiciones no logró generar espuma.

Estudios previos han reportado efectos variables y, en algunos casos, contradictorios sobre la CF de las proteínas de suero tras la hidrólisis enzimática (Severin & Xia, 2006; Pang *et al.*, 2024a; Pang *et al.*, 2024b; Van der Ven *et al.*, 2002; Sinha *et al.*, 2007).

Tabla 33. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la capacidad espumante (%) en función de la concentración [S₀, % (m/v)].

| S ₀ [% (m/v)] | Capacidad espumante (%)* | | |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | WPH-A | WPH-AF | WPC-80 |
| 2 | 5,00 ± 0,00 ^b | 0,00 ± 0,00 ^a | 11,25 ± 1,77 ^d |
| 6 | 8,75 ± 1,77 ^c | 7,50 ± 0,00 ^c | 15,00 ± 0,00 ^e |
| 10 | 20,00 ± 0,00 ^f | 16,25 ± 1,77 ^e | 30,00 ± 0,00 ^g |
| Muestra (M) | | | S |
| Concentración (C) | | | S |
| Interacción M-C | | | S |

*Muestras a pH 6 sin adición de NaCl. Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. S: Efecto significativo ($p < 0,05$). ^{a-g} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 34. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la capacidad espumante en función del pH.

| pH | Capacidad espumante (%)* | | |
|------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | WPH-A | WPH-AF | WPC-80 |
| 4,5 | 5,00 ± 0,00 ^b | 7,50 ± 0,00 ^c | 20,00 ± 0,00 ^g |
| 5,5 | 12,50 ± 0,00 ^e | 0,00 ± 0,00 ^a | 15,00 ± 0,00 ^f |
| 6,5 | 10,00 ± 0,00 ^d | 0,00 ± 0,00 ^a | 16,25 ± 1,77 ^f |
| Muestra (M) | | | S |
| pH | | | S |
| Interacción M-pH | | | S |

*Muestras al 2% (m/v) sin adición de NaCl. Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. S: Efecto significativo ($p < 0,05$). ^{a-g} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 35. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la capacidad espumante (%) en función de la fuerza iónica [% (m/v)].

| NaCl [% (m/v)] | Capacidad espumante (%)* | | |
|--------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| | WPH-A | WPH-AF | WPC-80 |
| 0,0 | 5,00 ± 0,00 ^c | 0,00 ± 0,00 ^a | 11,25 ± 1,77 ^e |
| 0,2 | 5,00 ± 0,00 ^c | 2,50 ± 0,00 ^b | 13,75 ± 1,77 ^f |
| 0,6 | 12,50 ± 0,00 ^{ef} | 2,50 ± 0,00 ^b | 12,50 ± 0,00 ^{ef} |
| 1,0 | 5,00 ± 0,00 ^c | 2,50 ± 0,00 ^b | 13,75 ± 1,77 ^f |
| 2,0 | 7,50 ± 0,00 ^d | 0,00 ± 0,00 ^a | 16,25 ± 1,77 ^g |
| Muestra (M) | | | S |
| Fuerza iónica (FI) | | | S |
| Interacción M-FI | | | S |

*Muestras al 2% (m/v) y pH 6. Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. S: Efecto significativo ($p < 0,05$). ^{a-g} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Se ha observado que una hidrólisis limitada puede favorecer la formación de espuma al reducir el peso molecular de las proteínas, lo que mejora su difusión y adsorción en la interfaz aire-agua. Además, el aumento en la solubilidad de las proteínas tras la hidrólisis facilita su dispersión en la fase acuosa, favoreciendo la formación de espuma. Sin embargo, un grado de hidrólisis elevado genera péptidos demasiado cortos para formar una capa interfacial estable, lo que reduce significativamente la capacidad espumante (Jeewanthi *et al.*, 2015; Vogelsang-O'Dwyer *et al.*, 2023). En este sentido, la menor CF observada en los ingredientes funcionales podría atribuirse a una hidrólisis excesiva. En particular, el WPH-AF presentó los valores más bajos de CF, probablemente debido a su mayor DH y al incremento de aminoácidos libres generados durante el proceso enzimático con FLA.

En cuanto a la concentración, la CF aumentó con el incremento del contenido proteico, alcanzando su valor máximo (30%) en el WPC-80 al 10% (m/v) (Tabla 33). Este resultado es consistente con la literatura, que señala que una mayor concentración de proteínas solubles disminuye la tensión superficial entre las burbujas de aire, favoreciendo la capacidad espumante (Schmidt *et al.*, 1984; Piornos *et al.*, 2015). Respecto al pH, el efecto fue específico para cada muestra: el WPC-80 y el WPH-AF alcanzaron su máxima CF a pH 4,5, mientras que el WPH-A mostró su menor capacidad espumante en esta condición (Tabla 34). En términos de fuerza iónica, la adición de NaCl afectó la CF de manera significativa (Tabla 35). En los WPHs, el mayor valor se obtuvo con 0,6% (m/v) de NaCl, mientras que en el WPC-80 la CF aumentó con concentraciones crecientes de NaCl. Este efecto puede deberse a que el NaCl, en bajas

concentraciones, mejora la solubilidad de las proteínas (*salting-in*) y, en consecuencia, favorece su adsorción en la interfaz aire-agua (Akintayo *et al.*, 1999).

La estabilidad de las espumas a lo largo del tiempo se presenta en la **Figura 46**, y los valores promedio se encuentran en el **Anexo 8**. En general, los ingredientes funcionales mostraron una rápida pérdida del volumen de espuma, drenando completamente en los primeros 3 min en la mayoría de las condiciones. En contraste, el WPC-80 generó espumas más estables, con tiempos de drenaje que oscilaron entre 30 y 150 min. La estabilidad de la espuma en esta muestra resultó favorecida por mayores concentraciones proteicas (**Figura 45.A**), pH 4,5 (**Figura 45.B**) y la adición de NaCl, en particular a 0,6% (m/v) (**Figura 45.C**). Según Sinha *et al.* (2007), aunque una hidrólisis limitada puede favorecer la formación de espuma, la estabilidad disminuye considerablemente debido a la presencia de péptidos pequeños, que no poseen la fuerza necesaria para estabilizarla. Además, la estabilidad de la espuma mejora cuando la repulsión electrostática es mínima, lo que sugiere que la mayor densidad de carga generada por la hidrólisis podría afectar negativamente esta propiedad (Van der Ven *et al.*, 2002).

En función de lo mencionado, se resalta la importancia de controlar el grado de hidrólisis para optimizar la funcionalidad espumante de las proteínas del suero. Mientras que el WPC-80 sigue siendo una opción adecuada para aplicaciones donde se requiere generación y estabilidad de espuma (ej. panificados y cremas de confitería), los ingredientes funcionales obtenidos podrían ser útiles en formulaciones donde la formación de espuma no es deseada, como en productos semisólidos, líquidos o bebidas.

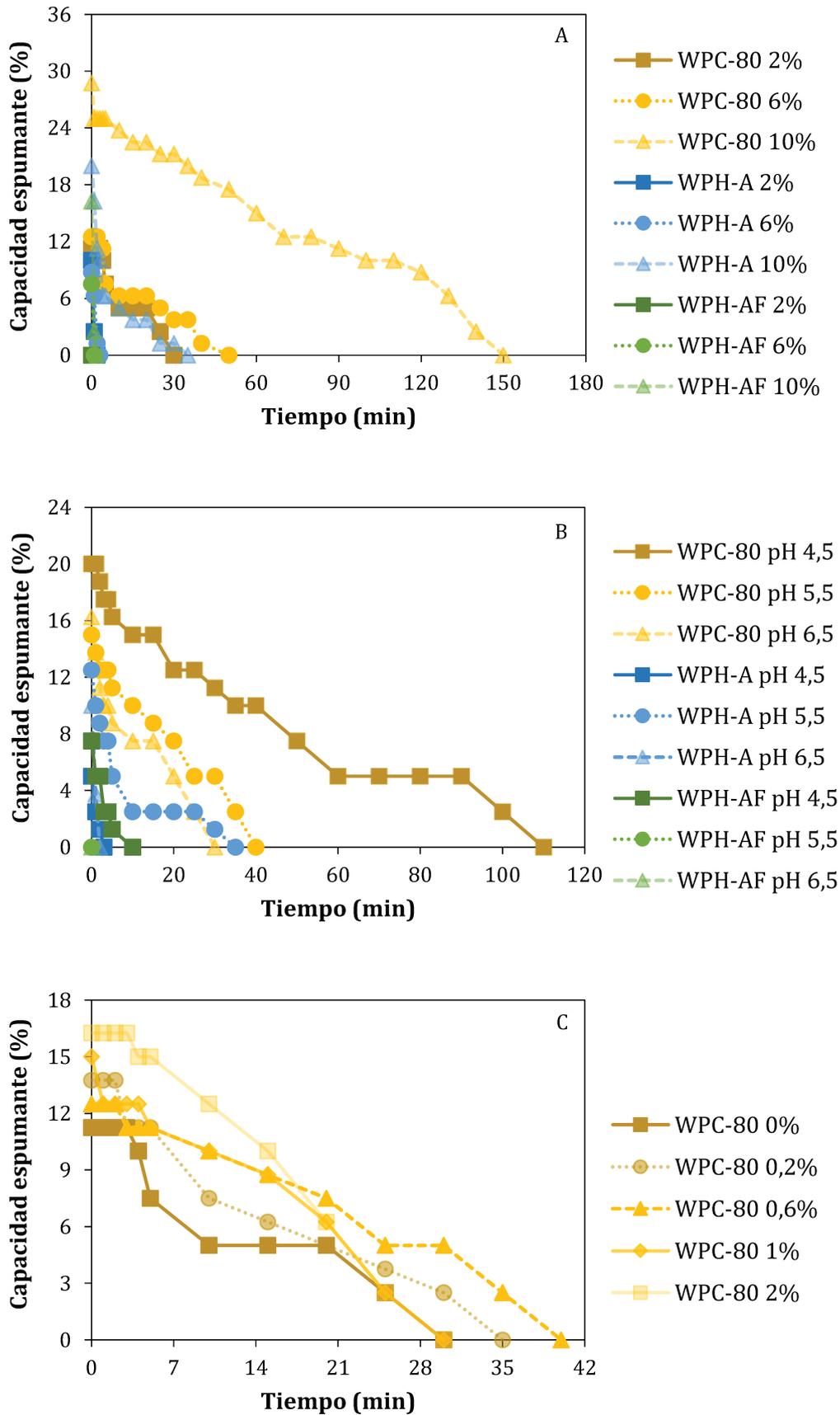


Figura 46. Estabilidad de la espuma. (A) Efecto de la concentración [% (m/v)]. (B) Efecto del pH. (C) Efecto de la fuerza iónica [% (m/v) de NaCl].

❖ *Propiedad gelificante*

La gelificación es una propiedad funcional de interés en diversas aplicaciones alimentarias, ya que contribuye al desarrollo de la elasticidad y textura de los productos. Este proceso puede ser inducido por calor, tratamientos químicos o enzimáticos (Aryee *et al.*, 2018). Inicialmente, las proteínas se desnaturalizan y se reorganizan, promoviendo su agregación y la formación de una red tridimensional (Kilara & Vaghela, 2018). Para que este proceso ocurra de manera eficiente, la concentración de proteína debe ser suficientemente alta (Aryee *et al.*, 2018). Bajo condiciones adecuadas, el equilibrio entre las interacciones proteína-proteína y proteína-agua da lugar a la formación de geles capaces de retener grandes cantidades de agua y otros nutrientes (Kilara & Vaghela, 2018).

En el caso de las proteínas del suero, su propiedad gelificante es aprovechada en productos cárnicos procesados, lácteos y panificados. Sin embargo, esta propiedad puede limitar su uso en productos donde la gelificación no es deseada, como en bebidas, fórmulas infantiles o aderezos para ensaladas. La capacidad gelificante de las soluciones de proteínas de suero está influenciada por diversos factores, incluyendo la concentración proteica, el grado de desnaturalización, la fuerza iónica, el pH y la temperatura (Ju *et al.*, 1995).

En el presente estudio, se evaluó la propiedad gelificante de los ingredientes funcionales y del WPC-80. Los resultados indicaron que, bajo las condiciones de pH y concentraciones analizadas, ambos ingredientes funcionales no lograron formar geles, a diferencia del WPC-80, que sí presentó formación de gel en la mayoría de las condiciones evaluadas, tanto a las 2 h como a las 24 h. Este comportamiento es consistente con estudios previos que indican que la hidrólisis enzimática generalmente reduce la capacidad gelificante de las proteínas, debido a la liberación de péptidos de menor hidrofobicidad y mayor carga neta. Estos cambios disminuyen las interacciones entre fragmentos peptídicos, afectando la formación de geles (Severin & Xia, 2006; de Castro *et al.*, 2015; Kilara & Vaghela, 2018). De manera similar, Di Filippo *et al.* (2024) reportaron que los WPH obtenidos con ALC (DH entre 15% y 25%) no lograron formar una red de gel en ninguna de las concentraciones probadas [10, 15 y 20 % (m/v)].

El WPC-80 formó geles a concentraciones de 15% y 20% (m/v) en todos los pH evaluados (4, 6 y 8), mientras que a 10% (m/v) solo lo hizo a pH 4 (**Tabla 36**). Estos resultados concuerdan con la teoría de que las proteínas del suero tienden a formar geles cuando se calientan a concentraciones superiores a un valor crítico, el cual varía según el pH. En las proximidades del pI, se requieren concentraciones más bajas para la gelificación, y los geles formados en esta zona suelen ser más fuertes (Ju *et al.*, 1995). La formación de gel a pH 4 podría explicarse por la

reducción de las fuerzas repulsivas entre moléculas, lo que facilita la agregación y gelificación de las proteínas (Piornos *et al.*, 2015).

Además, en las muestras de WPC-80 se observaron algunos cambios tras el tratamiento térmico, especialmente en color y consistencia. A 10% (m/v) y pH 4, se detectó la formación de gel con un cambio de color de amarillento a blanquecino (**Figura 47.A**). A pH 6, aunque no se formó un gel visible, la viscosidad aumentó y el color se tornó blanquecino, mientras que a pH 8 no se observaron cambios significativos. En concentraciones más altas, el cambio de color se hizo evidente en las determinaciones a pH 4 y 6 (**Figuras 47.B y 47.C**).

Tabla 36. Propiedad gelificante del WPC-80 en función de la concentración [% (m/v)] y del pH.

| pH | Concentración [% (m/v)] | | |
|----|-------------------------|----|----|
| | 10 | 15 | 20 |
| 4 | G* | G* | G* |
| 6 | C* | G* | G* |
| 8 | SC | G | G |

SC: sin cambios; C: cambio de apariencia; G: formación de gel, * cambio de color.

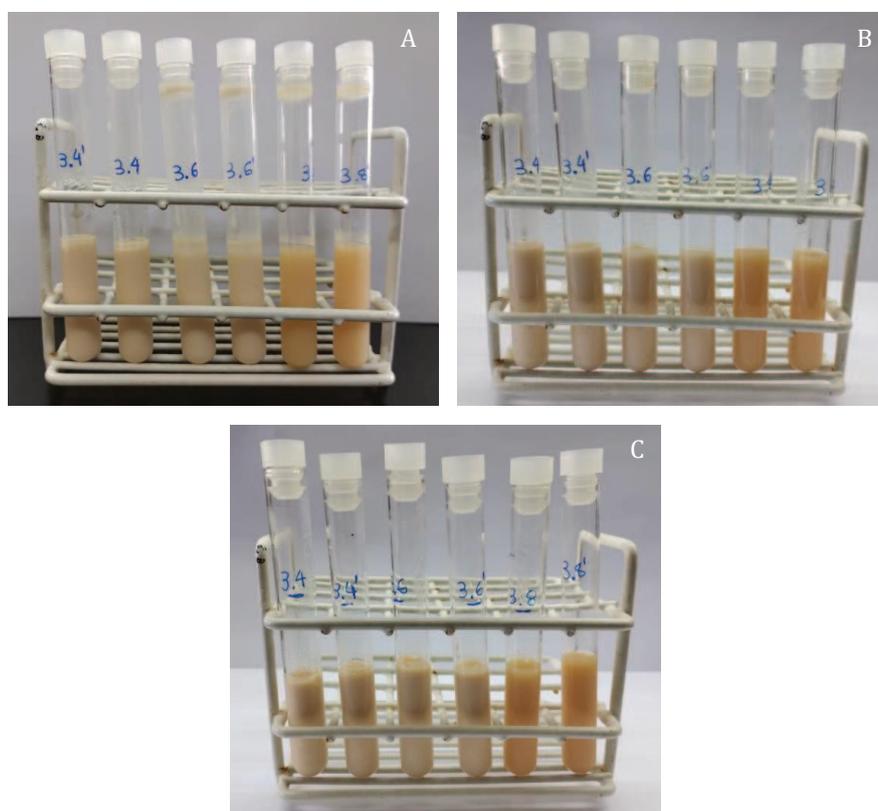


Figura 47. Propiedad gelificante del WPC-80 a diferentes concentraciones de sólidos: (A) 10% (m/v). (B) 15% (m/v). (C) 20% (m/v). De izquierda a derecha pH 4, pH 6 y pH 8, por duplicado.

Finalmente, los resultados obtenidos resaltan que, mientras el WPC-80 exhibe una propiedad gelificante significativa bajo las condiciones evaluadas, esta propiedad se ve claramente afectada en los ingredientes funcionales obtenidos por hidrólisis enzimática. Este comportamiento sugiere que los WPHs podrían ser más adecuados para formulaciones en las que se busca mantener una textura fluida o una dispersión uniforme de la matriz proteica, en lugar de promover la formación de geles.

La caracterización de las **propiedades funcionales** mostró que ambos ingredientes presentaron ventajas sobre el WPC-80 en términos de solubilidad, estabilidad térmica, viscosidad y capacidad de absorción de aceite. En contraste, la hidrólisis enzimática resultó en una reducción parcial de la capacidad emulsionante y espumante, con una menor estabilidad de las emulsiones y espumas formadas. Además, se observó una pérdida total de la capacidad gelificante en los WPHs. Aunque estas propiedades resultaron disminuidas, no necesariamente representan características negativas de los ingredientes, ya que el uso del mismo con ciertas funciones dependerá de la elección de la matriz alimentaria.

Al comparar los ingredientes funcionales entre sí, ambos mostraron una solubilidad elevada y una buena estabilidad térmica, aunque el WPH-AF presentó una mayor absorción de aceite, una menor viscosidad y una reducción más pronunciada en la capacidad espumante. Estas diferencias sugieren que el tipo de tratamiento enzimático y el DH alcanzado en la reacción claramente influyen sobre diferentes aspectos que se relacionan con la funcionalidad del ingrediente final. Así, la hidrólisis enzimática modifica sustancialmente las propiedades funcionales de las proteínas del suero, con variaciones según el tratamiento aplicado (hidrólisis con ALC o hidrólisis secuencial con ALC y FLA). La información obtenida proporciona una base sólida para la posible selección de ambos ingredientes en función de sus características y las de la matriz alimentaria en la cual podrían ser incorporados.

4.2.B.4. Determinación de las propiedades bioactivas

Además de su valor nutricional, las proteínas alimentarias pueden ejercer diversas actividades biológicas también denominadas como propiedades bioactivas, las cuales están fundamentalmente asociadas a la presencia de péptidos bioactivos en su estructura (da Costa *et al.*, 2007). Estos péptidos no ejercen su efecto biológico dado que permanecen inactivos mientras están encriptados dentro de la secuencia de la proteína original, pero pueden ser liberados mediante procesos como la hidrólisis química, la hidrólisis por enzimas digestivas, la acción de microorganismos proteolíticos o el uso de proteasas vegetales o microbianas (Brandelli *et al.*, 2015). Una vez liberados, los péptidos bioactivos pueden influir positivamente en la salud al

ejercer una amplia gama de funciones fisiológicas, incluyendo actividad antioxidante, antihipertensiva, antimicrobiana y antiproliferativa. Estas propiedades dependen de la composición y secuencia de los aminoácidos presentes, donde la bioactividad suele evidenciarse en péptidos cuyo tamaño varía entre 2 y 20 residuos de aminoácidos (Zhang *et al.*, 2013; Mann *et al.*, 2019).

En los últimos años, la producción de péptidos bioactivos mediante hidrólisis enzimática de proteínas ha cobrado gran interés debido a su potencial aplicación en la industria alimentaria, la medicina y el cuidado de la salud. Este enfoque se destaca por su alta especificidad, la seguridad de los productos obtenidos y las condiciones de producción suaves (Wei *et al.*, 2024). Factores como la selección de la enzima, la temperatura, el tiempo de reacción y el pH influyen tanto en la composición de los péptidos generados como en sus propiedades bioactivas (Wen *et al.*, 2022). Además, los péptidos bioactivos derivados de proteínas alimentarias han despertado un creciente interés como alternativas naturales o complementos a los fármacos sintéticos, lo que subraya su relevancia en el desarrollo de alimentos funcionales y nutracéuticos (Chirinos *et al.*, 2018). Muchos de estos péptidos poseen propiedades multifuncionales, lo que amplía su aplicabilidad y refuerza la importancia de su investigación (Mann *et al.*, 2019).

La caracterización de los hidrolizados proteicos es fundamental para determinar su potencial como ingredientes funcionales, ya que permite identificar sus propiedades específicas y su posible aplicación en diversas formulaciones. En este estudio, los hidrolizados WPH-A y WPH-AF fueron evaluados en términos de su potencial bioactivo. Dado que presentaron diferencias en el grado de hidrólisis y la composición peptídica, es esperable que sus actividades bioactivas también varíen. Para evaluar la funcionalidad de los hidrolizados, se efectuaron distintos ensayos *in vitro* de actividades bioactivas, incluyendo la posible presencia de citotoxicidad y citoprotección, actividades antihipertensiva, antioxidante y antimicrobiana, y capacidad quelante de calcio. Estos análisis permiten comprender como sería el impacto de los péptidos bioactivos en la salud y en la alimentación para así poder explorar su potencial uso en diferentes sectores de la industria.

❖ Citotoxicidad y citoprotección

El efecto citotóxico y citoprotector fue evaluado en dos líneas celulares: IEC-18 (un modelo de epitelio intestinal derivado de criptas ileales de rata), y Caco-2/TC7 (línea celular humana derivada de carcinoma de colon), que simula la barrera epitelial intestinal. Para el ensayo de citotoxicidad, las células fueron expuestas a WPH-A, WPH-AF y WPC-80 en un rango de concentración de 0,03 a 1 mg/mL. Los resultados, expresados como porcentaje de viabilidad

celular respecto al control (células no expuestas, 100%), se presentan en las **Tablas 37 y 38**. De acuerdo con los criterios reportados (Rossi *et al.*, 2020), un compuesto se considera no tóxico si la viabilidad celular es superior al 70%, débilmente tóxico entre 50 y 70%, y tóxico si la viabilidad celular registrada es inferior al 50%. Bajo las condiciones evaluadas, la viabilidad celular fue siempre superior al 70% en ambas líneas celulares, lo que indica que ningún tratamiento (tipo de muestra ni concentración) presentó efecto citotóxico.

En la línea celular Caco-2/TC7, no se detectaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y el control, indicando que ni el tipo de muestra ni la concentración afectaron la viabilidad celular en esta línea. Sin embargo, en la línea celular IEC-18, se observaron algunas diferencias significativas tanto entre los diferentes tratamientos y el control como entre las muestras a una misma concentración, y entre distintas concentraciones dentro de una misma muestra. Frente a esto, la observación más relevante fue a 1 mg/mL (concentración más alta del ensayo), donde se registró la mayor reducción en la viabilidad celular en todas las muestras, presentando las células expuestas a los ingredientes funcionales una viabilidad ligeramente menor en comparación con el WPC-80 (75% frente a 87%, respectivamente). A pesar de estas diferencias, los valores de viabilidad celular en todos los tratamientos fueron superiores al umbral de toxicidad, confirmando que ninguna de las muestras evaluadas presentaría efectos citotóxicos en estas condiciones.

Tabla 37. Valores promedio y desviación estándar de viabilidad de la línea celular IEC-18.

| Concentración (mg/mL) | Viabilidad celular (%) | | |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | WPH-A | WPH-AF | WPC-80 |
| 0,03 | 100,00 ± 0,00 ^d | 100,00 ± 0,00 ^d | 100,00 ± 0,00 ^d |
| 0,06 | 95,34 ± 8,07 ^{bcd} | 98,20 ± 3,11 ^d | 100,00 ± 0,00 ^d |
| 0,125 | 89,53 ± 3,35 ^{bc} | 100,00 ± 0,00 ^d | 100,00 ± 0,00 ^d |
| 0,25 | 88,16 ± 5,41 ^b | 95,16 ± 1,97 ^{bcd} | 100,00 ± 0,00 ^d |
| 0,50 | 97,34 ± 4,60 ^{cd} | 78,91 ± 11,56 ^a | 100,00 ± 0,00 ^d |
| 1,00 | 74,94 ± 1,26 ^a | 74,85 ± 6,29 ^a | 87,07 ± 4,48 ^b |
| Control | | | 100,00 ^d |

^{a-d} Valores con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 38. Valores promedio y desviación estándar de viabilidad de la línea celular Caco-2/TC7.

| Concentración (mg/mL) | Viabilidad celular (%) | | |
|--------------------------|------------------------|--------------|---------------|
| | WPH-A | WPH-AF | WPC-80 |
| 0,03 | 91,15 ± 4,40 | 91,34 ± 1,58 | 91,49 ± 3,39 |
| 0,06 | 96,75 ± 3,91 | 93,74 ± 2,14 | 91,56 ± 3,57 |
| 0,125 | 92,91 ± 6,30 | 87,42 ± 3,88 | 89,68 ± 1,78 |
| 0,25 | 88,64 ± 0,58 | 87,68 ± 3,44 | 87,29 ± 11,04 |
| 0,50 | 90,01 ± 2,62 | 89,49 ± 4,88 | 86,09 ± 6,36 |
| 1,00 | 91,49 ± 3,39 | 95,84 ± 1,02 | 90,12 ± 1,79 |
| Control | | | 100,00 |

Columnas sin letras indican que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Por otro lado, se evaluó el efecto citoprotector frente al estrés oxidativo inducido por menadiona (MEN), exponiendo las células a WPH-A, WPH-AF y WPC-80 en concentraciones de 0,125 a 1 mg/mL en co-tratamiento con MEN. Los valores de viabilidad celular se presentan en las **Tablas 39** y **40**. Como era de esperarse, la exposición al estresor MEN redujo significativamente la viabilidad celular, alcanzando valores de $66,49 \pm 4,35\%$ en IEC-18 y $71,72 \pm 21,25\%$ en Caco-2/TC7. Sin embargo, en todos los tratamientos con WPHs y WPC-80, se observó una recuperación significativa de la viabilidad celular, alcanzando hasta el 100% en algunos casos, lo que sugiere un efecto citoprotector.

Tabla 39. Valores promedio y desviación estándar de viabilidad de la línea celular IEC-18 expuestas a 5 μ M de MEN en co-tratamiento con las muestras en estudio.

| Concentración (mg/mL) | Viabilidad celular (%) | | |
|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | WPH-A | WPH-AF | WPC-80 |
| 0,125 | 100,00 ± 0,00 ^b | 100,00 ± 0,00 ^b | 99,06 ± 1,63 ^b |
| 0,25 | 88,61 ± 17,35 ^b | 86,18 ± 23,94 ^b | 100,00 ± 0,00 ^b |
| 0,50 | 99,61 ± 0,33 ^b | 89,81 ± 6,50 ^b | 99,81 ± 0,33 ^b |
| 1,00 | 97,85 ± 3,05 ^b | 95,28 ± 0,72 ^b | 94,70 ± 1,72 ^b |
| MEN | | | 66,49 ± 4,35 ^a |
| Control | | | 100,00 ^b |

^{a-b} Valores con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 40. Valores promedio y desviación estándar de viabilidad de la línea celular Caco-2/TC7 expuestas a 12,5 μ M de MEN en co-tratamiento con las muestras en estudio.

| Concentración (mg/mL) | Viabilidad celular (%) | | |
|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| | WPH-A | WPH-AF | WPC-80 |
| 0,125 | 88,57 \pm 6,14 ^{bc} | 97,27 \pm 4,73 ^c | 88,98 \pm 3,71 ^{bc} |
| 0,25 | 87,11 \pm 6,23 ^{bc} | 100,00 \pm 0,00 ^c | 97,18 \pm 3,28 ^c |
| 0,50 | 98,82 \pm 1,31 ^c | 97,72 \pm 3,94 ^c | 79,96 \pm 17,56 ^{ab} |
| 1,00 | 100,00 \pm 0,00 ^c | 100,00 \pm 0,00 ^c | 85,52 \pm 6,56 ^{abc} |
| MEN | | | 71,72 \pm 21,25 ^a |
| Control | | | 100,00 ^c |

^{a-c} Valores con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

No se detectaron diferencias significativas entre las células no expuestas (control) y aquellas tratadas con los ingredientes funcionales, lo que sugiere un alto efecto citoprotector de ambos WPHs, independientemente del tipo de hidrólisis aplicada, en ambas líneas celulares y en todas las concentraciones evaluadas. Además, en la mayoría de los casos el WPC-80 mostró un comportamiento similar a los WPHs, excepto en la línea celular CaCo-2/TC7 a 0,5 mg/mL, donde la restauración de la viabilidad fue ligeramente inferior en comparación con los hidrolizados.

Estos resultados coinciden con los reportados por [Ballatore et al. \(2020\)](#), quienes observaron un efecto citoprotector en IEC-18 tras la exposición a hidrolizados de WPC-35 obtenidos con tripsina, independientemente de la dosis aplicada y sin diferencias significativas con el WPC-35 sin hidrolizar. Asimismo, [Zhang et al. \(2012\)](#) informaron que el WPH obtenido por hidrólisis con pepsina y tripsina tuvo un efecto protector en las células PC12 (células de la línea 12 de feocromocitoma de rata) frente al daño inducido por peróxido de hidrógeno.

Los resultados obtenidos sugieren que los péptidos derivados de la hidrólisis enzimática del WPC-80 poseen propiedades citoprotectoras frente al estrés oxidativo inducido en las líneas celulares IEC-18 y Caco-2/TC7. Estas propiedades antioxidantes podrían tener un efecto positivo frente a diversas enfermedades asociadas con el estrés oxidativo y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) ([O'Keeffe & FitzGerald, 2014](#)).

En conclusión, todas las muestras evaluadas demostraron ser adecuadas en términos de citotoxicidad y evidenciaron un efecto citoprotector significativo frente al estrés oxidativo, lo cual refuerza su potencial empleo como ingredientes funcionales con capacidad para mitigar el daño celular inducido por ROS.

❖ Actividad antihipertensiva

La inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) es un mecanismo clave en la regulación de la presión arterial, y los hidrolizados de proteínas de suero han demostrado potencial como inhibidores naturales de esta enzima. Como se discutió en la sección **4.1.B.4.**, la hidrólisis enzimática permitió la generación de WPHs con una actividad antihipertensiva significativamente superior a la del WPC-80 sin hidrolizar, lo que sugiere la liberación de péptidos con capacidad de inhibición de la ECA.

En este apartado, se analiza la actividad antihipertensiva (AAH) de los ingredientes funcionales obtenidos, expresada como la concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la ECA (IC_{50} , mg/mL). En el **Anexo 9** se presentan las curvas de inhibición de la ECA en función de la concentración de la muestra. Los valores de IC_{50} fueron significativamente más bajos en los ingredientes funcionales en comparación con el WPC-80. En particular, los valores de IC_{50} fueron de $1,76 \pm 0,00$ mg/mL para el WPH-A y $2,45 \pm 0,18$ mg/mL para el WPH-AF, mientras que el WPC-80 presentó un valor considerablemente mayor ($147,89 \pm 4,51$ mg/mL). Estos resultados confirman que la hidrólisis enzimática permitió la liberación de péptidos inhibidores de la ECA, que en la estructura intacta del WPC-80 permanecían inactivos. Así, las condiciones de hidrólisis seleccionadas, junto con las proteasas utilizadas, fueron adecuadas para la generación de compuestos con actividad antihipertensiva (según determinaciones *in vitro*).

La selección de la proteasa y su modo de aplicación (individual o en combinación con otras enzimas) determina el tipo de péptidos inhibidores de la ECA generados tras la hidrólisis, dado que cada enzima actúa sobre sitios de escisión específicos en las proteínas (Xue *et al.*, 2021). En este estudio, no se observaron diferencias significativas en los valores de IC_{50} entre el WPH-A y el WPH-AF, lo que sugiere que la etapa adicional de hidrólisis en el WPH-AF no tuvo un impacto relevante en la AAH. De manera similar, Chirinos *et al.* (2018) reportaron que, en la hidrólisis de proteínas de cañihua, los hidrolizados obtenidos con tratamientos enzimáticos individuales (ALC) y secuenciales (ALC-FLA) durante 120 y 240 min mostraron valores de IC_{50} similares (diferencias no significativas). Sin embargo, a los 180 min, el uso combinado de enzimas produjo un hidrolizado con mayor AAH. En contraste a los resultados obtenidos, Ambigaipalan *et al.* (2015), informaron que la combinación de dos o más enzimas en la hidrólisis de proteínas de semilla de dátiles incrementó la AAH en comparación con el uso de una única enzima.

Por otro lado, se evaluó la estabilidad térmica de los péptidos antihipertensivos presentes en los ingredientes funcionales, sometiéndolos a diferentes tratamientos térmicos. Los resultados, expresados como porcentaje de inhibición de la ECA, se muestran en la **Tabla 41** y en la **Figura 48**. En el WPC-80, los tratamientos térmicos no afectaron significativamente la AAH. Sin embargo,

en los WPHs se observaron diferencias significativas. En el WPH-A, la AAH no solo se mantuvo tras el tratamiento a 63°C durante 30 min, sino que aumentó con los tratamientos térmicos más intensos (72°C durante 1 min y 80°C durante 15 min). En el WPH-AF, la AAH se mantuvo estable con los tratamientos térmicos más intensos, aunque mostró una ligera disminución tras el tratamiento a 63°C durante 30 min. En general, los tratamientos térmicos aplicados no afectaron la AAH de los hidrolizados. Estos resultados son consistentes con estudios previos en péptidos derivados de jamón curado y proteína de soja, en los cuales la actividad inhibidora de la ECA se mantuvo tras distintos tratamientos térmicos (Wu & Ding, 2002; Escudero *et al.*, 2014).

En función de lo observado, resulta evidente que la hidrólisis enzimática mejora significativamente la AAH en los hidrolizados de proteínas de suero, liberando péptidos inhibidores de la ECA con valores de IC₅₀ considerablemente más bajos que los de la proteína no hidrolizada. Además, la estabilidad térmica observada sugiere que estos ingredientes funcionales podrían ser utilizados en la formulación de productos alimenticios procesados térmicamente sin pérdida de su actividad bioactiva.

Tabla 41. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la inhibición de la ECA, en función del tratamiento térmico.

| Tratamiento térmico | Inhibición de la ECA (%) | | |
|---------------------|---------------------------|---------------------------|--------------|
| | WPH-A | WPH-AF | WPC-80 |
| NT | 51,67 ± 2,43 ^a | 40,14 ± 3,32 ^b | 6,55 ± 1,13 |
| A | 50,55 ± 1,62 ^a | 26,83 ± 0,05 ^a | 10,63 ± 0,50 |
| B | 57,24 ± 0,42 ^b | 44,90 ± 1,49 ^b | 10,23 ± 3,39 |
| C | 69,02 ± 2,22 ^c | 44,29 ± 2,15 ^b | 5,14 ± 1,58 |

^{a-c} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Columnas sin letras indican que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). NT: muestra no tratada térmicamente; A: tratamiento a 63°C por 30 min; B: tratamiento a 72°C por 1 min; C: tratamiento a 80°C por 15 min. Concentración del ensayo: 4 mg/mL (WPHs) y 100 mg/mL (WPC-80).

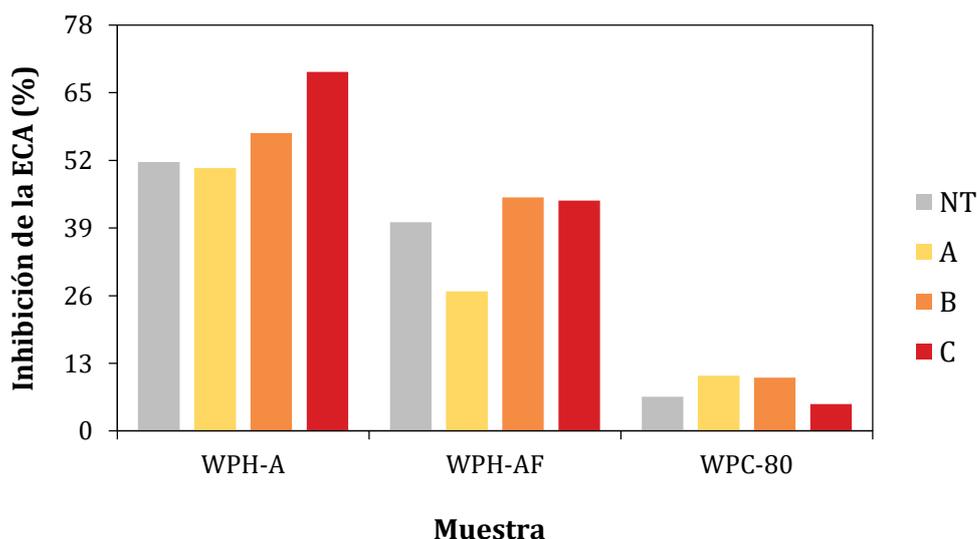


Figura 48. Actividad antihipertensiva tras el tratamiento térmico. **NT:** muestra no tratada térmicamente; **A:** tratamiento a 63°C por 30 min; **B:** tratamiento a 72°C por 1 min; **C:** tratamiento a 80°C por 15 min. Concentración del ensayo: 4 mg/mL (WPHs) y 100 mg/mL (WPC-80).

❖ Actividad antioxidante

La actividad antioxidante (AAO) de los ingredientes funcionales, expresada como capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC, mM), se presenta en la **Tabla 42** y en la **Figura 49.A**. En ambos ingredientes, la AAO fue considerablemente mayor en comparación con el WPC-80, el cual solo mostró capacidad para eliminar radicales ABTS^{•+} a la concentración más alta evaluada [5% (m/v)]. Como se discutió anteriormente (sección **4.1.B.5.**), este comportamiento podría deberse a la liberación de fracciones peptídicas durante la hidrólisis, las cuales presentan mayor reactividad con los radicales libres en comparación con la proteína intacta, permitiendo su estabilización y previniendo su acción oxidativa (Xu *et al.*, 2020). Este aumento en la AAO ha sido reportado en otros estudios que obtuvieron hidrolizados de proteínas de suero utilizando ALC o FLA (Dryáková *et al.*, 2010; Mann *et al.*, 2015). En cuanto a la AAO observada en el WPC-80, esta podría atribuirse a la presencia de proteínas con actividad antioxidante, como lactoferrina e inmunoglobulinas (Ballatore *et al.*, 2020).

Tabla 42. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la actividad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC), en función de la concentración [% (m/v)] y del pH.

| Concentración [% (m/v)] | pH | TEAC (mM Trolox) | | |
|----------------------------|-----|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | | WPH-A | WPH-AF | WPC-80 |
| 0,2 | 4,5 | 0,27 ± 0,07 ^c | 0,17 ± 0,07 ^{bc} | ND ^a |
| | 6,5 | 0,26 ± 0,07 ^c | 0,13 ± 0,11 ^b | ND ^a |
| 1,0 | 4,5 | 3,24 ± 0,02 ^e | 3,21 ± 0,02 ^e | ND ^a |
| | 6,5 | 3,40 ± 0,04 ^f | 3,23 ± 0,01 ^e | ND ^a |
| 5,0 | 4,5 | 6,97 ± 0,06 ^{gh} | 6,90 ± 0,05 ^g | 2,02 ± 0,12 ^d |
| | 6,5 | 7,05 ± 0,03 ^h | 7,04 ± 0,00 ^h | 2,09 ± 0,01 ^d |
| Muestra (M) | | | | S |
| Concentración (C) | | | | S |
| pH | | | | S |
| Interacción M-C | | | | S |
| Interacción M-pH | | | | NS |
| Interacción C-pH | | | | NS |
| Interacción M-C-pH | | | | NS |

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. S: Efecto significativo ($p < 0,05$). NS: Efecto no significativo ($p > 0,05$). ^{a-h} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Respecto a la concentración, los valores de TEAC aumentaron con la concentración del ingrediente, lo que indica una relación directa entre la cantidad de péptidos bioactivos y la AAO. El pH también tuvo un efecto estadísticamente significativo, particularmente en el WPH-A al 1% (m/v) y en el WPH-AF al 5% (m/v), donde se observó la mayor AAO a pH 6,5. No obstante, estas diferencias fueron relativamente pequeñas.

En cuanto al tratamiento enzimático, se encontraron diferencias significativas entre el WPH-A y el WPH-AF, con valores de TEAC más altos en el hidrolizado obtenido exclusivamente con ALC. Un comportamiento similar se observó en hidrolizados obtenidos a partir de aislado de torta de aceite de calabaza, donde los tratados con ALC mostraron una mayor eliminación de radicales ABTS^{•+} que aquellos sometidos a un tratamiento enzimático secuencial con FLA. Este fenómeno puede explicarse considerando que ALC y FLA tienen actividades catalíticas distintas, generando perfiles peptídicos con diferente actividad antioxidante. En ciertos casos, la hidrólisis secuencial con FLA podría degradar péptidos antioxidantes generados por ALC, reduciendo la AAO del hidrolizado final. La actividad antirradical de los hidrolizados depende de la secuencia de aminoácidos y del tamaño molecular de los péptidos generados (Vaštag *et al.*, 2011).

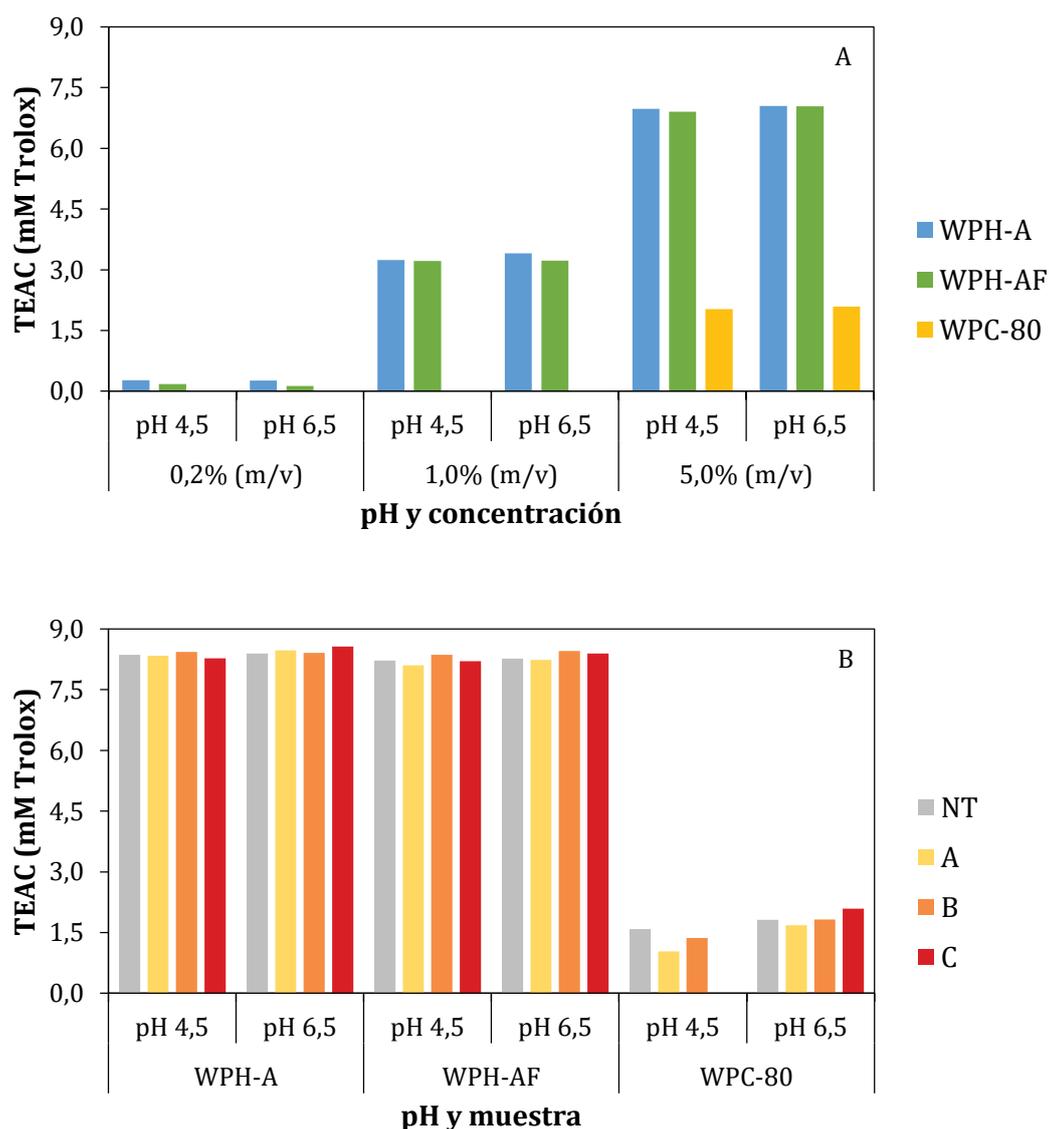


Figura 49. Actividad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC). (A) Efecto del pH y la concentración. (B) Efecto del pH y del tratamiento térmico, a la concentración 5% (m/v). NT: muestra no tratada térmicamente; A: tratamiento a 63°C por 30 min; B: tratamiento a 72°C por 1 min; C: tratamiento a 80°C por 15 min.

Justus *et al.* (2019) observaron que el uso de ALC y FLA en un proceso secuencial o simultáneo para la hidrólisis de proteína de okara produjo hidrolizados con una capacidad antioxidante similar a la de aquellos obtenidos solo con ALC. Esta tendencia también se observó en hidrolizados de cañihua (Chirinos *et al.*, 2018). Por el contrario, en hidrolizados de proteínas de las semillas de *Phoenix dactylifera* L. la combinación de ALC y FLA resultó en un aumento del doble en la AAO respecto a los hidrolizados generados con ALC. Estas diferencias pueden atribuirse a factores como la secuencia peptídica, la cantidad de aminoácidos libres, el grado de hidrólisis y el peso molecular de los péptidos, la relación E/S y el tiempo de uso de cada enzima, los cuales influyen directamente en la AAO (Ambigaipalan *et al.*, 2015).

Por otro lado, se evaluó la estabilidad térmica de los hidrolizados en términos de AAO, cuyos resultados se presentan en la **Tabla 43** y en la **Figura 49.B**. Se observó que los tratamientos térmicos no afectaron significativamente la AAO de los ingredientes funcionales, mientras que en el WPC-80 sí se evidenció una disminución de la actividad antioxidante tras la aplicación de calor. En particular, los valores de TEAC del WPC-80 tratado térmicamente fueron menores que los de la muestra sin tratar. Además, después del tratamiento térmico, el efecto del pH ya no fue significativo en la AAO de los WPHs, mientras que en el WPC-80 sí se observó una influencia del pH, con valores de TEAC superiores a pH 6,5. Es importante destacar que el tratamiento a 80°C durante 15 min del WPC-80 a pH 4,5 provocó la formación de agregados, impidiendo la detección de la actividad antioxidante en esta muestra. Estos resultados concuerdan con estudios previos, como aquellos realizados con péptidos derivados de la biodegradación de plumas de pollo, donde no se observaron diferencias significativas en la actividad inhibidora del radical DPPH tras la aplicación de calor (Alahyaribeik *et al.*, 2021).

Tabla 43. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la AAO, en función del tratamiento térmico y del pH.

| pH | Tratamiento | TEAC (mM Trolox) | | |
|-------------------------|-------------|------------------|-------------|---------------------------|
| | | WPH-A | WPH-AF | WPC-80 |
| 4,5 | NT | 8,36 ± 0,37 | 8,22 ± 0,20 | 1,58 ± 0,18 ^{cd} |
| | A | 8,34 ± 0,22 | 8,10 ± 0,20 | 1,03 ± 0,19 ^b |
| | B | 8,43 ± 0,14 | 8,36 ± 0,16 | 1,36 ± 0,15 ^c |
| | C | 8,28 ± 0,20 | 8,21 ± 0,14 | ND ^a |
| 6,5 | NT | 8,39 ± 0,18 | 8,27 ± 0,27 | 1,81 ± 0,11 ^d |
| | A | 8,47 ± 0,18 | 8,24 ± 0,17 | 1,68 ± 0,10 ^d |
| | B | 8,41 ± 0,37 | 8,45 ± 0,26 | 1,83 ± 0,29 ^{de} |
| | C | 8,57 ± 0,09 | 8,39 ± 0,20 | 2,09 ± 0,25 ^e |
| pH | | NS | NS | S |
| Tratamiento térmico (T) | | NS | NS | S |
| Interacción pH-T | | NS | NS | S |

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. S: Efecto significativo ($p < 0,05$). NS: Efecto no significativo ($p > 0,05$). ^{a-d} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Columnas sin letras indican que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). **NT**: muestra no tratada térmicamente; **A**: tratamiento a 63°C por 30 min; **B**: tratamiento a 72°C por 1 min; **C**: tratamiento a 80°C por 15 min.

Además del efecto antioxidante, los ingredientes funcionales demostraron una actividad citoprotectora significativa en células expuestas a menadiona (MEN), un agente prooxidante que induce el estrés oxidativo en las células. La mejora en la viabilidad celular observada en los ensayos de citoprotección podría estar asociada con la capacidad de los hidrolizados para neutralizar radicales libres, previniendo el daño oxidativo.

La dependencia con la concentración y el pH destaca la importancia de optimizar las condiciones de procesamiento para maximizar el potencial antioxidante. Además, las diferencias observadas entre los tipos de hidrólisis refuerzan la idea de que la selección de la enzima utilizada es un factor determinante en la AAO, ya que cada proteasa genera perfiles peptídicos distintos, afectando su capacidad antirradicalaria. Finalmente, la estabilidad térmica observada sugiere que estos hidrolizados podrían ser utilizados como ingredientes en alimentos funcionales o nutracéuticos, ya que conservan su actividad antioxidante incluso bajo condiciones térmicas típicas de la industria alimentaria y se podrían presentar asimismo como alternativas industriales a los agentes conservantes usualmente empleados.

Dado que los compuestos antioxidantes pueden actuar mediante diferentes mecanismos, y existen diversas metodologías para evaluar su capacidad antioxidante, sería conveniente implementar métodos adicionales que complementen este estudio y permitan una caracterización más profunda de la bioactividad de los hidrolizados obtenidos.

❖ *Actividad antimicrobiana*

La seguridad y vida útil de los alimentos son aspectos fundamentales en la industria alimentaria, constantemente amenazados por la contaminación microbiana. Esta no solo compromete la calidad y estabilidad de los productos, sino que también representa un riesgo significativo para la salud de los consumidores (Osman *et al.*, 2016; Abdel-Hamid *et al.*, 2016). Para prevenir el crecimiento de microorganismos se han implementado diversos métodos, incluidos agentes antimicrobianos sintéticos y naturales (Osman *et al.*, 2016). Sin embargo, la creciente preocupación por los efectos adversos de los conservantes químicos ha impulsado el desarrollo de aditivos naturales con propiedades antimicrobianas, posicionándolos como alternativas prometedoras en la industria alimentaria (Abdel-Hamid *et al.*, 2016).

En este contexto, los péptidos bioactivos con actividad antimicrobiana han despertado gran interés debido a su potencial para mejorar la calidad y seguridad alimentaria, además de su posible aplicación en la salud humana (Brandelli *et al.*, 2015). Entre las fuentes naturales de estos compuestos, las proteínas del lactosuero han demostrado capacidad para inhibir o eliminar una amplia gama de bacterias, gracias a componentes como lactoferrina, lactoperoxidasa, lisozima e

inmunoglobulinas (Almaas *et al.*, 2008; Abdel-Hamid *et al.*, 2016). Aunque la actividad antimicrobiana de lactoferrina y lisozima, y sus fragmentos proteolíticos, ha sido ampliamente estudiada, el potencial de los péptidos bioactivos derivados de β -LG y α -LA sigue siendo menos explorado (Brandelli *et al.*, 2015).

En este trabajo, se evaluó la actividad antimicrobiana (AAM) de los ingredientes funcionales, en comparación con el WPC-80. Los ensayos se realizaron contra bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*) y Gram positivas (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Listeria monocytogenes*), considerando el efecto del pH (3, 4,5, 6,5, 7,5 y 8,5) y de la concentración de muestra (50, 100 y 200 mg/mL). Respecto al pH, la AAM se observó exclusivamente a pH ácido (pH 3 y 4,5), mientras que en condiciones neutras o alcalinas (pH 6,5, 7,5 y 8,5), no se detectó inhibición en ninguna de las muestras analizadas.

A pH 3 (**Tabla 44**), se observó AAM contra todas las bacterias evaluadas, con un efecto dependiente de la concentración. A medida que aumentó la concentración de las muestras, se registraron halos de inhibición de mayor diámetro, con los valores más altos a 200 mg/mL. En general, el WPH-AF mostró la mayor AAM, seguido por el WPH-A, mientras que el WPC-80 solo presentó AAM a la concentración más alta. Ejemplos representativos de los halos de inhibición se presentan en la **Figura 50**.

A pH 4,5 (**Tabla 45**), la AAM fue más limitada, detectándose inhibición únicamente en *E. coli*, *L. monocytogenes* y *E. faecalis*. En este caso, los ingredientes funcionales lograron inhibir *L. monocytogenes* y *E. coli* a la concentración de 200 mg/mL, mientras que solo el WPH-AF mostró actividad a 100 mg/mL contra *E. coli* y *E. faecalis*. A concentraciones más bajas (50 mg/mL), no se observó AAM en ninguna de las muestras.

En términos generales, el WPH-AF fue el ingrediente funcional con mayor AAM, seguido por el WPH-A, mientras que el WPC-80 mostró actividad limitada y exclusivamente a pH 3 y altas concentraciones. La actividad antimicrobiana observada en el WPC-80 podría atribuirse a algunos de sus componentes proteicos, como inmunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidasa y/o lisozima (Osman *et al.*, 2016; Abdel-Hamid *et al.*, 2016).

Por otro lado, la mayor AAM observada en los WPHs sugiere que el proceso de hidrólisis enzimática permitió la liberación de péptidos bioactivos con propiedades antimicrobianas. En particular, el empleo de una hidrólisis en dos etapas con ALC y FLA de manera secuencial favoreció esta liberación, generando un WPH con mayor potencial antimicrobiano.

Tabla 44. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a los halos de inhibición del crecimiento para diferentes microorganismos expuestos a WPH-A, WPH-AF y WPC-80 a pH 3.

| M.O | Concentración (mg/mL) | Diámetro de los halos de inhibición (mm) | | |
|----------------------|-----------------------|--|-------------------------------|----------------------------|
| | | WPH-A | WPH-AF | WPC-80 |
| P.A | 50 | ND ^a | 12,00 ± 0,00 ^{fgh} | ND ^a |
| | 100 | 12,25 ± 0,35 ^{gh} | 14,25 ± 0,35 ^{klmn} | ND ^a |
| | 200 | 14,75 ± 0,35 ^{lmno} | 14,25 ± 0,35 ^{klmn} | 8,75 ± 0,35 ^b |
| E.C | 50 | 10,50 ± 0,71 ^{cde} | 12,00 ± 0,00 ^{fgh} | ND ^a |
| | 100 | 12,00 ± 0,00 ^{fgh} | 13,50 ± 0,71 ^{ijk} | ND ^a |
| | 200 | 15,00 ± 0,00 ^{mno} | 14,75 ± 0,35 ^{lmno} | 8,75 ± 0,35 ^b |
| S.A | 50 | 11,50 ± 0,71 ^{efg} | 13,50 ± 0,71 ^{ijk} | ND ^a |
| | 100 | 14,00 ± 1,41 ^{ijklm} | 15,25 ± 1,06 ^{no} | ND ^a |
| | 200 | 17,50 ± 0,71 ^p | 15,50 ± 0,71 ^o | ND ^a |
| E.F | 50 | 10,00 ± 1,41 ^{cd} | 11,00 ± 0,00 ^{def} | ND ^a |
| | 100 | 12,00 ± 0,00 ^{fgh} | 13,00 ± 0,00 ^{hij} | ND ^a |
| | 200 | 14,50 ± 0,71 ^{klmno} | 14,00 ± 0,00 ^{ijklm} | 9,50 ± 0,71 ^{bc} |
| L.M | 50 | 11,00 ± 0,00 ^{def} | 11,50 ± 0,71 ^{efg} | ND ^a |
| | 100 | 12,00 ± 0,00 ^{fgh} | 12,75 ± 1,06 ^{hi} | ND ^a |
| | 200 | 13,50 ± 0,71 ^{ijk} | 13,75 ± 0,35 ^{ijkl} | 10,5 ± 0,71 ^{cde} |
| Concentración (C) | | | | S |
| Muestra (M) | | | | S |
| Microorganismo (M.O) | | | | S |
| Interacción C-M | | | | S |
| Interacción C-M.O | | | | S |
| Interacción M-M.O | | | | S |
| Interacción C-M-M.O | | | | S |

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. S: Efecto significativo ($p < 0,05$). ^{a-p} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). **ND**: no detectable. **P.A**: *Pseudomonas aeruginosa*; **E.C**: *Escherichia coli*; **S.A**: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*; **E.F**: *Enterococcus faecalis*; **L.M**: *Listeria monocytogenes*.

Tabla 45. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a los halos de inhibición del crecimiento para diferentes microorganismos expuestos a WPH-A, WPH-AF y WPC-80 a pH 4,5.

| M.O | Concentración (mg/mL) | Diámetro de los halos de inhibición (mm) | | |
|----------------------|-----------------------|--|---------------------------|-----------------|
| | | WPH-A | WPH-AF | WPC-80 |
| P.A | 50 | ND ^a | ND ^a | ND ^a |
| | 100 | ND ^a | ND ^a | ND ^a |
| | 200 | ND ^a | ND ^a | ND ^a |
| E.C | 50 | ND ^a | ND ^a | ND ^a |
| | 100 | ND ^a | 8,00 ± 0,00 ^b | ND ^a |
| | 200 | 9,50 ± 0,71 ^d | 10,50 ± 0,71 ^e | ND ^a |
| S.A | 50 | ND ^a | ND ^a | ND ^a |
| | 100 | ND ^a | ND ^a | ND ^a |
| | 200 | ND ^a | ND ^a | ND ^a |
| E.F | 50 | ND ^a | ND ^a | ND ^a |
| | 100 | ND ^a | 9,00 ± 0,00 ^c | ND ^a |
| | 200 | ND ^a | ND ^a | ND ^a |
| L.M | 50 | ND ^a | ND ^a | ND ^a |
| | 100 | ND ^a | ND ^a | ND ^a |
| | 200 | 9,50 ± 0,71 ^d | 10,50 ± 0,71 ^e | ND ^a |
| Concentración (C) | | | | S |
| Muestra (M) | | | | S |
| Microorganismo (M.O) | | | | S |
| Interacción C-M | | | | S |
| Interacción C-M.O | | | | S |
| Interacción M-M.O | | | | S |
| Interacción C-M-M.O | | | | S |

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. S: Efecto significativo ($p < 0,05$). ^{a-e} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). **ND**: no detectable. **P.A**: *Pseudomonas aeruginosa*; **E.C**: *Escherichia coli*; **S.A**: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*; **E.F**: *Enterococcus faecalis*; **L.M**: *Listeria monocytogenes*.

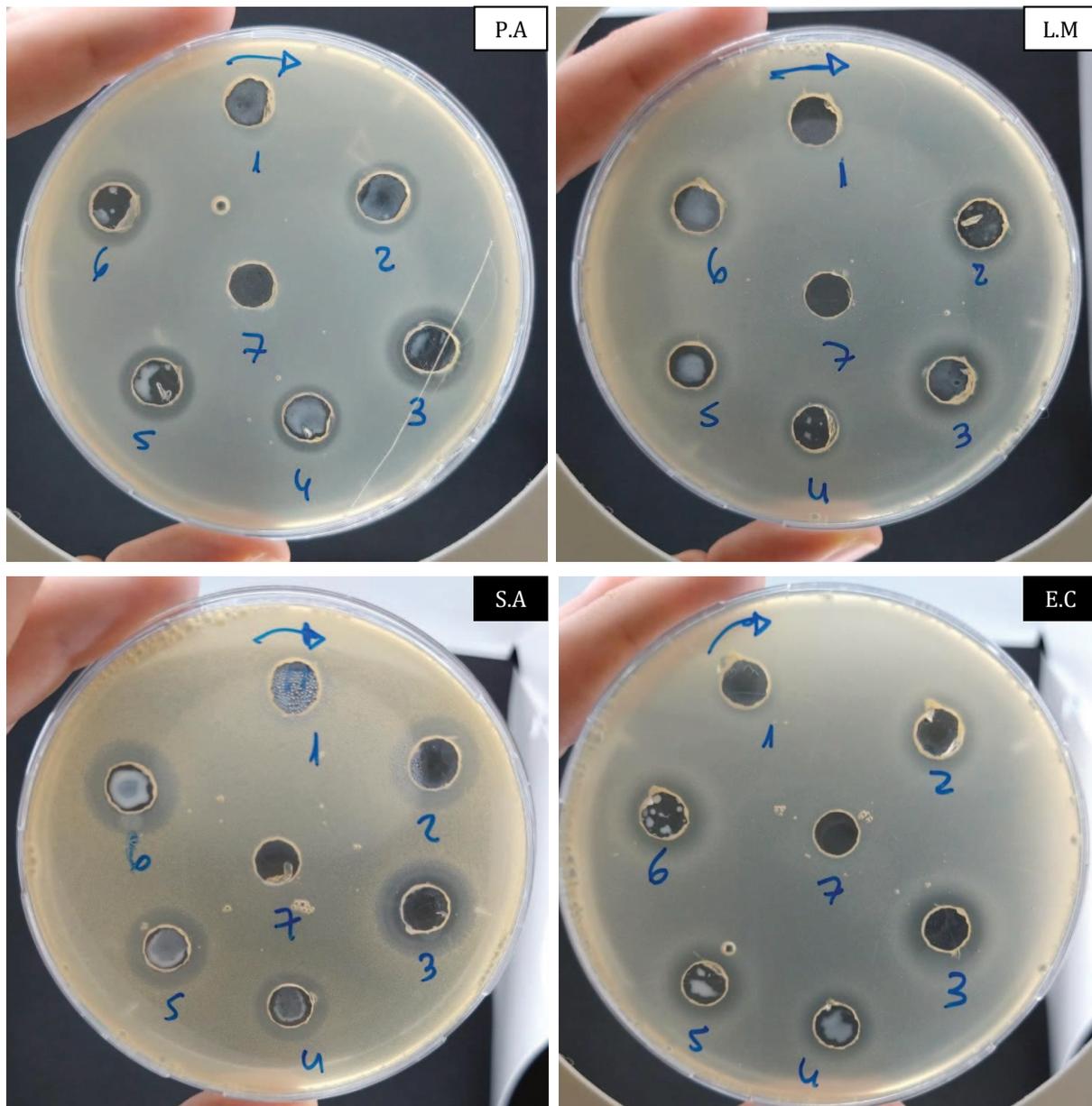


Figura 50. Halos de inhibición del crecimiento. **P.A:** *Pseudomonas aeruginosa*; **L.M:** *Listeria monocytogenes*; **S.A:** *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*; **E.C:** *Escherichia coli*. **Pocillos 1-2-3:** WPH-A pH 3, 50 mg/mL (1), 100 mg/mL (2), 200 mg/mL (3); **Pocillos 4-5-6:** WPH-AF pH 3, 50 mg/mL (4), 100 mg/mL (5), 200 mg/mL (6); **Pocillo 7:** WPH-A pH 4,5 50 mg/mL.

Estos hallazgos son consistentes con lo reportado en estudios previos. Por ejemplo, [Osman et al. \(2016\)](#) reportaron que un hidrolizado de suero de leche de cabra obtenido con ALC (DH 28%) mostró AAM contra bacterias patógenas y alterantes de alimentos, tanto Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus cereus* ATCC 33018) como Gram negativas (*Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 y *Escherichia coli* ATCC 8739). Además, el suero no hidrolizado mostró inhibición limitada (contra *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*), reforzando el papel de la hidrólisis en la mejora de la AAM. De manera similar, [Abdel-Hamid et al.](#)

(2016) probaron que la hidrólisis de proteínas de suero de camello con papaína mejoró significativamente su actividad antimicrobiana en comparación a la proteína sin hidrolizar. [Almaas et al. \(2008\)](#) informaron que proteínas de suero caprino digeridas por enzimas proteolíticas humanas presentaron AAM contra *Listeria monocytogenes*, un efecto no observado en las proteínas sin hidrolizar.

El empleo de ALC y FLA en la hidrólisis de proteínas de lactosuero bovino resultó en la liberación de péptidos bioactivos con actividad antimicrobiana, cuya efectividad fue dependiente de la concentración y de las condiciones de pH (principalmente a pH ácidos). Estos resultados destacan el potencial de los WPHs como ingredientes funcionales en la industria alimentaria, particularmente en formulaciones que requieran control microbiano en condiciones ácidas. Además, estos péptidos podrían representar una alternativa natural a los conservantes sintéticos, contribuyendo a la seguridad y estabilidad de los alimentos sin comprometer la salud del consumidor.

❖ *Capacidad quelante de calcio*

Diversos suplementos comerciales de calcio han sido desarrollados para abordar su deficiencia en el organismo humano. Los compuestos inorgánicos, como el carbonato y el cloruro de calcio, son los más comunes, sin embargo, tienden a formar sales insolubles en el ambiente intestinal alcalino, lo que limita significativamente su absorción ([Lin et al., 2024](#)). Como alternativa, los suplementos orgánicos de calcio, como el gluconato y el lactato de calcio, han demostrado una mayor capacidad de absorción ([Wu et al., 2019](#)). En los últimos años, los complejos péptido-calcio han surgido como una estrategia innovadora, ya que permanecen solubles durante la digestión, mejorando así la biodisponibilidad del mineral ([Sun et al., 2016](#); [Lin et al., 2024](#)).

La capacidad de los péptidos para quelar calcio depende de varios factores, incluyendo el tipo de proteasa utilizada, el grado de hidrólisis, el peso molecular de los péptidos y su composición aminoacídica, además de otras condiciones propias de la reacción (que determinan la interacción) tales como la relación péptido/calcio, el tiempo de quelación y la temperatura ([Wu et al., 2019](#)). En este contexto, los WPHs con capacidad quelante de calcio representan una alternativa a ser considerada para mejorar la biodisponibilidad del mineral y prevenir deficiencias nutricionales.

En este trabajo, se evaluó la capacidad quelante de calcio (Ca-CC) de los ingredientes funcionales en función del efecto combinado de tres variables: pH (X1), temperatura (X2) y

relación péptido-calcio (X3), utilizando un diseño compuesto central (CCD). Los valores de Ca-CC obtenidos oscilaron entre 3,23 y 11,08 µg/mg (**Tabla 46**).

Estudios previos reportaron valores superiores de Ca-CC para los WPHs generados con Flavourzyme® y Protamex®, alcanzando valores de 23,9 a 34,9 µg/mg según el tiempo de hidrólisis (Zhao *et al.*, 2015). Además, la purificación de estos hidrolizados permitió identificar péptidos específicos con capacidades quelantes significativamente mayores, como el tripéptido Tyr-Asp-Thr (79,5 µg/mg) y los dipéptidos Phe-Asp (73,34 µg/mg), Gly-Tyr (75,38 µg/mg) y Glu-Gly (67,81 µg/mg) (Zhao *et al.*, 2014a, 2014b; Zhao *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015).

El uso de proteasas desempeña un papel fundamental en la hidrólisis enzimática, ya que determina las propiedades bioactivas de los hidrolizados. Diversas enzimas, como pepsina, tripsina, proteasa M y Flavourzyme®, han sido utilizadas en la producción de péptidos con capacidad quelante de calcio (Sun *et al.*, 2016). En este estudio, Alcalase® 2.4L, sola o en combinación secuencial con Flavourzyme® 500L, permitió obtener ingredientes funcionales con capacidad para ligar calcio. Las **ecuaciones 18** y **19** representan las expresiones polinómicas de segundo orden en términos codificados para la Ca-CC del WPH-A y del WPH-AF, obtenidas tras eliminar los términos no significativos, que explican los efectos combinados de las variables del proceso.

$$Y_{WPH-A} = 5,53 - 0,15 \times X1 - 0,93 \times X2 - 2,48 \times X3 + 1,05 \times X2 \times X3 + 0,26 \times X1^2 + 0,70 \times X3^2 \quad (18)$$

$$Y_{WPH-AF} = 5,55 - 0,54 \times X2 - 2,33 \times X3 + 0,47 \times X2 \times X3 + 0,99 \times X3^2 \quad (19)$$

Respecto al ingrediente **WPH-A**, todas las variables estudiadas tuvieron un impacto negativo en la Ca-CC, siendo la relación péptido/calcio (X3) la de mayor influencia y el pH la de menor impacto (X1). La interacción positiva entre la temperatura (X2) y la relación péptido/calcio (X3), sugiere que ciertas combinaciones específicas pueden optimizar la Ca-CC. Por otro lado, en el **WPH-AF**, el pH (X1) no tuvo un efecto significativo, mientras que tanto la temperatura (X2) como la relación péptido/calcio (X3) mostraron un efecto negativo lineal. Sin embargo, al igual que en el WPH-A, la interacción positiva entre la temperatura (X2) y la relación péptido/calcio (X3) resalta la importancia de un balance óptimo entre estas variables. En ambos hidrolizados, la relación entre las concentraciones utilizadas para la mezcla péptido/calcio (X3) fue la variable más determinante, mostrando además un efecto cuadrático que indica que niveles intermedios son más favorables para maximizar la Ca-CC. Mientras que el WPH-A fue más sensible a las combinaciones de variables, el WPH-AF demostró ser más robusto frente a variaciones en el pH.

En las **Figuras 51** y **52** se presentan los diagramas de contorno que muestran el efecto combinado de la temperatura y la relación péptido/calcio sobre la Ca-CC de cada ingrediente.

Tabla 46. Valores experimentales (Exp.) y predichos por el modelo correspondientes a la capacidad quelante de calcio (Ca-CC, $\mu\text{g Ca/ mg WPH}$) de los ingredientes funcionales.

| | WPH-A | | WPH-AF | |
|----|-------------------|----------|------------------|----------|
| | Exp. | Predicho | Exp. | Predicho |
| 1 | 11,08 \pm 1,07 | 11,09 | 10,26 \pm 0,62 | 9,90 |
| 2 | 11,01 \pm 0,81 | 10,80 | 9,59 \pm 0,08 | 9,90 |
| 3 | 7,01 \pm 0,12 | 7,15 | 7,38 \pm 0,41 | 7,86 |
| 4 | 9,18 \pm 0,13* | - | 8,54 \pm 0,02 | 7,86 |
| 5 | 3,80 \pm 1,14 | 4,04 | 4,68 \pm 0,12 | 4,29 |
| 6 | 4,27 \pm 0,04 | 3,74 | 4,34 \pm 0,06 | 4,29 |
| 7 | 4,71 \pm 0,12 | 4,28 | 4,40 \pm 0,24 | 4,15 |
| 8 | 3,51 \pm 0,25 | 3,99 | 4,47 \pm 0,68 | 4,15 |
| 9 | 6,54 \pm 0,30 | 6,52 | 5,73 \pm 0,33 | 5,55 |
| 10 | 5,90 \pm 0,10 | 6,02 | 5,13 \pm 0,27 | 5,55 |
| 11 | 7,36 \pm 0,33 | 7,09 | 6,77 \pm 0,02 | 6,47 |
| 12 | 4,65 \pm 0,39 | 3,97 | 4,77 \pm 0,16 | 4,64 |
| 13 | 11,01 \pm 0,12* | - | 9,69 \pm 0,47* | - |
| 14 | 3,23 \pm 0,15 | 3,34 | 3,99 \pm 0,14 | 4,45 |
| 15 | 5,56 \pm 0,44 | 5,53 | 4,85 \pm 0,10 | 5,55 |
| 16 | 5,01 \pm 0,36 | 5,53 | 5,00 \pm 0,10 | 5,55 |
| 17 | 5,65 \pm 0,03 | 5,53 | 4,94 \pm 0,28 | 5,55 |
| 18 | 5,24 \pm 0,21 | 5,53 | 5,31 \pm 0,40 | 5,55 |
| 19 | 5,11 \pm 0,06 | 5,53 | 6,14 \pm 0,61 | 5,55 |
| 20 | 5,57 \pm 0,38 | 5,53 | 6,06 \pm 0,66 | 5,55 |

*Valor atípico (*outlier*) del modelo.

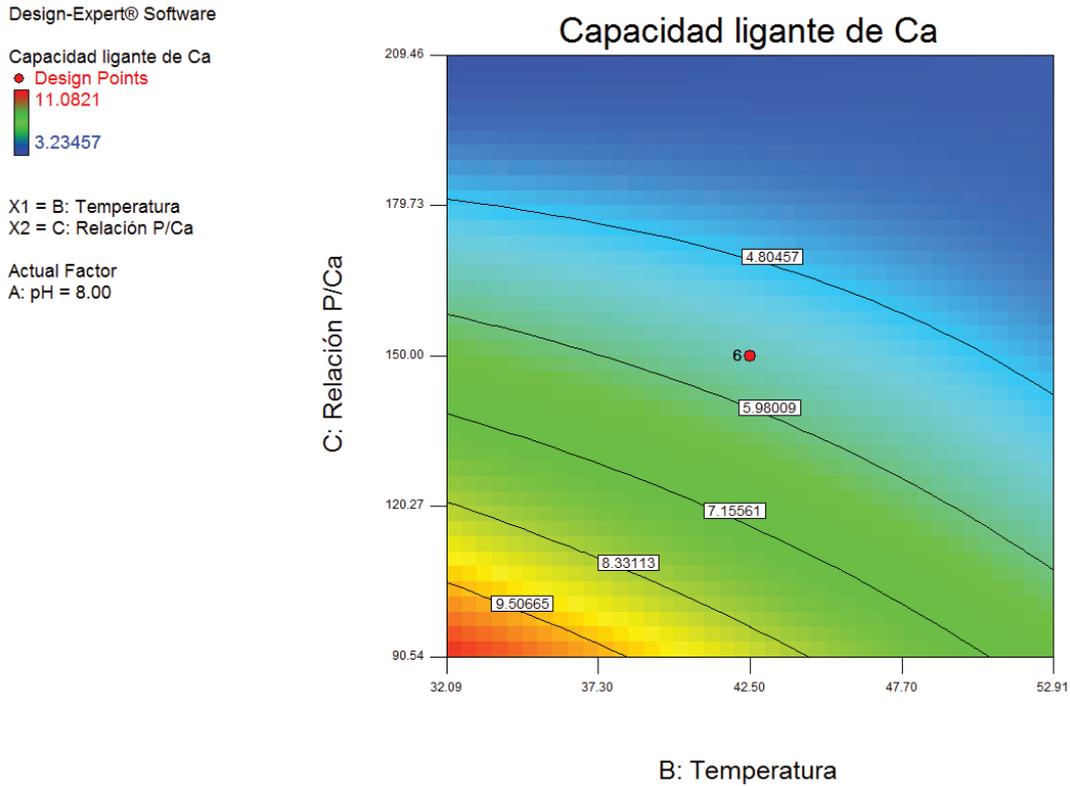


Figura 51. Diagrama de contorno que muestra el efecto combinado de la temperatura y la relación péptido/calcio a pH 8 sobre la actividad quelante de calcio del WPH-A.

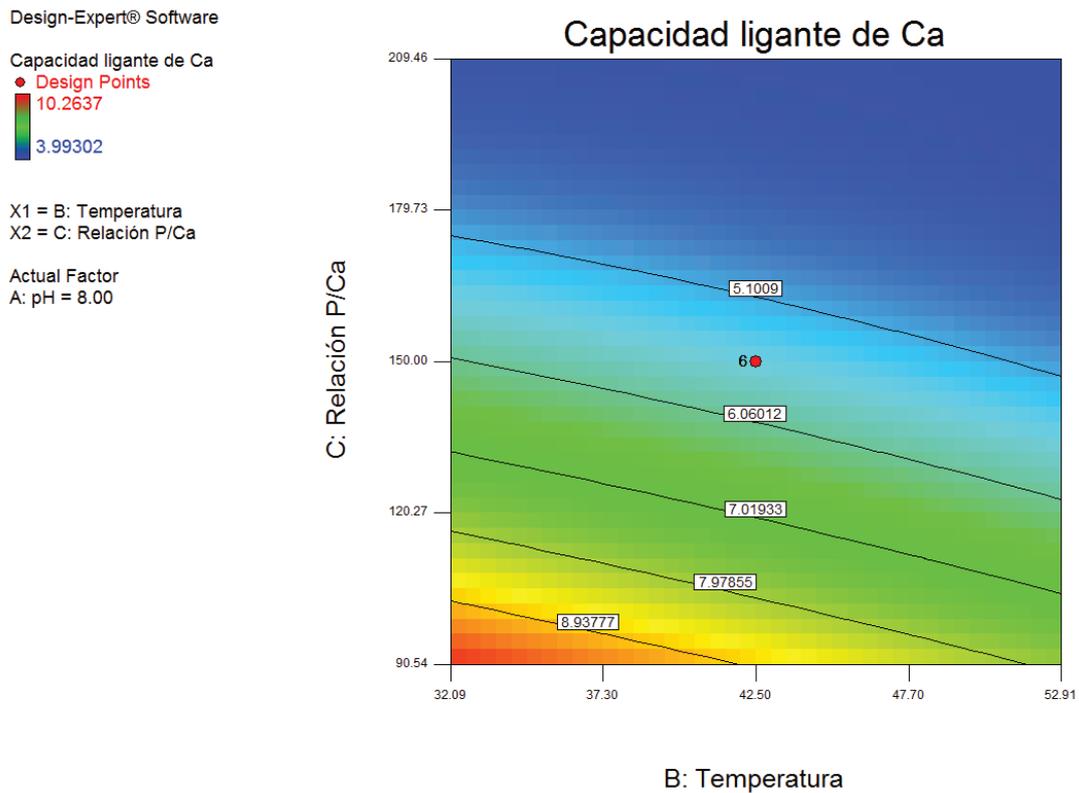


Figura 52. Diagrama de contorno que muestra el efecto combinado de la temperatura y la relación péptido/calcio a pH 8 sobre la actividad quelante de calcio del WPH-AF.

El CCD desarrollado fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$) y sin falta de ajuste significativa ($p > 0,05$). Además, se obtuvo una señal satisfactoria para la respuesta evaluada (precisión adecuada > 4). Los experimentos realizados mostraron buena precisión y fiabilidad, con valores relativamente bajos del coeficiente de variación ($CV < 10\%$). Por su parte, los valores experimentales y los valores predichos por las ecuaciones del modelo presentaron una estrecha relación (**Tabla 46**).

Luego del análisis de los resultados obtenidos, se generaron dos formulaciones adicionales utilizando los datos proporcionados por los modelos matemáticos ajustados con la metodología de superficie de respuesta (**Ecuaciones 18 y 19**) para ajustar las condiciones del proceso y lograr la mayor Ca-CC en los WPHs. Los modelos matemáticos utilizados fueron robustos, como lo demuestra la fuerte correlación entre los valores experimentales y los predichos (error del 4,23% para el WPH-A y 0,68% para el WPH-AF). Además, la Ca-CC de los WPHs bajo las condiciones propuestas por la herramienta de optimización del software Design-Expert® fue mayor que cualquier otra condición evaluada durante la ejecución del CCD. Los valores experimentales más altos de Ca-CC alcanzados fueron $13,23 \pm 1,02 \mu\text{g}/\text{mg}$ para el WPH-A y $14,64 \pm 2,34 \mu\text{g}/\text{mg}$ para el WPH-AF, en las condiciones de reacción de quelación de pH 6, relación WPH/calcio de 50:1 m/m y temperaturas de $42,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (WPH-A) y $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (WPH-AF).

Finalmente, este estudio confirma que los WPHs obtenidos mediante hidrólisis enzimática con ALC y su combinación secuencial con FLA presentan una Ca-CC significativa. Aunque los valores máximos alcanzados fueron inferiores a los reportados con péptidos purificados, los modelos desarrollados y testeados en el presente trabajo de Tesis ofrecen una base sólida para futuras optimizaciones.

La caracterización de las **propiedades bioactivas** mostró que los ingredientes funcionales y el WPC-80 son seguros (no citotóxicos) y pueden actuar como citoprotectores, ya que restauraron la viabilidad celular en modelos expuestos a estrés oxidativo inducido por menadiona.

Asimismo, los hidrolizados WPH-A y WPH-AF demostraron propiedades bioactivas superiores al WPC-80, destacándose en actividad antihipertensiva, antioxidante y antimicrobiana, lo que confirma que la hidrólisis enzimática potencia su funcionalidad biológica. Además, los compuestos responsables de la actividad antihipertensiva y antioxidante se mantuvieron estables frente a tratamientos térmicos, reforzando su potencial aplicabilidad en la industria alimentaria. Los ingredientes funcionales también exhibieron capacidad quelante de calcio, lo que sugiere realizar estudios complementarios para explorar su posible uso en formulaciones destinadas a la fortificación mineral.

En la comparación entre ambos ingredientes funcionales, sus propiedades bioactivas fueron en gran medida similares, diferenciándose levemente en las determinaciones de actividad antioxidante y antimicrobiana.

Los resultados obtenidos brindan información de particular interés para la obtención y/o selección de ingredientes en función de su bioactividad, abriendo nuevas oportunidades para el desarrollo de productos con beneficios específicos para la salud y aplicaciones industriales innovadoras. En este sentido, evaluar el comportamiento y la influencia de ambos hidrolizados al ser empleados para formular un alimento, resulta de especial relevancia.

4.3. INCORPORACIÓN DE LOS INGREDIENTES EN UNA MATRIZ ALIMENTARIA

Las tendencias actuales de consumo se centran en la relación entre alimentación y salud, con una creciente preferencia por alimentos considerados saludables. En respuesta a esta demanda, la industria alimentaria desarrolla continuamente nuevos productos para satisfacer las necesidades de los consumidores (Staffolo *et al.*, 2007). En este contexto, los alimentos funcionales han cobrado especial relevancia, ya que, además de su aporte nutricional, ofrecen beneficios para una o más funciones fisiológicas, mejorando la salud y reduciendo el riesgo de enfermedades (Krunic *et al.*, 2018).

Los hidrolizados de proteínas, obtenidos mediante hidrólisis controlada con enzimas proteolíticas, representan una alternativa prometedora para la formulación de alimentos funcionales debido a sus actividades biológicas, que pueden generar efectos beneficiosos para la salud (Bazsefidpar *et al.*, 2024). En particular, los hidrolizados de proteínas de suero han despertado gran interés para ser usados como ingredientes funcionales (Goudarzi *et al.*, 2015). Sin embargo, para que estos compuestos ejerzan su efecto, deben conservar su bioactividad tras su inclusión en matrices alimentarias, durante el almacenamiento y durante el proceso de digestión hasta llegar a su sitio de absorción. Por lo tanto, el principal desafío en la incorporación de compuestos bioactivos en alimentos funcionales es garantizar su estabilidad en la matriz, ya que pueden producirse interacciones químicas con otros ingredientes de la formulación, afectando su funcionalidad (Rivero-Pino *et al.*, 2020). Por ello, la selección de una matriz adecuada es clave para preservar la bioactividad del ingrediente funcional (Ghanbari *et al.*, 2017). Así, diferentes autores han evaluado la incorporación de WPHs en formulaciones tales como bebidas a base de suero lácteo (Athira *et al.*, 2015), yogures bebibles (Lim *et al.*, 2011), jugos de manzana (Goudarzi *et al.*, 2015) y leches saborizadas (Mann *et al.*, 2015).

Los postres lácteos comprenden una amplia variedad de formulaciones y presentan una alta aceptación por parte de los consumidores. Estas matrices permiten la incorporación de

ingredientes tanto tradicionales como innovadores, dando lugar a productos con características físicas, nutricionales y sensoriales diversas que influyen directamente en su aceptación (Yilmaz-Ersan *et al.*, 2019). Representan una opción atractiva para el desarrollo de alimentos funcionales debido a su amplio consumo a nivel global y a la continua expansión del mercado con nuevas formulaciones (Ghanbari *et al.*, 2017; Nikpour & Mosavian, 2025). Además, son consumidos por distintos grupos etarios, incluidos niños y adultos mayores. Su formulación básica incluye leche, espesantes, endulzantes, aromatizantes y colorantes, componentes que determinan sus propiedades físicas y sensoriales (Tárrega & Costell, 2007).

Las propiedades sensoriales son fundamentales para que un producto tenga éxito en el mercado (Smith *et al.*, 2016). Por ejemplo, y más allá del desafío de conservar la bioactividad de los potenciales ingredientes funcionales, el posible desarrollo de sabor amargo asociado a los hidrolizados de proteínas resalta la necesidad de formular matrices alimentarias capaces de enmascarar esta percepción negativa. En este contexto, el análisis sensorial de las formulaciones obtenidas resulta clave, especialmente en lo que respecta a la aceptación del producto por parte de los consumidores.

En la presente Tesis, los ingredientes obtenidos fueron incorporados en una matriz alimentaria de postre lácteo, generando dos formulaciones experimentales: FWPH-A y FWPH-AF. Además, se desarrollaron dos formulaciones de referencia: una con WPC-80 (FWPC-80) y una formulación control (FC) sin proteína de suero ni sus hidrolizados. La concentración utilizada de WPH fue del 1% (m/m), dentro del rango reportado en la bibliografía (0,5 a 2%). Esta elección se basó en resultados previos exitosos que demostraron la factibilidad de incorporar WPHs en matrices alimentarias similares sin afectar negativamente la aceptabilidad sensorial general (Lim *et al.*, 2011; Mann *et al.*, 2015; Athira *et al.*, 2015; Ozorio *et al.*, 2019). Las distintas formulaciones obtenidas en este estudio fueron evaluadas en términos de sus propiedades sensoriales y bioactivas, además de su estabilidad frente a la sinéresis durante el almacenamiento. Los resultados obtenidos se presentan en los apartados siguientes.

4.3.A. Análisis sensorial de las formulaciones de postres lácteos

El análisis sensorial de productos alimenticios puede abordarse mediante pruebas descriptivas y afectivas. Las pruebas descriptivas emplean panelistas entrenados y tienen un carácter objetivo, ya que buscan describir y cuantificar los atributos sensoriales. En cambio, las pruebas afectivas, involucran consumidores y miden la preferencia o grado de gusto hacia un alimento (Smith *et al.*, 2016).

Dentro de las pruebas descriptivas, el Análisis Sensorial Descriptivo Cuantitativo (QDA®) es una de las metodologías más completas y precisas para la caracterización sensorial de alimentos, ya que permite describir y cuantificar la intensidad de atributos específicos de manera reproducible y confiable (Morais *et al.*, 2015; Dzhivoderova-Zarcheva *et al.*, 2024). La objetividad del QDA® se debe a la estandarización de procedimientos y la capacitación del panel, lo que minimiza el sesgo en las evaluaciones (Dzhivoderova-Zarcheva *et al.*, 2024). Sin embargo, una limitación de esta metodología es que los evaluadores entrenados pueden identificar atributos que los consumidores no perciben como relevantes, o describir el producto de un modo que no refleje la experiencia real de consumo (Bruzzone *et al.*, 2012).

Por ello, la combinación del QDA® con estudios basados en consumidores resulta fundamental, ya que permite contrastar la descripción objetiva con la aceptación real del alimento.

Las pruebas afectivas generalmente miden el agrado mediante escalas hedónicas o evalúan la preferencia entre productos (Smith *et al.*, 2016). Estos estudios son especialmente importantes en el desarrollo de alimentos funcionales, donde el éxito comercial no solo depende de sus beneficios para la salud, sino también de su aceptación sensorial.

4.3.A.1. Análisis Sensorial Descriptivo Cuantitativo (QDA®)

En el análisis QDA® de las formulaciones de postres lácteos se evaluaron 19 atributos sensoriales vinculados a aspectos visuales, texturales, gustativos y de flavor. Los resultados se presentan en la **Tabla 47**.

De manera general, todas las formulaciones se caracterizaron por presentar elevado brillo, suavidad, textura uniforme y alta consistencia, atributos valorados positivamente por los consumidores en este tipo de productos (Ares *et al.*, 2010). Por otro lado, no se informaron registros de sinéresis, gusto amargo, gusto salado, sabor a cocido ni filancia en ninguna de las muestras, lo que indica una percepción sensorial favorable. La ausencia de sinéresis es especialmente relevante, ya que en general es considerada negativa por los consumidores en postres lácteos (Ares *et al.*, 2010). Asimismo, la ausencia de sabor amargo y salado en FWPH-A y FWPH-AF resulta destacable, dado que la hidrólisis proteica suele generar péptidos que contribuyen al desarrollo de sabor amargo y/o puede incrementar la percepción “salada” debido a la acumulación de cenizas durante el proceso. Estos resultados coinciden positivamente con lo informado por Ozorio *et al.* (2019), quienes también mencionaron ausencia de sabor amargo en postres lácteos comerciales enriquecidos con hidrolizados proteicos obtenidos con pepsina.

Tabla 47. Valores promedio y desviación estándar (n=8) de los descriptores sensoriales evaluados por el panel entrenado en el Análisis Cuantitativo Descriptivo (QDA®) de las formulaciones de postres lácteos a los 6/7 días de elaboración a 8 °C.

| Descriptor/Muestra | FC | FWPC-80 | FWPH-A | FWPH-AF |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Color Característico | 6,04 ± 0,69 ^a | 5,20 ± 0,55 ^b | 6,05 ± 0,56 ^a | 4,49 ± 0,51 ^b |
| Brillo | 8,44 ± 0,54 ^a | 8,48 ± 0,54 ^a | 8,81 ± 0,49 ^a | 7,63 ± 0,49 ^b |
| Sinéresis | ND | ND | ND | ND |
| Consistencia | 8,10 ± 0,78 | 8,46 ± 0,73 | 7,85 ± 0,56 | 8,76 ± 0,58 |
| Uniformidad de la Masa | 9,00 ± 0,27 | 8,25 ± 0,73 | 8,16 ± 0,88 | 8,94 ± 0,50 |
| Filancia | ND | ND | ND | ND |
| Suavidad | 8,88 ± 0,79 ^a | 8,14 ± 0,95 ^{ab} | 7,58 ± 0,45 ^b | 7,68 ± 0,90 ^b |
| Adherencia | 1,94 ± 0,31 ^b | 1,94 ± 0,63 ^b | 3,14 ± 0,59 ^a | 2,41 ± 0,49 ^b |
| Cremosidad | 6,98 ± 0,66 ^{ab} | 7,49 ± 0,82 ^a | 6,53 ± 0,45 ^b | 7,50 ± 0,67 ^a |
| Gusto Dulce | 6,34 ± 0,87 ^{ab} | 6,09 ± 0,66 ^{ab} | 5,38 ± 0,53 ^b | 6,39 ± 0,76 ^a |
| Gusto Amargo | ND | ND | ND | ND |
| Gusto Salado | ND | ND | ND | ND |
| Sabor Dulce de Leche | 5,99 ± 0,78 ^a | 4,08 ± 0,61 ^b | 4,06 ± 0,47 ^b | 3,55 ± 0,53 ^b |
| Sabor a Crema | 4,01±0,29 ^a | 2,96 ± 0,30 ^{bc} | 3,19 ± 0,49 ^b | 2,54 ± 0,58 ^c |
| Sabor a Polvo | 3,01±0,42 ^{bc} | 2,69 ± 0,45 ^c | 3,91 ± 0,56 ^a | 3,56 ± 0,65 ^{ab} |
| Sabor Lácteo | 3,00±0,51 ^b | 3,91 ± 0,54 ^a | 2,98 ± 0,46 ^b | 3,20 ± 0,47 ^b |
| Sabor Cocido | ND | ND | ND | ND |
| Flavor Global | 7,06±0,72 ^a | 6,40 ± 0,60 ^a | 6,81 ± 0,5 ^a | 5,33 ± 0,54 ^b |
| Flavor Residual | 4,49±0,95 | 5,46 ± 0,55 | 4,94 ± 0,42 | 5,09 ± 0,70 |

^{a-c} Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Filas sin letras indican que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). ND: no detectable.

Desde un análisis comparativo entre las formulaciones, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en 16 de los 19 atributos evaluados, mientras que consistencia, uniformidad de la masa y flavor residual no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$). Esto indica que la incorporación de WPC-80 o sus hidrolizados no alteró esos aspectos estructurales propios del postre elaborado, destacando la estabilidad en la textura y la homogeneidad del sistema.

Respecto a los **descriptores visuales**, FC y FWPH-A mostraron mayor intensidad en el color característico respecto a FWPH-AF y FWPC-80, lo que sugiere que el WPH-A preservó la tonalidad de FC, mientras que WPC-80 y WPH-AF atenuaron este atributo. En cuanto al brillo, todas las

formulaciones obtuvieron puntajes elevados (> 7), aunque FWPH-AF presentó valores significativamente menores ($7,63 \pm 0,49$).

En cuanto a los **descriptores texturales**, FC fue percibida como la más suave, mientras que FWPC-80 no difirió significativamente, pero las formulaciones con WPHs (FWPH-A y FWPH-AF) mostraron menor suavidad, lo que sugiere que la hidrólisis proteica redujo este atributo. En cuanto a adherencia, FWPH-A presentó valores significativamente más altos respecto a las demás. La cremosidad se vio favorecida por el WPC-80, mientras que las formulaciones con WPHs equipararon a la FC, aunque FWPH-A se destacó por el valor más bajo.

En relación a los **descriptores gustativos** y de **flavor**, el gusto dulce mostró ligeras diferencias (con FWPH-A presentando la menor puntuación), aunque ninguna formulación difirió significativamente respecto de FC. El sabor dulce de leche y el sabor a crema fueron más intensos en FC, mientras que las formulaciones con WPC-80 y WPHs mostraron valores menores, siendo FWPH-AF la de menor intensidad en sabor a crema. El sabor a polvo fue más pronunciado en las formulaciones con WPHs, mientras que FWPC-80 mostró el valor más bajo. No obstante, no se observaron diferencias significativas entre FWPH-AF y FC, ni entre FC y FWPC-80. El sabor lácteo fue más intenso en FWPC-80 respecto al resto. Finalmente, el flavor global fue significativamente mayor en FC, FWPC-80 y FWPH-A, mientras que FWPH-AF se diferenció como la de menor puntuación, lo que podría afectar negativamente su aceptación por parte de los consumidores.

En líneas generales, los resultados del análisis QDA® evidencian que la adición de WPC-80 y WPHs generó cambios sensoriales en las formulaciones, principalmente en atributos vinculados al color, suavidad, cremosidad, sabores característicos y flavor global. FWPH-AF se destacó como la formulación con menor impacto positivo en estos descriptores, lo que podría reducir su aceptación por parte de los consumidores, aspecto que será evaluado en los estudios afectivos posteriores. Por otro lado, FWPC-80 se asemejó más a FC en varios atributos, sugiriendo un impacto menor sobre el perfil sensorial en la matriz postre. Finalmente, FWPH-A se ubicó globalmente en una posición intermedia, con alguna influencia sobre ciertas modificaciones texturales y gustativas, pero siempre manteniendo un flavor global aceptable y sin aportar notas que expresen negatividad en su aceptación, lo que podría validar el potencial empleo de este hidrolizado en la formulación de productos funcionales.

4.3.A.2. Caracterización sensorial basada en consumidores

❖ Aceptabilidad

Los resultados de aceptabilidad general y discriminada por género se presentan en la **Tabla 48** y en la **Figura 53**. Se observaron diferencias significativas en las puntuaciones de aceptabilidad entre las formulaciones. En este sentido, FWPC-80 fue la formulación mejor valorada por los consumidores, sin diferencias significativas respecto a FC, lo que sugiere que la incorporación de WPC-80 no afectó negativamente el agrado sensorial en comparación con el control. Respecto a las formulaciones que contenían hidrolizados, FWPH-A tuvo una aceptabilidad menor pero claramente equiparable y en rangos de valores similares a FC, mientras FWPH-AF fue la que menor valor de aceptabilidad recibió. No obstante, todas las formulaciones superaron el valor 5 en la escala hedónica, indicando que presentaron, en general, un grado de gusto positivo. Estos resultados son consistentes con aquellos provenientes del QDA®, donde FWPC-80 se asemejó a FC en atributos clave como suavidad, cremosidad y flavor global, mientras que FWPH-AF mostró algunas deficiencias en sabor a crema, sabor dulce de leche y flavor global, lo que probablemente influyó en su menor aceptación. Por otro lado, si bien en la muestra FWPH-A se registraron algunas modificaciones texturales y gustativas en el análisis descriptivo, logró una aceptabilidad intermedia. Este resultado es sumamente alentador, ya que sugiere que no se ha generado un rechazo por parte de los consumidores, sino que la formulación fue bien aceptada, lo cual es muy importante ya que incorpora un hidrolizado proteico con potencialidad para ser considerado ingrediente funcional.

Estas observaciones están alineadas con lo reportado en otros estudios, donde los hidrolizados, si bien generan algunos cambios sensoriales, no afectan negativamente la aceptabilidad de manera crítica. [Lim et al. \(2011\)](#) encontraron que la incorporación de hidrolizados de proteína de suero (obtenidos con Alcalase, Protamex y Tripsina) en yogures no generó cambios negativos en propiedades sensoriales mostrando aceptabilidad positiva. [Ozorío et al. \(2019\)](#) reportaron alta aceptación sensorial para un producto enriquecido con hidrolizado proteico de suero (7,6 en una escala hedónica de 9 puntos), aunque utilizaron un sistema alimenticio distinto (postre lácteo sabor chocolate blanco).

Tabla 48. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la aceptabilidad de formulaciones de postres lácteos.

| Formulación | Aceptabilidad | | |
|-------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | General | Hombres | Mujeres |
| FWPH-A | 6,28 ± 1,48 ^b | 6,14 ± 1,30 ^{bc} | 6,37 ± 1,59 ^a |
| FWPH-AF | 5,50 ± 1,76 ^c | 5,33 ± 1,73 ^c | 5,61 ± 1,78 ^b |
| FWPC-80 | 6,89 ± 1,51 ^a | 7,02 ± 1,34 ^a | 6,82 ± 1,62 ^a |
| FC | 6,46 ± 1,79 ^{ab} | 6,33 ± 1,64 ^{ab} | 6,54 ± 1,88 ^a |

^{a-c} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

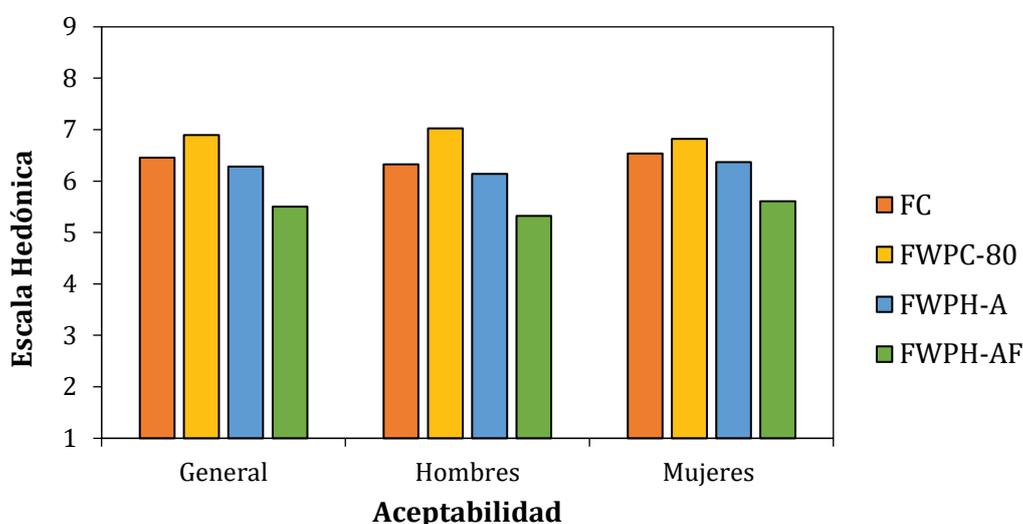


Figura 53. Aceptabilidad general (n= 114) y por género (hombres=43, mujeres= 71) de formulaciones de postres lácteos a los 3-4 días de elaboración a 8 °C.

Al segmentar por género, se observó que los hombres mantuvieron la misma tendencia que la población general: FWPC-80 fue la más aceptada, mientras que FWPH-A y, especialmente FWPH-AF, mostraron menores puntuaciones. En cambio, las mujeres valoraron de manera similar a FC, FWPC-80 y FWPH-A, mientras que solo FWPH-AF obtuvo una aceptabilidad significativamente menor. Este hallazgo resulta especialmente relevante, ya que indica que FWPH-A logró equiparar su nivel de agrado con FC y FWPC-80 entre el público femenino, lo que refuerza su potencial como base para el desarrollo de un postre lácteo funcional con WPH-A.

Los resultados de aceptabilidad confirman el impacto del perfil sensorial de cada formulación sobre la percepción hedónica final. Mientras FWPC-80 se posiciona como la opción más aceptada (equiparable a FC); FWPH-A, por su parte, mantiene su posición como una opción a considerar, mostrando que es posible desarrollar formulaciones con WPHs que logren buena aceptación, aun

cuando se identifique la necesidad de mejoras sensoriales para tener en cuenta en futuros estudios. Por el contrario, FWPH-AF presentó mayores limitaciones en términos de agrado y aceptabilidad general, lo que subraya la necesidad de mejorar su influencia en el perfil sensorial, ya sea mediante la incorporación de algunos cambios en la matriz alimentaria propuesta (o incluso su incorporación a otro tipo de matriz), o la aplicación de estrategias de enmascaramiento, entre otras posibilidades.

Finalmente, los resultados obtenidos permiten afirmar que la incorporación de los WPHs seleccionados no han comprometido la aceptación por parte de los consumidores, resultando una opción de interés para ser utilizados en futuros estudios. FWPH-A, en particular, se perfila como una alternativa sumamente alentadora para la incorporación de péptidos bioactivos en postres lácteos funcionales.

❖ *Intención de Compra*

La frecuencia de respuestas de intención de compra de las formulaciones de postres lácteos, general y discriminada por género, se presenta en la **Tabla 49**. El test de independencia entre filas y columnas (chi-cuadrado por celda) basado en la intención de compra de las formulaciones evaluadas mostró diferencias significativas entre las mismas ($p < 0,05$). Los resultados del test exacto de Fisher se muestran en el **Anexo 10**. En general, FC y FWPC-80 presentaron mayor intención de compra, mientras que FWPH-AF presentó menor intención de compra. Estos resultados coinciden con las tendencias observadas en la aceptabilidad, ya que las formulaciones más aceptadas fueron también las que mostraron mayor predisposición de compra por parte de los consumidores.

Tabla 49. Frecuencia de respuesta de intención de compra de las formulaciones de postres lácteos (FC, FWPC-80, FWPH-A y FWPH-AF) evaluados a los 3-4 días de elaboración a 8°C.

| Formulación | General (n=114) | | Hombres (n=43) | | Mujeres (n=71) | |
|-------------|-----------------|----|----------------|----|----------------|----|
| | SI | NO | SI | NO | SI | NO |
| FC | 58 | 56 | 21 | 22 | 37 | 34 |
| FWPC-80 | 70 | 44 | 32 | 11 | 38 | 33 |
| FWPH-A | 42 | 72 | 14 | 29 | 28 | 43 |
| FWPH-AF | 22 | 92 | 7 | 36 | 15 | 56 |

La segmentación por género reveló que los patrones observados en la población general se replicaron tanto en hombres como en mujeres, con FC y FWPC-80 como las formulaciones más elegidas. No obstante, entre los hombres, únicamente FWPC-80 presentó una intención de compra significativamente mayor, lo que refuerza su aceptación dentro de este segmento.

La intención de compra refuerza el posicionamiento favorable de FWPC-80 y FC, consolidándose como las formulaciones con mejor percepción integral por parte de los consumidores. FWPH-AF volvió a evidenciar limitaciones en este aspecto, consistente con sus menores niveles de agrado y deficiencias sensoriales identificadas en el QDA® y en la prueba de aceptabilidad. Por su parte, FWPH-A mostró un desempeño intermedio, sin alcanzar los niveles de FC y FWPC-80, pero sin quedar excluida como alternativa de compra. Otras investigaciones indicaron una alta intención de compra en productos lácteos enriquecidos con WPH (Ozorio *et al.*, 2019).

Estos hallazgos resaltan la importancia de optimizar el perfil sensorial de las formulaciones con WPHs, especialmente FWPH-AF, ya que la disposición de compra está estrechamente ligada a la percepción hedónica del producto. Nuevamente, FWPH-A, se mantiene como una formulación con un gran potencial a futuro para seguir explorando sus características y ser considerada definitivamente una matriz de base láctea que contiene un ingrediente funcional obtenido por hidrólisis enzimática de WPC-80.

4.3.B. Sinéresis de formulaciones de postres lácteos

La sinéresis se define como la liberación de líquido desde la matriz de un gel y es considerada uno de los principales defectos tecnológicos en productos lácteos como yogures y postres (Lesme *et al.*, 2020). Desde el punto de vista sensorial, constituye un atributo visual negativo que afecta directamente la aceptabilidad del producto (Celeghin *et al.*, 2016).

Los geles pueden experimentar pérdida de agua ante la aplicación de presión externa o fluctuaciones de temperatura, lo que puede provocar contracción, alteraciones en la textura y disminución de la calidad (Ghanbari *et al.*, 2017). Por ello, el control de la sinéresis es un aspecto clave en la formulación de postres lácteos, ya que influye tanto en la estabilidad estructural como en la percepción sensorial del producto.

En este estudio, la sinéresis se evaluó semanalmente durante 29 días de almacenamiento (días 1, 8, 15, 22 y 29 post-elaboración) en todas las formulaciones de postre lácteo obtenidas. No se observó liberación de líquido en ninguna de las muestras durante todo el período evaluado, lo que indica alta estabilidad estructural. Sin dudas, la combinación de espesantes (goma guar y

carragenina), junto con las proporciones del resto de los ingredientes empleados, contribuyó a prevenir la sinéresis, preservando la uniformidad y cohesión de la matriz. Dicha observación resultó en concordancia con lo observado en el análisis sensorial (QDA®), en el cual no se detectó sinéresis como atributo perceptible por los evaluadores.

4.3.C. Propiedades bioactivas de formulaciones de postres lácteos

Las formulaciones fueron evaluadas en cuanto a actividad antihipertensiva (AAH) y actividad antioxidante (AAO), considerando el efecto de la concentración de postre y de su almacenamiento.

❖ Actividad antihipertensiva

La inhibición de la ECA de las formulaciones mostró un comportamiento dosis-dependiente (**Tabla 50, Figura 54.A**), siendo FWPH-A y FWPH-AF las formulaciones con mayores valores. A 0,6 g/mL (máxima concentración evaluada), alcanzaron $71,82 \pm 4,22\%$ y $63,89 \pm 2,64\%$, respectivamente, mientras que FWPC-80 y FC presentaron inhibiciones significativamente menores, sin diferencias significativas entre ellas.

Tabla 50. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la inhibición de la ECA (%), en función de la concentración de postre lácteo.

| g postre/mL | FWPH-A | FWPH-AF | FWPC-80 | FC |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0,025 | $5,70 \pm 4,02^{bcd}$ | $1,26 \pm 0,59^{ab}$ | $1,19 \pm 0,42^{ab}$ | $0,23 \pm 0,25^a$ |
| 0,075 | $9,12 \pm 1,87^d$ | $7,00 \pm 3,51^{cd}$ | $1,13 \pm 1,28^{ab}$ | $0,67 \pm 0,92^{ab}$ |
| 0,125 | $20,37 \pm 0,06^{ef}$ | $20,37 \pm 2,51^{ef}$ | $3,86 \pm 1,43^{abc}$ | $3,47 \pm 2,02^{abc}$ |
| 0,250 | $54,52 \pm 2,76^h$ | $39,20 \pm 0,45^g$ | $20,40 \pm 3,47^{ef}$ | $18,36 \pm 3,41^{ef}$ |
| 0,400 | $69,98 \pm 2,97^i$ | $54,05 \pm 0,27^h$ | $19,37 \pm 2,50^{ef}$ | $23,42 \pm 0,84^f$ |
| 0,600 | $71,82 \pm 4,22^j$ | $63,89 \pm 2,64^i$ | $16,34 \pm 2,92^e$ | $15,27 \pm 4,55^e$ |
| Formulación (F) | | | | S |
| Concentración (C) | | | | S |
| Interacción F-C | | | | S |

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. S: Efecto significativo ($p < 0,05$). ^{a-j} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

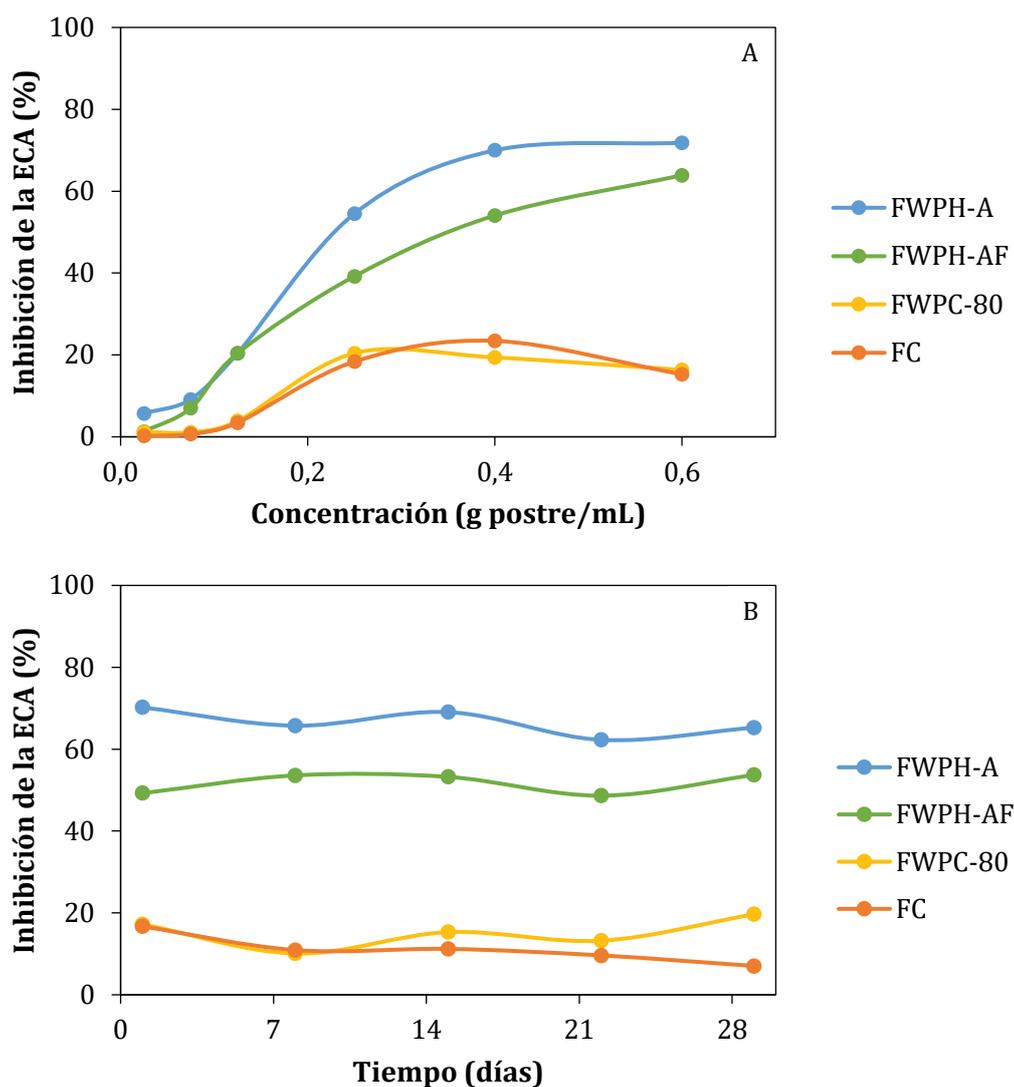


Figura 54. Inhibición de la ECA (%) de las formulaciones de postres lácteos. (A) Efecto de la concentración. (B) Efecto del tiempo de almacenamiento a 0,4 g postre/mL.

A la concentración de postre 0,25 g/mL (equivalente a 2,5 mg/mL de hidrolizado), FWPH-A alcanzó una inhibición del $54,52 \pm 2,76\%$, resultado comparable al informado por [Lim et al. \(2011\)](#) en yogures con WPH-ALC (61-69% a 2,5 mg/mL), con actividad estable durante 7 días de almacenamiento a 4°C. Estos autores también detectaron un efecto significativo de la fortificación con WPH (61-74%) respecto al yogur control (47-50%). En tanto, [Vera Valle \(2017\)](#) informó una inhibición del 66,8% en yogur con WPH-papaína (3 mg/mL), superior al control (10,6%) y estable por 28 días.

Los valores de IC_{50} (mg de hidrolizado/mL postre) fueron $2,25 \pm 0,11$ para WPH-A y $3,43 \pm 0,03$ para WPH-AF, indicando mayor AAH en FWPH-A. Sin embargo, cuando los ingredientes se evaluaron en agua (sección 4.2.B.4.), no se detectaron diferencias significativas entre los WPHs (IC_{50} : $1,76 \pm 0,00$ mg/mL para WPH-A y $2,45 \pm 0,18$ mg/mL para WPH-AF). En las condiciones

evaluadas, el WPC-80 no alcanzó el 50% de inhibición en el postre, en concordancia con su IC₅₀ en agua (147,89 ± 4,51 mg/mL), significativamente mayor que los WPHs. En los **Anexos 9 y 11** se presentan las curvas de inhibición de la ECA utilizadas para obtener el IC₅₀, tanto de los ingredientes en agua como en los postres lácteos, respectivamente.

Durante el almacenamiento (**Tabla 51, Figura 54.B**), FWPH-A y FWPH-AF conservaron su actividad (62-70% y 48-54%), sin cambios significativos al día 29, en línea con lo informado por otros autores ([Vera Valle, 2017](#)). Por otro lado, FWPC-80 y FC mostraron inhibiciones menores (10-20% y 7-17%), siendo FC la única que disminuyó progresivamente durante el almacenamiento. Además, como era de esperarse, FC presentó los valores más bajos de inhibición, dada la ausencia de proteínas/péptidos bioactivos derivados del suero en su composición.

Tabla 51. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la inhibición de la ECA (%), en función del tiempo de almacenamiento (0,4 g postre/mL).

| Tiempo (días) | FWPH-A | FWPH-AF | FWPC-80 | FC |
|----------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 1 | 70,24 ± 2,78 ^g | 49,26 ± 4,02 ^e | 17,24 ± 3,18 ^{cd} | 16,73 ± 5,68 ^{cd} |
| 8 | 65,74 ± 3,98 ^{fg} | 53,61 ± 2,41 ^e | 10,09 ± 2,98 ^{ab} | 10,92 ± 5,74 ^{abc} |
| 15 | 69,07 ± 1,20 ^g | 53,25 ± 3,91 ^e | 15,33 ± 1,94 ^{bcd} | 11,20 ± 4,94 ^{abc} |
| 22 | 62,27 ± 6,09 ^f | 48,65 ± 9,74 ^e | 13,22 ± 8,04 ^{abcd} | 9,60 ± 4,04 ^{ab} |
| 29 | 65,27 ± 4,65 ^{fg} | 53,72 ± 2,49 ^e | 19,70 ± 1,99 ^d | 7,01 ± 4,04 ^a |
| Formulación (F) | | | | S |
| Tiempo (T) | | | | S |
| Interacción F-T | | | | NS |

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. S: Efecto significativo ($p < 0,05$). NS: Efecto no significativo ($p > 0,05$). ^{a-g} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

❖ *Actividad antioxidante*

La AAO (TEAC, mM Trolox) también mostró un efecto dosis-dependiente (**Tabla 52, Figura 55.A**), en concordancia con los ingredientes suspendidos en agua (sección **4.2.B.4**). A 0,4 g/mL (máxima concentración evaluada), FWPH-A y FWPH-AF mostraron los valores más altos de TEAC (7,75 ± 1,56 y 7,58 ± 1,39 mM Trolox, respectivamente), seguidas por FWPC-80 (6,06 ± 0,32 mM Trolox) y FC (5,91 ± 1,10 mM Trolox). Estos resultados son comparables con aquellos informados por [Mann et al. \(2015\)](#), quienes hallaron mayor AAO en bebidas lácteas con 2% de WPH respecto a 1%, observando además que el WPC mejoró levemente la AAO frente a la muestra control.

Tabla 52. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la actividad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC, mM), en función de la concentración de postres lácteos.

| g postre/mL | FWPH-A | FWPH-AF | FWPC-80 | FC |
|-------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,1 | 3,51 ± 1,23 ^{ab} | 3,60 ± 1,45 ^{ab} | 3,16 ± 0,90 ^{ab} | 2,34 ± 0,35 ^a |
| 0,2 | 5,15 ± 1,39 ^{cd} | 5,59 ± 1,50 ^d | 3,59 ± 0,40 ^{ab} | 3,90 ± 0,63 ^{bc} |
| 0,4 | 7,75 ± 1,56 ^e | 7,58 ± 1,39 ^e | 6,06 ± 0,32 ^d | 5,91 ± 1,10 ^d |
| Formulación (F) | S | | | |
| Concentración (C) | S | | | |
| Interacción F-C | NS | | | |

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. S: Efecto significativo ($p < 0,05$). NS: Efecto no significativo ($p > 0,05$). ^{a-e} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

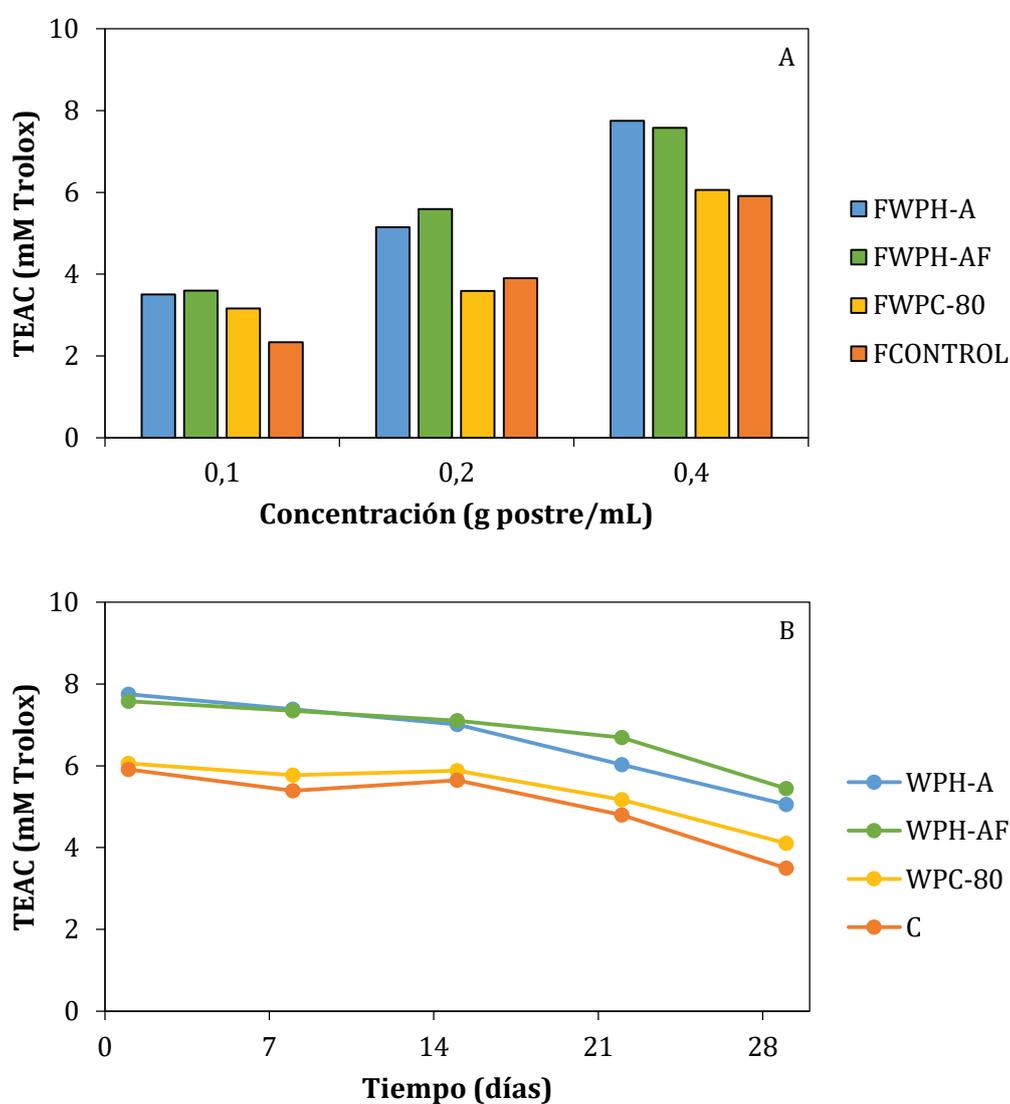


Figura 55. Actividad antioxidante equivalente de Trolox (mM) de las formulaciones de postres lácteos. (A) Efecto de la concentración. (B) Efecto del tiempo de almacenamiento a 0,4 g postre/mL.

Durante el almacenamiento (**Tabla 53, Figura 55.B**), la AAO se mantuvo estable los primeros 15 días, disminuyendo gradualmente hacia el día 29. A este tiempo, FWPH-A y FWPH-AF conservaron los valores más altos de TEAC ($5,05 \pm 0,33$ y $5,44 \pm 0,42$ mM Trolox, respectivamente), mientras que FWPC-80 y FC presentaron valores significativamente menores ($4,10 \pm 0,27$ y $3,50 \pm 0,33$ mM Trolox, respectivamente).

Tabla 53. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la actividad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC, mM), en función del tiempo de almacenamiento (0,4 g postre/mL).

| Tiempo (días) | FWPH-A | FWPH-AF | FWPC-80 | FC |
|-----------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | $7,75 \pm 1,56^h$ | $7,58 \pm 1,39^{gh}$ | $6,06 \pm 0,32^{ef}$ | $5,91 \pm 1,10^{def}$ |
| 8 | $7,38 \pm 0,61^{gh}$ | $7,34 \pm 0,56^{gh}$ | $5,77 \pm 0,30^{def}$ | $5,39 \pm 0,16^{cde}$ |
| 15 | $7,01 \pm 1,49^{gh}$ | $7,11 \pm 0,58^{gh}$ | $5,88 \pm 0,28^{def}$ | $5,65 \pm 0,39^{cde}$ |
| 22 | $6,03 \pm 0,40^{ef}$ | $6,69 \pm 0,77^{fg}$ | $5,17 \pm 1,58^{cde}$ | $4,79 \pm 0,71^{bc}$ |
| 29 | $5,05 \pm 0,33^{cd}$ | $5,44 \pm 0,42^{cde}$ | $4,10 \pm 0,27^{ab}$ | $3,50 \pm 0,33^a$ |
| Formulación (F) | | | | S |
| Tiempo (T) | | | | S |
| Interacción F-T | | | | NS |

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. S: Efecto significativo ($p < 0,05$). NS: Efecto no significativo ($p > 0,05$). ^{a-h} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Respecto a las formulaciones, no se observaron diferencias significativas entre FWPH-A y FWPH-AF. Las diferencias detectadas previamente en los ingredientes suspendidos en agua, donde WPH-A mostró mayor AAO que WPH-AF, no se reflejaron tras su incorporación a la matriz alimentaria. Si bien FC presentó cierta AAO, sus valores de TEAC fueron significativamente menores en comparación con las formulaciones con WPHs. Además, FWPC-80 mostró una AAO similar a FC, sin diferencias significativas entre ambas.

Estos resultados confirman que la incorporación de WPH-A y WPH-AF mejora significativamente la presencia detectable mediante técnicas *in vitro* de actividad antihipertensiva y antioxidante de un postre de base láctea, manteniendo su elevada bioactividad durante al menos 15 días. En contraste, FWPC-80 y FC mostraron las menores bioactividades, resaltando la importancia de la hidrólisis enzimática para la generación de péptidos bioactivos con efectos antihipertensivos y antioxidantes. Finalmente, la matriz de postre lácteo desarrollada claramente presenta potencial para ser considerada como alimento funcional. Futuras investigaciones deberían estar dirigidas, entre otras cuestiones de interés, a evaluar la estabilidad

de la bioactividad observada (teniendo en cuenta todas las propiedades evaluadas) frente a la digestión gastrointestinal *in vitro* y validar sus efectos mediante posibles estudios *in vivo*.

Finalmente, **la incorporación de hidrolizados de proteínas de suero en postres lácteos** demostró ser una estrategia viable para el desarrollo de alimentos funcionales con propiedades bioactivas, siempre que se optimice el perfil sensorial del producto. Entre las formulaciones evaluadas, FWPH-A se destacó por lograr un balance entre funcionalidad y aceptación sensorial, además de ser un hidrolizado tecnológicamente más simple de obtener, ya que se realiza en una sola etapa e involucra el uso de un solo preparado enzimático.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

El presente estudio permitió obtener y caracterizar hidrolizados proteicos a partir del concentrado de proteínas de suero lácteo (WPC-80), mediante hidrólisis enzimática con Alcalase® (ALC) y Flavourzyme® (FLA). En una primera etapa, la evaluación individual de ambos preparados enzimáticos evidenció que los hidrolizados obtenidos con ALC presentaban aptitudes tecnológicas adecuadas y mayor potencial funcional. A partir de estos resultados, se seleccionaron las condiciones más adecuadas para obtener un ingrediente mediante hidrólisis con ALC (WPH-A) y otro mediante hidrólisis secuencial con ALC seguida de FLA (WPH-AF). La incorporación de FLA en la segunda etapa representó un enfoque innovador y poco explorado, permitiendo evaluar el efecto de enzimas proteolíticas con diferentes especificidades y considerando su potencial para mitigar el posible desarrollo de sabor amargo en los hidrolizados proteicos, característica relevante en aplicaciones alimentarias.

El análisis **fisicoquímico** de los ingredientes evidenció modificaciones estructurales significativas respecto al WPC-80. Ambos tratamientos enzimáticos promovieron la degradación de las proteínas de suero, como lo reflejaron los análisis RP-HPLC y SDS-PAGE, lo que podría resultar en una mayor digestibilidad y menor potencial alergénico (propiedades pendientes a probar en estudios siguientes). Además, los hidrolizados mostraron una hidrofobicidad baja a media, con una disminución del pI respecto a la proteína original. Las diferencias más sobresalientes entre WPH-A y WPH-AF se observaron en el grado de hidrólisis y el perfil y contenido de aminoácidos libres, con valores claramente más altos en WPH-AF. En términos de la **composición**, la principal diferencia entre los hidrolizados y el WPC-80 fue el contenido de sodio y cenizas, atribuible al uso de NaOH en el ajuste de pH durante la hidrólisis. Sin embargo, esta variación no tuvo un impacto significativo en la percepción sensorial, ya que el análisis descriptivo cuantitativo (DQA®) no detectó la presencia de sabor amargo ni salado en las formulaciones desarrolladas.

Desde el punto de vista **funcional**, ambos hidrolizados presentaron mejoras en parámetros que son de interés tecnológico, como solubilidad, estabilidad térmica, viscosidad y capacidad de absorción de aceite, lo que permitiría pensar su aplicabilidad en formulaciones que requieran estabilidad en un amplio rango de condiciones. No obstante, se observó una reducción en la capacidad emulsionante y espumante, así como la pérdida total de la capacidad gelificante, lo que resalta la importancia de considerar su uso en productos donde estas propiedades no sean esenciales. Comparativamente, WPH-AF presentó mayor capacidad de absorción de aceite, menor viscosidad y una reducción más pronunciada en la capacidad espumante, diferencias que pueden atribuirse a su mayor grado de hidrólisis y contenido de aminoácidos libres.

Respecto a las **propiedades bioactivas**, ambos ingredientes demostraron seguridad citotóxica y efecto citoprotector frente al estrés oxidativo, así como actividades antihipertensiva, antioxidante y antimicrobiana superiores a la del WPC-80. La estabilidad térmica de los compuestos bioactivos sugiere que estos ingredientes pueden mantener su funcionalidad en procesos industriales que involucren tratamientos térmicos moderados. Además, la capacidad quelante de calcio observada en los hidrolizados plantea una potencial aplicación en formulaciones destinadas a la fortificación mineral, dado que podría resultar en una interesante estrategia para aumentar la biodisponibilidad de calcio en el organismo, un aspecto que ha despertado especial interés en los últimos años.

La **incorporación de estos hidrolizados en una matriz alimentaria** de base láctea permitió evaluar su desempeño en un sistema real de consumo. Los ensayos confirmaron que su inclusión incrementó significativamente la actividad antihipertensiva y antioxidante del producto final (en ambos casos determinadas mediante técnicas *in vitro*), manteniendo su bioactividad durante al menos 15 días. Además, las formulaciones de postres lácteos presentaron buenos atributos sensoriales y niveles de aceptabilidad muy satisfactorios, destacándose la formulación con WPH-A como la más equilibrada entre funcionalidad y perfil sensorial.

En las condiciones estudiadas, la hidrólisis enzimática del WPC-80 resultó una estrategia efectiva para la generación de ingredientes funcionales con potencial aplicación en el desarrollo de alimentos con beneficios específicos para la salud. La estabilidad observada en una matriz láctea y su buena aceptación sensorial refuerzan su potencial de aplicación en la industria alimentaria. No obstante, futuros estudios podrían estar enfocados en ajustar y/o mejorar algunas variables puntuales del perfil sensorial de los hidrolizados, así como también evaluar su desempeño en otras matrices alimentarias y/o su combinación con otros compuestos bioactivos, lo cual podría ampliar su aplicabilidad comercial. Además, resulta de especial interés evaluar la estabilidad, el comportamiento de la matriz formulada y las propiedades observadas frente a protocolos establecidos para técnicas de digestión gastrointestinal *in vitro*, y estudiar posibles metodologías que permitan pensar en un escalado del proceso de obtención de los ingredientes por hidrólisis enzimática (como, por ejemplo, el empleo de técnicas de inmovilización de las enzimas en soportes adecuados).

Finalmente, a través de los resultados obtenidos en la presente investigación (ya sea en particular para cada una de sus etapas como en forma integral para el trabajo de Tesis llevado a cabo), se ha buscado contribuir a la valorización del lactosuero como materia prima de alto valor agregado, además de sentar bases firmes para el desarrollo de ingredientes innovadores que promuevan la expansión de la industria de alimentos funcionales y nutracéuticos, con potencial impacto en la salud y el bienestar de los consumidores.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Hamid, M., Goda, H. A., De Gobba, C., Jenssen, H., & Osman, A. (2016). Antibacterial activity of papain hydrolysed camel whey and its fractions. *International Dairy Journal*, 61, 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.04.004>
- Acuña, O., & Simbaña, C. (2010). Estudio de las propiedades físicas y funcionales de un hidrolizado enzimático de proteína de chocho a escala piloto y su aplicación como fertilizante. *Revista Politécnica*, 29 (1), 78-85.
- Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., & Agboola, S. (2013). Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1435-1443. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.053>
- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, New York.
- Agyei, D., Ongkudon, C. M., Wei, C. Y., Chan, A. S., & Danquah, M. K. (2016). Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food and Bioprocess Processing*, 98, 244-256. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.02.003>
- Akintayo, E. T., Oshodi, A. A., & Esuoso, K. O. (1999). Effects of NaCl, ionic strength and pH on the foaming and gelation of pigeon pea (*Cajanus cajan*) protein concentrates. *Food Chemistry*, 66(1), 51-56. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00155-1)
- Alahyaribeik, S., Sharifi, S. D., Tabandeh, F., Honarbakhsh, S., & Ghazanfari, S. (2021). Stability and cytotoxicity of DPPH inhibitory peptides derived from biodegradation of chicken feather. *Protein Expression and Purification*, 177, 105748. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105748>
- Almaas, H., Berner, V., Holm, H., Langsrud, T., & Vegarud, G. E. (2008). Degradation of whey from caprine milk by human proteolytic enzymes, and the resulting antibacterial effect against *Listeria monocytogenes*. *Small Ruminant Research*, 79(1), 11-15. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.07.013>
- Aluko, R. E. (2018). 15- Food protein-derived peptides: Production, isolation, and purification. In *Proteins in Food Processing* (pp. 389-412). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00016-4>
- Aluko, R. E. (2019). Antihypertensive foods: Protein hydrolysates and peptides. In *Encyclopedia of Food Chemistry* (pp. 237-247). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21755-1>

- Ambigaipalan, P., Al-Khalifa, A. S., & Shahidi, F. (2015). Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *Journal of Functional Foods*, *18*, 1125-1137. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.021>
- AOAC International. (1990). *Official methods of analysis of AOAC International* (15th Ed.). AOAC International.
- Apar, D. K., & Özbek, B. (2007). Hydrolysis and solubilization of corn gluten by Neutrase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (1986), *82*(12), 1107-1114. <https://doi.org/10.1002/jctb.1740>
- Apar, D. K., & Özbek, B. (2008). Corn gluten hydrolysis by Alcalase: effects of process parameters on hydrolysis, solubilization and enzyme inactivation. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, *22*(2), 203-212.
- Ares, G., Alcaire, F., Antúnez, L., Vidal, L., Giménez, A., & Castura, J. C. (2017). Identification of drivers of (dis) liking based on dynamic sensory profiles: Comparison of Temporal Dominance of Sensations and Temporal Check-all-that-apply. *Food Research International*, *92*, 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.016>
- Ares, G., Giménez, A., & Bruzzone, F. (2010). Identifying consumers' texture vocabulary of milk desserts. Application of a check-all-that-apply question and free listing. *Brazilian Journal of Food Technology*, *6*, 98-105.
- Aryee, A. N. A., Agyei, D., & Udenigwe, C. C. (2018). Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins. In *Proteins in Food Processing* (pp. 27-45). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00003-6>
- Ashaolu, T. J., Le, T. D., & Suttikhana, I. (2023). Stability and bioactivity of peptides in food matrices based on processing conditions. *Food Research International*, *168*, 112786. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112786>
- Athira, S., Mann, B., Saini, P., Sharma, R., Kumar, R., & Singh, A. K. (2015). Production and characterisation of whey protein hydrolysate having antioxidant activity from cheese whey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*(14), 2908-2915. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7032>
- Bacenetti, J., Bava, L., Schievano, A., & Zucali, M. (2018). Whey protein concentrate (WPC) production: Environmental impact assessment. *Journal of Food Engineering*, *224*, 139-147. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.12.018>

- Balivo, A., d'Errico, G., & Genovese, A. (2023). Sensory properties of foods functionalised with milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 109301. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109301>
- Ballatore, M. B., Bettioli, M. del R., Vanden Braber, N. L., Aminahuel, C. A., Rossi, Y. E., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Cavaglieri, L.R., & Montenegro, M. A. (2020). Antioxidant and cytoprotective effect of peptides produced by hydrolysis of whey protein concentrate with trypsin. *Food Chemistry*, 319, 126472. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126472>
- Bazsefidpar, N., Yazdi, A. P. G., Karimi, A., Yahyavi, M., Amini, M., Gavlighi, H. A., & Simal-Gandara, J. (2024). Brewers spent grain protein hydrolysate as a functional ingredient for muffins: Antioxidant, antidiabetic, and sensory evaluation. *Food Chemistry*, 435, 137565. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137565>
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227-236.
- Boland, M. (2011). Whey proteins. In *Handbook of Food Proteins* (pp. 30-55). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857093639.30>
- Boligon, A. A., Machado, M. M., & Athayde, M. L. (2014). Technical evaluation of antioxidant activity. *Med. Chem*, 4(7), 517-522. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0444.1000125>
- Bolsa de Comercio de Rosario. (2023). Radiografía del sector lácteo en Argentina. Informativo semanal de la Bolsa de Comercio de Rosario ISSN 2796-7824. En internet: <https://www.bcr.com.ar/es/print/pdf/node/99312>
- Brandelli, A., Daroit, D. J., & Corrêa, A. P. F. (2015). 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>
- Bruzzone, F., Ares, G., & Giménez, A. N. A. (2012). Consumers' texture perception of milk desserts. II-Comparison with trained assessors' data. *Journal of Texture Studies*, 43(3), 214-226. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2011.00332.x>
- Büchi Labortechnik AG (1998). *Determinación de nitrógeno según Kjeldahl*. Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza.
- Butré, C. I., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2012). Effects of ionic strength on the enzymatic hydrolysis of diluted and concentrated whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(22), 5644-5651. <https://doi.org/10.1021/jf301409n>

- CAA (2023). Capítulo VIII: Alimentos lácteos. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). En Internet: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_viii_lacteosactualiz_2023-04.pdf
- Cardoso, M. de las M., Manzo, R. M., Tonarelli, G. G., & Simonetta, A. C. (2012). Characterisation of a cell-free supernatant obtained from cultures of *Enterococcus faecalis* DBFIQ E24 with antagonistic activity against bacteria, yeasts and moulds. *International Journal of Dairy Technology*, 65(4), 568-577. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2012.00852.x>
- Celeghin, A. G., Minetti, F., Contini, L. E., Miccolo, M. E., Rubiolo, A. C., & Olivares, M. L. (2016). Syneresis and sensory acceptability of desserts based on whey proteins concentrates. *Journal of Food and Nutrition Research*, 4(7), 478-482. DOI:10.12691/jfnr-4-7-10
- Ceruti, R. J., Sihufe, G. A., & Zorrilla, S. E. (2014). Gelificación en frío de suspensiones de proteínas de suero lácteo con diferentes niveles de concentración, pH y agregado de Ca. V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Argentina.
- Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S., & Marc, I. (2007). Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochemistry*, 42(10), 1419-1428. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.07.009>
- Chang, C. Y., Wu, K. C., & Chiang, S. H. (2007). Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chemistry*, 100(4), 1537-1543. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.019>
- Chen, C., Chi, Y. J., Zhao, M. Y., & Xu, W. (2012). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate. *Food Science and Biotechnology*, 21, 27-34. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0004-6>
- Cheung, L. K., Aluko, R. E., Cliff, M. A., & Li-Chan, E. C. (2015). Effects of exopeptidase treatment on antihypertensive activity and taste attributes of enzymatic whey protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 13, 262-275. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.036>
- Chew, L. Y., Toh, G. T., & Ismail, A. (2019). Application of proteases for the production of bioactive peptides. In *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 247-261). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00015-3>
- Chiang, J. H., Loveday, S. M., Hardacre, A. K., & Parker, M. E. (2018). Effects of enzymatic hydrolysis treatments on the physicochemical properties of beef bone extract using endo-and exoproteases. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(1), 111-120. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13911>

- Chirinos, R., Ochoa, K., Aguilar-Galvez, A., Carpentier, S., Pedreschi, R., & Campos, D. (2018). Obtaining of peptides with in vitro antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities from cañihua protein (*Chenopodium pallidicaule* Aellen). *Journal of Cereal Science*, 83, 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.07.004>
- Chobert, J. M., Bertrand-Harb, C., & Nicolas, M. G. (1988). Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymically by trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(5), 883-892. <https://doi.org/10.1021/jf00083a002>
- Cian, R. E., Luggren, P., & Drago, S. R. (2011). Effect of extrusion process on antioxidant and ACE inhibition properties from bovine haemoglobin concentrate hydrolysates incorporated into expanded maize products. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(7), 774-780. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.582034>
- Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M., & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 109(1), 144-148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.039>
- da Costa, E. L., da Rocha Gontijo, J. A., & Netto, F. M. (2007). Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 17(6), 632-640. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.09.003>
- Da Rosa, L. O. L., Santana, M. C., Avezedo, T. L., Brígida, A. I. S., Godoy, R., Pacheco, S., Mellinger-Silva, C., & Cabral, L. M. C. (2018). A comparison of dual-functional whey hydrolysates by the use of commercial proteases. *Food Science and Technology*, 38, 31-36. <https://doi.org/10.1590/fst.08417>
- Davis, J. P., Doucet, D., & Foegeding, E. A. (2005). Foaming and interfacial properties of hydrolyzed β -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 288(2), 412-422. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.03.002>
- de Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2014). Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(3), 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.11.012>
- de Castro, R. J. S., Bagagli, M. P., & Sato, H. H. (2015). Improving the functional properties of milk proteins: focus on the specificities of proteolytic enzymes. *Current opinion in Food Science*, 1, 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.12.004>
- de Castro, R. J. S., Domingues, M. A. F., Ohara, A., Okuro, P. K., dos Santos, J. G., Brexó, R. P., & Sato, H. H. (2017). Whey protein as a key component in food systems: Physicochemical properties,

- production technologies and applications. *Food Structure*, 14, 17-29. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2017.05.004>
- Demirhan, E., Apar, D. K., & Özbek, B. (2011). Sesame cake protein hydrolysis by alcalase: effects of process parameters on hydrolysis, solubilisation, and enzyme inactivation. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28, 195-202. <https://doi.org/10.1007/s11814-010-0316-2>
- Deng, Y., Butré, C. I., & Wierenga, P. A. (2018). Influence of substrate concentration on the extent of protein enzymatic hydrolysis. *International Dairy Journal*, 86, 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.018>
- deWit, J. N., & Klarenbeek, G. (1984). Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 67(11), 2701-2710. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81628-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81628-8)
- Di Filippo, G., Melchior, S., Plazzotta, S., Calligaris, S., & Innocente, N. (2024). Effect of enzymatic hydrolysis with Alcalase or Protamex on technological and antioxidant properties of whey protein hydrolysates. *Food Research International*, 188, 114499. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114499>
- dos Santos Aguilar, J. G., & Sato, H. H. (2018). Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 103, 253-262. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.044>
- Dryáková, A., Pihlanto, A., Marnila, P., Čurda, L., & Korhonen, H. J. (2010). Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *European Food Research and Technology*, 230, 865-874. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1231-9>
- Dullius, A., Goettert, M. I., & de Souza, C. F. V. (2018). Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods–Biotechnological facilitation of industrial scale-up. *Journal of Functional Foods*, 42, 58-74. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.063>
- Dzhivoderova-Zarcheva, M., Nikovska, K., Ivanova, S., & Dimitrova, E. (2024). Sensory profiling of dairy starch dessert creams enhanced with various types and concentrations of tahini. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 36, 100925. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2024.100925>
- Eberhardt, A., López, E. C., Ceruti, R. J., Marino, F., Mammarella, E. J., Manzo, R. M., & Sihufe, G. A. (2019). Influence of the degree of hydrolysis on the bioactive properties of whey protein hydrolysates using Alcalase®. *International Journal of Dairy Technology*, 72(4), 573-584. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12606>

- Escudero, E., Mora, L., & Toldrá, F. (2014). Stability of ACE inhibitory ham peptides against heat treatment and in vitro digestion. *Food Chemistry*, 161, 305-311. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.117>
- Fenoglio, C. L., Vierling, N., Manzo, R. M., Ceruti, R. J., Sihufe, G. A., & Mammarella, E. J. (2016). Whey protein hydrolysis with free and immobilized Alcalase®: Effects of operating parameters on the modulation of peptide profiles obtained. *American Journal of Food Technology*, 11(4), 152-158. DOI: 10.3923/ajft.2016.152.158
- Gauthier, S. F., Paquin, P., Pouliot, Y., & Turgeon, S. (1993). Surface activity and related functional properties of peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 76(1), 321-328. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77353-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77353-1)
- Ghanbari, M., Mortazavian, A. M., Ghasemi, J. B., Mohammadi, A., Hosseini, H., & Neyestani, T. R. (2017). Formulation and development of a new prebiotic cereal-based dairy dessert: Rheological, sensory and physical attributes. *Food Science and Technology Research*, 23(5), 637-649. DOI: 10.3136/fstr.23.637
- Ghribi, A. M., Gafsi, I. M., Sila, A., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H., ... & Besbes, S. (2015). Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. *Food Chemistry*, 187, 322-330. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.109>
- González-García, E., Marina, M. L., & García, M. C. (2014). Plum (*Prunus Domestica L.*) by-product as a new and cheap source of bioactive peptides: Extraction method and peptides characterization. *Journal of Functional Foods*, 11, 428-437. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.020>
- González-Tello, P., Camacho, F., Jurado, E., Paez, M. P., & Guadix, E. M. (1994). Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic models. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(4), 523-528. <https://doi.org/10.1002/bit.260440415>
- Goudarzi, M., Madadlou, A., Mousavi, M. E., & Emam-Djomeh, Z. (2015). Formulation of apple juice beverages containing whey protein isolate or whey protein hydrolysate based on sensory and physicochemical analysis. *International Journal of Dairy Technology*, 68(1), 70-78. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12155>
- Guadix, A., Guadix, E. M., Páez-Dueñas, M. P., González-Tello, P., & Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79-89.

- Hayakari, M., Kondo, Y., & Izumi, H. (1978). A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Analytical Biochemistry*, 84(2), 361-369. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90053-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90053-2)
- Hernández-Ledesma, B., del Mar Contreras, M., & Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 23-35. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.11.001>
- Horax, R., Vallecios, M. S., Hettiarachchy, N., Osorio, L. F., & Chen, P. (2017). Solubility, functional properties, ACE-I inhibitory and DPPH scavenging activities of Alcalase hydrolysed soy protein hydrolysates. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(1), 196-204. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13267>
- Hou, H., Wang, S., Zhu, X., Li, Q., Fan, Y., Cheng, D., & Li, B. (2018). A novel calcium-binding peptide from Antarctic krill protein hydrolysates and identification of binding sites of calcium-peptide complex. *Food Chemistry*, 243, 389-395. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.152>
- Hu, F., Ci, A. T., Wang, H., Zhang, Y. Y., Zhang, J. G., Thakur, K., & Wei, Z. J. (2018). Identification and hydrolysis kinetic of a novel antioxidant peptide from pecan meal using Alcalase. *Food Chemistry*, 261, 301-310. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.025>
- Huang, S. L., Zhao, L. N., Cai, X., Wang, S. Y., Huang, Y. F., Hong, J., & Rao, P. F. (2015). Purification and characterisation of a glutamic acid-containing peptide with calcium-binding capacity from whey protein hydrolysate. *Journal of Dairy Research*, 82(1), 29-35. <https://doi.org/10.1017/S0022029914000715>
- ISO (2014). Sensory analysis. General guidance for the design of test rooms, ISO Standard 8589:2007/A1. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO (2023). Sensory analysis: Selection and training of sensory assessors, ISO Standard 8586. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Jeewanthi, R. K. C., Kim, M. H., Lee, N. K., Yoon, Y. C., & Paik, H. D. (2017). Peptide analysis and the bioactivity of whey protein hydrolysates from cheese whey with several enzymes. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37(1), 62. <https://doi.org/10.5851/2Fkosfa.2017.37.1.62>
- Jeewanthi, R. K. C., Lee, N. K., & Paik, H. D. (2015). Improved functional characteristics of whey protein hydrolysates in food industry. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(3), 350. <https://doi.org/10.5851/2Fkosfa.2015.35.3.350>

- Jin, D. X., Liu, X. L., Zheng, X. Q., Wang, X. J., & He, J. F. (2016). Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. *Food Chemistry*, 204, 427-436. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.119>
- Ju, Z. Y., Otte, J., Madsen, J. S., & Qvist, K. B. (1995). Effects of limited proteolysis on gelation and gel properties of whey protein isolate. *Journal of Dairy Science*, 78(10), 2119-2128. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76839-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76839-4)
- Justus, A., Pereira, D. G., Ida, E. I., & Kurozawa, L. E. (2019). Combined uses of an endo-and exopeptidase in okara improve the hydrolysates via formation of aglycone isoflavones and antioxidant capacity. *Lwt*, 115, 108467. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108467>
- Kilara, A., & Vaghela, M. N. (2018). Whey proteins. In *Proteins in Food Processing* (pp. 93-126). Woodhead publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00005-X>
- Kimatu, B. M., Zhao, L., Biao, Y., Ma, G., Yang, W., Pei, F., & Hu, Q. (2017). Antioxidant potential of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) protein hydrolysates and their ultrafiltration fractions. *Food Chemistry*, 230, 58-67. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.030>
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102(4), 1317-1327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.016>
- Kronic, T., Rakin, M., Bulatovic, M., & Zaric, D. (2018). The contribution of bioactive peptides of whey to quality of food products. In *Food Processing for Increased Quality and Consumption* (pp. 251-285). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811447-6.00009-6>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lesme, H., Rannou, C., Famelart, M. H., Bouhallab, S., & Prost, C. (2020). Yogurts enriched with milk proteins: Texture properties, aroma release and sensory perception. *Trends in Food Science & Technology*, 98, 140-149. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.006>
- Lim, S. M., Lee, N. K., Park, K. K., Yoon, Y. C., & Paik, H. D. (2011). ACE-inhibitory effect and physicochemical characteristics of yogurt beverage fortified with whey protein hydrolysates. *Food Science of Animal Resources*, 31(6), 886-892. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2011.31.6.886>
- Lin, S., Li, J., Hu, X., Chen, S., Huang, H., Wu, Y., & Li, Z. (2024). Potential dietary calcium supplement: Calcium-chelating peptides and peptide-calcium complexes derived from blue food proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 104364. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104364>

- Lin, S., Tian, W., Li, H., Cao, J., & Jiang, W. (2012). Improving antioxidant activities of whey protein hydrolysates obtained by thermal preheat treatment of pepsin, trypsin, alcalase and flavourzyme. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(10), 2045-2051. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03068.x>
- López, E. C., Eberhardt, A., Marino, F., Mammarella, E. J., Sihufe, G. A., & Manzo, R. M. (2022). Physicochemical characterisation of ACE-inhibitory and antioxidant peptides from Alcalase® whey protein hydrolysates using fractionation strategies. *International Journal of Dairy Technology*, 75(3), 538-552. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12872>
- Lovato, M. E. (2010). *Cinética de la descomposición del ozono y de su aplicación a la degradación de un compuesto modelo utilizando ozono y radiación ultravioleta* (Tesis doctoral). Universidad Nacional del Litoral. En internet: <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/handle/11185/300>
- 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>
- Mahmoud, M. I., & Cordle, C. T. (2000). Protein hydrolysates as special nutritional ingredients. In *Developments in Food Science* (Vol. 41, pp. 181-215). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0167-4501\(00\)80010-2](https://doi.org/10.1016/S0167-4501(00)80010-2)
- Mann, B., Athira, S., Sharma, R., Kumar, R., & Sarkar, P. (2019). Bioactive peptides from whey proteins. In *Whey Proteins* (pp. 519-547). Academic Press. <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. (2015). Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 3235-3241. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1361-3>
- Márquez, M. C., & Vázquez, M. A. (1999). Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, 35(1-2), 111-117. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00041-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00041-2)
- Martínez-Araiza, G., Castaño-Tostado, E., Amaya-Llano, S. L., Regalado-González, C., Martínez-Vera, C., & Ozimek, L. (2012). Modeling of enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2596-2601. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0624-5>
- Mat, D. J., Cattenoz, T., Souchon, I., Michon, C., & Le Feunteun, S. (2018). Monitoring protein hydrolysis by pepsin using pH-stat: In vitro gastric digestions in static and dynamic pH conditions. *Food Chemistry*, 239, 268-275. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.115>

- Mehra, R., Kumar, H., Kumar, N., Ranvir, S., Jana, A., Buttar, H. S., ... & Guiné, R. P. (2021). Whey proteins processing and emergent derivatives: An insight perspective from constituents, bioactivities, functionalities to therapeutic applications. *Journal of Functional Foods*, 87, 104760. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104760>
- Merz, M., Eisele, T., Berends, P., Appel, D., Rabe, S., Blank, I., ... & Fischer, L. (2015). Flavourzyme, an enzyme preparation with industrial relevance: automated nine-step purification and partial characterization of eight enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(23), 5682-5693. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01665>
- Mestawet, A. T., France, T. C., Mulcahy, P. G., & O'Mahony, J. A. (2024). Component partitioning during microfiltration and diafiltration of whey protein concentrate in the production of whey protein isolate. *International Dairy Journal*, 157, 106006. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.106006>
- Meza, B. E., De Piante Vicin, D. A., Marino, F., Sihufe, G. A., Peralta, J. M., & Zorrilla, S. E. (2020). Characterisation of soluble aggregates from commercial whey protein concentrate suspensions: Effect of protein concentration, pH, and heat treatment conditions. *International Journal of Dairy Technology*, 73(2), 429-436. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12669>
- Meza, B. E., Zorrilla, S. E., & Olivares, M. L. (2019). Rheological methods to analyse the thermal aggregation of calcium enriched milks. *International Dairy Journal*, 97, 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.05.001>
- Morais, E. C., Lima, G. C., de Morais, A. R., & Bolini, H. M. A. (2015). Prebiotic and diet/light chocolate dairy dessert: chemical composition, sensory profiling and relationship with consumer expectation. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 424-430. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.015>
- Morais, H. A., Silvestre, M. P., Amorin, L. L., Silva, V. D., Silva, M. R., Simoes e Silva, A. C., & Silveira, J. N. (2014). Use of different proteases to obtain whey protein concentrate hydrolysates with inhibitory activity toward angiotensin-converting enzyme. *Journal of Food Biochemistry*, 38(1), 102-109. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12032>
- Morr, C. V., & Ha, E. Y. W. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 33(6), 431-476. <https://doi.org/10.1080/10408399309527643>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

- Motta-Correa, Y. O., & Mosquera, M. W. J. (2015). Aprovechamiento del lactosuero y sus componentes como materia prima en la industria de alimentos. *@limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 13(1), 81-91. <https://doi.org/10.24054/limentech.v13i1.1599>
- Muset, G. B., & Castells, M. L. (2017). Valorización del lactosuero. Ediciones INTI (Instituto Nacional de Tecnología Industrial), Colección *Transferencia Tecnológica*. En internet: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1104616/1/AnaKrolowlactosue.ro.pdf>
- Nchienza, H. A., Morawicki, R. O., & Gadang, V. P. (2010). Enzymatic hydrolysis of poultry meal with endo- and exopeptidases. *Poultry Science*, 89(10), 2273-2280. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00558>
- Niizawa, I., Sihufe, G. A., & Zorrilla, S. E. (2021). Design of whey protein aggregates towards microgel-stabilized emulsion generation. *LWT*, 152, 112324. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112324>
- Nikpour, S., & Mosavian, M. T. H. (2025). Formulation of functional probiotic dairy dessert with date honey as a sucrose replacement: Chemical, physical, and sensory analysis. *Heliyon*, 11(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e41504>
- OCLA. (2023). Observatorio de la Cadena Láctea Argentina. En internet: <https://ocla.org.ar/>
- 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>
- Osman, A., Goda, H. A., Abdel-Hamid, M., Badran, S. M., & Otte, J. (2016). Antibacterial peptides generated by Alcalase hydrolysis of goat whey. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 480-486. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.043>
- Özer, B. H., & Kirmaci, H. A. (2010). Functional milks and dairy beverages. *International Journal of Dairy Technology*, 63(1), 1-15. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00547.x>
- Ozorio, L., Silva, L. P., Prates, M. V., Bloch Jr, C., Takeiti, C. Y., Gomes, D. M., ... & Cabral, L. M. (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>
- Pang, L., Liu, M., Chen, C., Huang, Z., Liu, S., Man, C., ... & Yang, X. (2024b). Effects of ultrasound pretreatment on the structure, IgE binding capacity, functional properties and bioactivity of whey protein hydrolysates via multispectroscopy and peptidomics revealed. *Ultrasonics Sonochemistry*, 110, 107025. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.107025>

- Pang, L., Zhang, W., Chen, C., Li, R., Huang, Z., Liu, S., ... & Jiang, Y. (2024a). Effect of enzymatic hydrolysis and ultrasound pretreatment on allergenicity, functional properties and bioactivity of whey protein isolates. *LWT*, 116891. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116891>
- Parra Huertas, R. A. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(1), 4967-4982.
- Patel, S. (2015). Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead. *Journal of Functional Foods*, 19, 308-319. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.040>
- Pelegrine, D. H. G., & Gasparetto, C. A. (2005). Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *LWT-Food Science and Technology*, 38(1), 77-80. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.03.013>
- Peng, X., Kong, B., Xia, X., & Liu, Q. (2010). Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase. *International Dairy Journal*, 20(5), 360-365. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.019>
- Peña Díaz, A., Arroyo Begovich, A., Gómez Puyou, A., Tapia Ibarquengoytia, R., Gómez Eichelman, C. (1980). Las proteínas, maquinaria de la vida. En: *Bioquímica*. 2ª ed. Editorial Limusa, México.
- Pessato, TB, de Carvalho, NC, Tavano, OL, Fernandes, LGR, Zollner, RDL y Netto, FM (2016). Hidrolizados de aislado de proteína de suero obtenidos con Alcalasa libre e inmovilizada: caracterización y detección de alérgenos residuales. *Food Research International*, 83, 112-120. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.015>
- Pihlanto, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1306-1314. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.005>
- Piornos, J. A., Burgos-Díaz, C., Ogura, T., Morales, E., Rubilar, M., Maureira-Butler, I., & Salvo-Garrido, H. (2015). Functional and physicochemical properties of a protein isolate from AluProt-CGNA: A novel protein-rich lupin variety (*Lupinus luteus*). *Food Research International*, 76, 719-724. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.013>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rezvankhah, A., Yarmand, M. S., Ghanbarzadeh, B., & Mirzaee, H. (2021). Generation of bioactive peptides from lentil protein: Degree of hydrolysis, antioxidant activity, phenol content, ACE-inhibitory activity, molecular weight, sensory, and functional properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 5021-5035. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01077-4>

- Rivero-Pino, F., Espejo-Carpio, F. J., & Guadix, E. M. (2020). Evaluation of the bioactive potential of foods fortified with fish protein hydrolysates. *Food Research International*, 137, 109572. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109572>
- Rossi, Y. E., Bohl, L. P., Braber, N. L. V., Ballatore, M. B., Escobar, F. M., Bodoira, R., ... & Montenegro, M. A. (2020). Polyphenols of peanut (*Arachis hypogaea* L.) skin as bioprotectors of normal cells. Studies of cytotoxicity, cytoprotection and interaction with ROS. *Journal of Functional Foods*, 67, 103862. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103862>
- Ruan, C. Q., Chi, Y. J., & Zhang, R. D. (2010). Kinetics of hydrolysis of egg white protein by pepsin. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(5), 355-363.
- Sağlam, D., Venema, P., de Vries, R., Shi, J., & van der Linden, E. (2013). Concentrated whey protein particle dispersions: heat stability and rheological properties. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.005>
- Schmidt, R. H., Packard, V. S., & Morris, H. A. (1984). Effect of processing on whey protein functionality. *Journal of Dairy Science*, 67(11), 2723-2733. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81630-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81630-6)
- Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Instituto Nacional de Tecnología Industrial, Fundación Green Cross Argentina, & Q-Innova. (2019). *Recuperación y valorización de lactosuero en PYMES de la cuenca láctea argentina, a través de la asociación público-privada*. En internet: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/valorizacion_lactosuero_vf.pdf
- Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2010). Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. *Revista Chilena de Nutrición*, 37(3), 386-391. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182010000300014>
- Severin, S., & Xia, W. S. (2006). Enzymatic hydrolysis of whey proteins by two different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, 30(1), 77-97. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2005.00048.x>
- Singh, R., & Geetanjali. (2016). Whey Proteins and Their Value-Added Applications. In *Protein Byproducts* (pp. 303-313). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802391-4.00016-1>
- 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>

- Smith, T. J., Campbell, R. E., & Drake, M. A. (2016). Sensory properties of milk protein ingredients. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects*, 197-223. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2_8
- Souza, R. S. C. D., Tonon, R. V., Stephan, M. P., Silva, C. M., Penteado, A. L., Cabral, L. M. C., & Kurozawa, L. E. (2019). Evaluation of the antioxidant potential of whey protein concentrated by ultrafiltration and hydrolyzed by different commercial proteases. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22, e2018021. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.02118>
- Spellman, D., O'Cuinn, G., & FitzGerald, R. J. (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>
- Staffolo, M., Martino, M., & Bevilacqua, A. (2007). Texture and sensory properties of dairy desserts with dietary fibres of different sources. *Acta Alimentaria*, 36(3), 343-354. <https://doi.org/10.1556/aalim.36.2007.3.6>
- Sun, N., Wu, H., Du, M., Tang, Y., Liu, H., Fu, Y., & Zhu, B. (2016). Food protein-derived calcium chelating peptides: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 58, 140-148. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.004>
- Tacias-Pascacio, V. G., Morellon-Sterling, R., Siar, E. H., Tavano, O., Berenguer-Murcia, A., & Fernandez-Lafuente, R. (2020). Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2143-2196. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.060>
- Tagg, J., & McGiven, A. (1971). Assay system for bacteriocins. *Applied Microbiology*, 21(5), 943-943. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/am.21.5.943-943.1971>
- Talamoni, S., Castells, M. L., González, M. A., Karlen, J. (2023). Posibilidades de Desarrollo para la Industria Nacional. El aprovechamiento del lactosuero en Argentina. En: *Análisis INTI - Industria para el Desarrollo*. En internet: https://www.inti.gob.ar/assets/uploads/files/economia-industrial/02-2023/lactosuero_argentina_final_v2.pdf
- Tárrega, A., & Costell, E. (2007). Colour and consistency of semi-solid dairy desserts: Instrumental and sensory measurements. *Journal of Food Engineering*, 78(2), 655-661. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.003>
- Terán, J. C., Paez, R., Pirola, M. B., & Schmidt, E. (2010). Características generales sobre el uso del suero de queso en la Provincia de Santa Fe. Rafaela, Argentina. Disponible en http://www.inti.gob.ar/lacteos/pdf/cuadernillo_Suero_de_Queso.pdf

- 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>
- Udenigwe, C. C., & Fogliano, V. (2017). Food matrix interaction and bioavailability of bioactive peptides: Two faces of the same coin? *Journal of Functional Foods*, 35, 9-12. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.029>
- Van der Ven, C., Gruppen, H., de Bont, D. B., & Voragen, A. G. (2002). Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and-stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2938-2946. <https://doi.org/10.1021/jf011190f>
- Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Krimer, V., & Peričin, D. (2011). Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chemistry*, 124(4), 1316-1321. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.062>
- Vera Valle, A. (2017). *Desarrollo de un yogur bebible enriquecido con péptidos bioactivos obtenidos de la hidrólisis enzimática de proteínas de suero lácteo utilizando papaína* [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Querétaro]. Disponible en: <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/1344>
- Verbeken, D., Bael, K., Thas, O., & Dewettinck, K. (2006). Interactions between κ -carrageenan, milk proteins and modified starch in sterilized dairy desserts. *International Dairy Journal*, 16(5), 482-488. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.06.006>
- Verdini, R. A., Zorrilla, S. E., & Rubiolo, A. C. (2002). Free amino acid profiles during ripening of Port Salut Argentino cheese after frozen storage. *Journal of Food Science*, 67(9), 3264-3270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09576.x>
- Vioque, J., & Millán, F. (2005). Los hidrolizados proteicos en alimentación: suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional. *Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación*, 26, 96-102. En internet: https://digital.csic.es/bitstream/10261/5750/1/IG_AGROCSIC_2.pdf
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., & Millan, F. (1999). Production and characterization of an extensive rapeseed protein hydrolysate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 819-823. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0071-x>
- Vogelsang-O'Dwyer, M., Sahin, A. W., Bot, F., O'Mahony, J. A., Bez, J., Arendt, E. K., & Zannini, E. (2023). Enzymatic hydrolysis of lentil protein concentrate for modification of physicochemical

- and techno-functional properties. *European Food Research and Technology*, 249(3), 573-586. <https://doi.org/10.1007/s00217-022-04152-2>
- Walstra, P. (2002). *Physical Chemistry of Foods*. Marcel Dekker, Inc, New York, Basel.
- Wang, L., Mao, X., Cheng, X., Xiong, X., & Ren, F. (2010). Effect of enzyme type and hydrolysis conditions on the in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and ash content of hydrolysed whey protein isolate. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(4), 807-812. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02210.x>
- Wei, M., Ning, C., Ren, Y., Hu, F., Wang, M., & Li, W. (2024). Characterisation and comparison of enzymatically prepared donkey milk whey protein hydrolysates. *Food Chemistry: X*, 22, 101360. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101360>
- Wen, L., Bi, H., Zhou, X., Zhu, H., Jiang, Y., Ramadan, N. S., ... & Yang, B. (2022). Structure and activity of bioactive peptides produced from soybean proteins by enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry Advances*, 1, 100089. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100089>
- Wichchukit, S., & O'Mahony, M. (2015). The 9-point hedonic scale and hedonic ranking in food science: some reappraisals and alternatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(11), 2167-2178. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6993>
- Wijayanti, H. B., Bansal, N., & Deeth, H. C. (2014). Stability of whey proteins during thermal processing: A review. *Comprehensive reviews in Food science and Food Safety*, 13(6), 1235-1251. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12105>
- Wu, J., & Ding, X. (2002). Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Research International*, 35(4), 367-375. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00131-4](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00131-4)
- Wu, Q., Du, J., Jia, J., & Kuang, C. (2016). Production of ACE inhibitory peptides from sweet sorghum grain protein using alcalase: Hydrolysis kinetic, purification and molecular docking study. *Food Chemistry*, 199, 140-149. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.012>
- Wu, W., He, L., Liang, Y., Yue, L., Peng, W., Jin, G., & Ma, M. (2019). Preparation process optimization of pig bone collagen peptide-calcium chelate using response surface methodology and its structural characterization and stability analysis. *Food Chemistry*, 284, 80-89. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.103>
- Xia, X. (2007). Protein isoelectric point. *Bioinformatics and the Cell: Modern Computational Approaches in Genomics, Proteomics and Transcriptomics*, 207-219.

- Xu, Y., Galanopoulos, M., Sismour, E., Ren, S., Mersha, Z., Lynch, P., & Almutaimi, A. (2020). Effect of enzymatic hydrolysis using endo- and exo-proteases on secondary structure, functional, and antioxidant properties of chickpea protein hydrolysates. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(1), 343-352. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00296-0>
- Xue, L., Yin, R., Howell, K., & Zhang, P. (2021). Activity and bioavailability of food protein-derived angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 1150-1187. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12711>
- 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), 756-774. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>
- Yilmaz-Ersan, L., Ozcan, T., Akpınar-Bayızit, A., Mansri, C., Topcuoglu, E., Karaman, S., & Ozdemir, T. (2019). The evaluation of the textural and sensorial properties of chocolate dairy dessert. *Journal of Animal Husbandry and Dairy Science*, 3(1), 9-13.
- Zhang, L., Zhou, R., Zhang, J., & Zhou, P. (2021). Heat-induced denaturation and bioactivity changes of whey proteins. *International Dairy Journal*, 123, 105175. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105175>
- Zhang, Q. X., Ling, Y. F., Sun, Z., Zhang, L., Yu, H. X., Kamau, S. M., & Lu, R. R. (2012). Protective effect of whey protein hydrolysates against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on PC12 cells. *Biotechnology Letters*, 34, 2001-2006. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1017-1>
- 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, C., Chen, N., & Ashaolu, T. J. (2022). Whey proteins and peptides in health-promoting functions—A review. *International Dairy Journal*, 126, 105269. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105269>
- Zhao, L., Cai, X., Huang, S., Wang, S., Huang, Y., Hong, J., & Rao, P. (2015). Isolation and identification of a whey protein-sourced calcium-binding tripeptide Tyr-Asp-Thr. *International Dairy Journal*, 40, 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.08.013>
- Zhao, L., Huang, Q., Huang, S., Lin, J., Wang, S., Huang, Y., ... & Rao, P. (2014a). Novel peptide with a specific calcium-binding capacity from whey protein hydrolysate and the possible chelating

- mode. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 62(42), 10274-10282. <https://doi.org/10.1021/jf502412f>
- Zhao, L., Huang, S., Cai, X., Hong, J., & Wang, S. (2014b). A specific peptide with calcium chelating capacity isolated from whey protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 10, 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.013>
- Zheng, H., Shen, X., Bu, G., & Luo, Y. (2008). Effects of pH, temperature and enzyme-to-substrate ratio on the antigenicity of whey protein hydrolysates prepared by Alcalase. *International Dairy Journal*, 18(10-11), 1028-1033. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.05.002>

ANEXOS

7. ANEXOS

ANEXO 1. Curva de calibración que vincula el porcentaje de disminución de color (D) del radical ABTS^{•+} a 734 nm en función de la concentración de Trolox (μM) (sección 3.2.A.5. y 3.2.B.4)

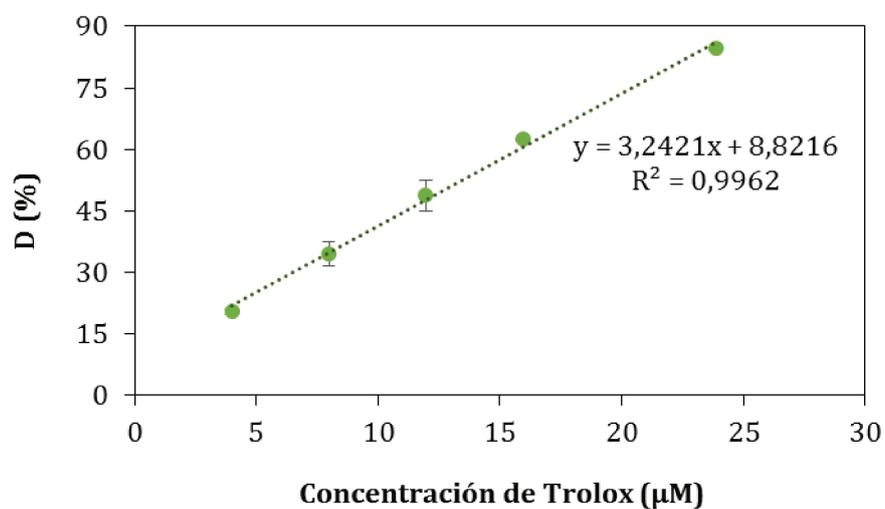


Figura A1. Porcentaje de disminución de color del radical ABTS^{•+} a 734 nm en función de la concentración de Trolox.

ANEXO 2. Diseño compuesto central empleado en la determinación de la capacidad quelante de calcio de los ingredientes funcionales (sección 3.2.B.4.)

Tabla A2. Diseño compuesto central empleado para evaluar la influencia de diversas variables de la reacción de quelación sobre la capacidad quelante de calcio de los ingredientes funcionales.

| Ensayo | Variables codificadas | | |
|--------|-----------------------|--------|--------|
| | X1 | X2 | X3 |
| 1 | -1.000 | -1.000 | -1.000 |
| 2 | 1.000 | -1.000 | -1.000 |
| 3 | -1.000 | 1.000 | -1.000 |
| 4 | 1.000 | 1.000 | -1.000 |
| 5 | -1.000 | -1.000 | 1.000 |
| 6 | 1.000 | -1.000 | 1.000 |
| 7 | -1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 8 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 9 | -1.682 | 0.000 | 0.000 |
| 10 | 1.682 | 0.000 | 0.000 |
| 11 | 0.000 | -1.682 | 0.000 |
| 12 | 0.000 | 1.682 | 0.000 |
| 13 | 0.000 | 0.000 | -1.682 |
| 14 | 0.000 | 0.000 | 1.682 |
| 15 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 16 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 17 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 18 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 19 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 20 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

ANEXO 3. Determinación del contenido de calcio mediante el kit comercial Ca-color AA (sección 3.2.B.4.)

Fundamento del método: El calcio reacciona con la o-cresoltaleín complexona a pH alcalino, dando un complejo de color magenta que se mide espectrofotométricamente a 570 nm.

Reactivos provistos en el kit y concentraciones finales:

- **Reactivo A:** solución de o-cresoltaleín complexona y 8-hidroxiquinolina, 0,08 y 4 mmol/L, respectivamente.
- **Reactivo B:** solución de aminometil propanol (AMP), 3,5 mol/L.
- **Standard:** solución de calcio 10 mg/dL.

Condiciones de reacción:

- Longitud de onda del espectrofotómetro: 570 nm.
- Temperatura de reacción: temperatura ambiente (15-25°C).
- Tiempo de reacción: 5 min.
- Volumen de muestra: 50 µL.
- Volumen final de reacción: 2,050 mL.

Procedimiento: Las mezclas de reacción del blanco, patrón o muestra a analizar, se preparó de acuerdo al siguiente esquema:

| | Blanco | Patrón | Muestra |
|---------------------|--------|--------|---------|
| Agua ultrapura (µL) | 50 | - | - |
| Standard (µL) | - | 50 | - |
| Muestra (µL) | - | - | 50 |
| Reactivo A (mL) | 1 | 1 | 1 |
| Reactivo B (mL) | 1 | 1 | 1 |

Se mezcló, se incubó por 5 min a temperatura ambiente (15-25°C) y se hizo lectura de la absorbancia en espectrofotómetro a 570 nm.

Curva de calibrado: El trazado de la curva de calibrado se realizó empleando un rango de concentración de calcio de 0 a 0,1 g/L (**Figura A3**), mezclando distintos volúmenes de standard provisto por el kit y agua ultrapura (volumen total de la mezcla usada en la reacción: 50 µL). La ecuación de la recta obtenida de la curva de calibrado, con un R² de 0,9875, fue la siguiente:

$$\text{Absorbancia a 570 nm} = 9,3691 \times \text{concentración de calcio } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)$$

A partir de dicha ecuación y los valores de absorbancia de las muestras en estudio se obtuvo la concentración de calcio de las mezclas de reacción en g/L.



Figura A3. Mezclas de reacción al final de la incubación (5 min) con distintas concentraciones de calcio realizadas para la construcción de la curva de calibración. **B:** 0 g/L, **1:** 0,02 g/L, **2:** 0,04 g/L, **3:** 0,06 g/L, **4:** 0,08 g/L, **5:** 0,1 g/L.

Cálculos:

Dado que el volumen total de la mezcla evaluada era de 33 mL, el contenido de calcio presente en la misma se determinó del siguiente modo:

$$Ca (mg) = Ca \left(\frac{g}{L} \right) \times 33 \text{ mL} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$$

Dado que el contenido de hidrolizado en la mezcla era de 150 mg (15 mL × 10 mg/mL), el contenido de calcio retenido por masa de péptido se determinó del siguiente modo:

$$Ca \left(\frac{\mu g}{mg \text{ péptido}} \right) = \frac{Ca(mg)}{150 \text{ mg péptido}} \times \frac{1000 \mu g}{1 \text{ mg}}$$

ANEXO 4. Análisis sensorial descriptivo cuantitativo (QDA®) de formulaciones de postres lácteos (sección 3.3.B.1.)

Tabla A.4. Descriptores sensoriales empleados en el análisis QDA® de las formulaciones de postres lácteos.

| Descriptor | Definición |
|--------------------------|---|
| Color característico | Color característico equivalente a un dulce de leche "tipo familiar" |
| Brillo | Capacidad superficial para reflejar la luz externa en una dirección |
| Sinéresis | Cantidad de líquido exudado desde el interior del gel del alimento |
| Consistencia | Capacidad del alimento de conservar su forma en el tiempo |
| Uniformidad de masa | Grado de uniformidad volumétrica del alimento |
| Filancia | Capacidad de formar un hilo continuo debido a la viscosidad del alimento |
| Suavidad | Liso al tacto de la cavidad bucal |
| Adherencia | Esfuerzo mecánico necesario para despegar la muestra del interior de la cavidad bucal |
| Cremosidad | Sensación que produce un producto en la boca cuando se funde o se disuelve en la lengua y cavidad bucal |
| Gusto dulce | Intensidad del gusto dulce |
| Gusto amargo | Intensidad del gusto amargo |
| Gusto salado | Intensidad del gusto salado |
| Sabor a "dulce de leche" | Intensidad de sabor a dulce de leche |
| Sabor a crema | Intensidad de sabor a crema |
| Sabor a polvo | Intensidad de sabor a polvo |
| Sabor láctico | Intensidad de sabor láctico |
| Sabor a cocido | Intensidad de sabor a cocido |
| Flavor residual | Persistencia retro nasal del flavor del alimento |
| Flavor global | Grado de Intensidad del flavor del alimento |

ANEXO 5. Análisis sensorial de formulaciones de postres lácteos basada en consumidores (sección 3.3.B.2.)

FIQ UNL

Estimado/a participante,
 Usted está siendo invitado a participar en un estudio sobre percepción de postres lácteos y tiene absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Género: | Edad:

.....
FIRMA

Por favor pruebe la muestra **064** e indique cuanto le gusta:

Me disgusta Me disgusta Me disgusta Me disgusta Me resulta Me gusta Me gusta Me gusta Me gusta
 muchísimo mucho poco indiferente poco mucho mucho muchísimo

A continuación, pruebe la muestra **889** e indique cuanto le gusta:

Me disgusta Me disgusta Me disgusta Me disgusta Me resulta Me gusta Me gusta Me gusta Me gusta
 muchísima mucho poco indiferente poco mucho mucho muchísimo

Seguidamente, pruebe la muestra **327** e indique cuanto le gusta:

Me disgusta Me disgusta Me disgusta Me disgusta Me resulta Me gusta Me gusta Me gusta Me gusta
 muchísimo mucho poco indiferente poco mucho mucho muchísimo

Finalmente, pruebe la muestra **551** e indique cuanto le gusta:

Me disgusta Me disgusta Me disgusta Me disgusta Me resulta Me gusta Me gusta Me gusta Me gusta
 muchísimo mucho poco indiferente poco mucho mucho muchísimo

¿CUAL DE LAS 4 MUESTRAS COMPRARÍA? Por favor marque con una cruz
(puede indicar una, dos, tres, todas o ninguna)

064 889

327 551

Figura A5. Planilla presentada a los consumidores para el análisis sensorial.

ANEXO 6. Grado de hidrólisis alcanzado por los controles de proteínas de suero sin hidrolizar obtenidos en experiencias preliminares de hidrólisis enzimática (sección 4.1.B.1.)

Tabla A.6. Valores promedio y desviación estándar correspondientes al grado de hidrólisis de los CSHs, en función del pH y de la concentración de sustrato [S_0 , % (m/v) de proteínas].

| pH | S_0 | Grado de hidrólisis (%) |
|----|-------|---------------------------|
| 7 | 1 | 0,22 ± 0,31 ^a |
| | 6 | 1,05 ± 0,05 ^{bc} |
| | 8 | - |
| | 10 | 1,10 ± 0,13 ^{bc} |
| 8 | 1 | 0,90 ± 0,29 ^{bc} |
| | 6 | 0,93 ± 0,08 ^{bc} |
| | 8 | 0,70 ± 0,03 ^{ab} |
| | 10 | 0,94 ± 0,02 ^{bc} |
| 9 | 1 | 1,91 ± 0,75 ^d |
| | 6 | 1,46 ± 0,30 ^{cd} |
| | 8 | 1,23 ± 0,07 ^{bc} |
| | 10 | 1,47 ± 0,30 ^{cd} |

^{a-d} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

ANEXO 7. Viscosidad de los ingredientes funcionales en función de la concentración y del pH (sección 4.2.B.3.)

Tabla A.7.1. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la viscosidad de las muestras de WPH-A en función de la concentración [% (m/v)] y del pH.

| WPH-A | | | | | | |
|--------------------|----|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| % (m/v) | pH | Viscosidad (cP) | | | | |
| | | 20°C | 30°C | 40°C | 50°C | 60°C |
| 2 | 4 | 1,42 ± 0,05 | 1,06 ± 0,07 | 0,88 ± 0,03 | 0,69 ± 0,05 | 0,58 ± 0,04 |
| | 6 | 1,17 ± 0,00 | 0,98 ± 0,01 | 0,86 ± 0,08 | 0,72 ± 0,06 | 0,60 ± 0,02 |
| | 8 | 1,19 ± 0,00 | 0,92 ± 0,00 | 0,76 ± 0,01 | 0,60 ± 0,03 | 0,48 ± 0,03 |
| 6 | 4 | 1,76 ± 0,01 | 1,43 ± 0,00 | 1,17 ± 0,01 | 0,94 ± 0,05 | 0,77 ± 0,02 |
| | 6 | 1,43 ± 0,01 | 1,14 ± 0,01 | 0,93 ± 0,03 | 0,77 ± 0,01 | 0,67 ± 0,01 |
| | 8 | 1,45 ± 0,01 | 1,19 ± 0,01 | 0,98 ± 0,00 | 0,80 ± 0,01 | 0,71 ± 0,03 |
| 10 | 4 | 2,47 ± 0,02 | 1,88 ± 0,01 | 1,43 ± 0,01 | 1,11 ± 0,06 | 0,88 ± 0,00 |
| | 6 | 1,77 ± 0,11 | 1,36 ± 0,02 | 1,07 ± 0,06 | 0,85 ± 0,04 | 0,70 ± 0,03 |
| | 8 | 1,85 ± 0,01 | 1,48 ± 0,06 | 1,19 ± 0,00 | 0,96 ± 0,03 | 0,78 ± 0,05 |
| Tiempo (T) | | | | | | S |
| Concentración (C) | | | | | | S |
| pH | | | | | | S |
| Interacción T-C | | | | | | S |
| Interacción T-pH | | | | | | S |
| Interacción C-pH | | | | | | S |
| Interacción T-C-pH | | | | | | S |

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. S: Efecto significativo ($p < 0,05$).

Tabla A.7.2. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la viscosidad de las muestras de WPH-AF en función de la concentración [% (m/v)] y del pH.

| WPH-AF | | | | | | |
|--------------------|----|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| % (m/v) | pH | Viscosidad (cP) | | | | |
| | | 20°C | 30°C | 40°C | 50°C | 60°C |
| 2 | 4 | 1,27 ± 0,05 | 1,07 ± 0,11 | 0,78 ± 0,00 | 0,60 ± 0,02 | 0,50 ± 0,01 |
| | 6 | 1,17 ± 0,00 | 0,98 ± 0,02 | 0,90 ± 0,01 | 0,82 ± 0,02 | 0,61 ± 0,03 |
| | 8 | 1,13 ± 0,00 | 0,92 ± 0,01 | 0,75 ± 0,04 | 0,65 ± 0,07 | 0,53 ± 0,04 |
| 6 | 4 | 1,64 ± 0,02 | 1,37 ± 0,00 | 1,03 ± 0,03 | 0,87 ± 0,01 | 0,76 ± 0,01 |
| | 6 | 1,38 ± 0,03 | 1,15 ± 0,02 | 0,94 ± 0,03 | 0,78 ± 0,02 | 0,71 ± 0,02 |
| | 8 | 1,36 ± 0,00 | 1,09 ± 0,01 | 0,90 ± 0,01 | 0,75 ± 0,01 | 0,59 ± 0,04 |
| 10 | 4 | 2,28 ± 0,01 | 1,70 ± 0,00 | 1,22 ± 0,04 | 0,96 ± 0,05 | 0,77 ± 0,01 |
| | 6 | 1,64 ± 0,00 | 1,28 ± 0,00 | 1,00 ± 0,01 | 0,80 ± 0,02 | 0,66 ± 0,02 |
| | 8 | 1,70 ± 0,00 | 1,34 ± 0,00 | 1,03 ± 0,01 | 0,86 ± 0,00 | 0,71 ± 0,02 |
| Tiempo (T) | | | | | | S |
| Concentración (C) | | | | | | S |
| pH | | | | | | S |
| Interacción T-C | | | | | | S |
| Interacción T-pH | | | | | | S |
| Interacción C-pH | | | | | | S |
| Interacción T-C-pH | | | | | | S |

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. S: Efecto significativo ($p < 0,05$).

Tabla A.7.3. Valores promedio y desviación estándar correspondientes a la viscosidad de las muestras de WPC-80 en función de la concentración [% (m/v)] y del pH.

| WPC-80 | | | | | | |
|--------------------|----|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| % (m/v) | pH | Viscosidad (cP) | | | | |
| | | 20°C | 30°C | 40°C | 50°C | 60°C |
| 2 | 4 | 2,01 ± 0,04 | 1,57 ± 0,00 | 1,29 ± 0,02 | 1,24 ± 0,05 | 1,22 ± 0,05 |
| | 6 | 1,29 ± 0,06 | 1,05 ± 0,05 | 0,82 ± 0,06 | 0,67 ± 0,02 | 0,55 ± 0,02 |
| | 8 | 1,39 ± 0,01 | 1,09 ± 0,00 | 0,89 ± 0,02 | 0,76 ± 0,04 | 0,58 ± 0,00 |
| 6 | 4 | 2,54 ± 0,03 | 2,25 ± 0,03 | 2,26 ± 0,04 | 2,35 ± 0,10 | 2,31 ± 0,10 |
| | 6 | 2,08 ± 0,04 | 1,67 ± 0,01 | 1,30 ± 0,00 | 1,01 ± 0,01 | 0,83 ± 0,01 |
| | 8 | 2,17 ± 0,05 | 1,74 ± 0,02 | 1,37 ± 0,01 | 1,08 ± 0,00 | 0,91 ± 0,03 |
| 10 | 4 | 3,08 ± 0,04 | 2,43 ± 0,04 | 1,96 ± 0,03 | 2,36 ± 0,00 | 5,74 ± 0,11 |
| | 6 | 3,38 ± 0,04 | 2,64 ± 0,02 | 2,06 ± 0,01 | 1,62 ± 0,01 | 1,32 ± 0,02 |
| | 8 | 3,53 ± 0,06 | 2,73 ± 0,02 | 2,11 ± 0,01 | 1,68 ± 0,00 | 1,38 ± 0,01 |
| Tiempo (T) | | | | | | S |
| Concentración (C) | | | | | | S |
| pH | | | | | | S |
| Interacción T-C | | | | | | S |
| Interacción T-pH | | | | | | S |
| Interacción C-pH | | | | | | S |
| Interacción T-C-pH | | | | | | S |

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. S: Efecto significativo ($p < 0,05$).

ANEXO 8. Estabilidad de la espuma de los ingredientes funcionales en función de la concentración, del pH y de la fuerza iónica (sección 4.2.B.3.)

Tabla A.8.1. Valores promedio correspondientes a la estabilidad de la espuma (%) en función de la concentración [% (m/v)] a lo largo del tiempo.

| Tiempo (min) | WPH-A | | | WPH-AF | | | WPC-80 | | |
|-----------------|-------|------|-------|--------|------|-------|--------|-------|-------|
| | 2% | 6% | 10% | 2% | 6% | 10% | 2% | 6% | 10% |
| 0 | 10,00 | 8,75 | 20,00 | 0,00 | 7,50 | 16,25 | 11,25 | 12,50 | 28,75 |
| 1 | 2,50 | 6,25 | 16,25 | - | 0,00 | 2,50 | 11,25 | 12,50 | 25,00 |
| 2 | 0,00 | 1,25 | 11,25 | - | - | 0,00 | 11,25 | 12,50 | 25,00 |
| 3 | - | 0,00 | 10,00 | - | - | - | 11,25 | 11,25 | 25,00 |
| 4 | - | - | 6,25 | - | - | - | 10,00 | 11,25 | 25,00 |
| 5 | - | - | 6,25 | - | - | - | 7,50 | 7,50 | 25,00 |
| 10 | - | - | 5,00 | - | - | - | 5,00 | 6,25 | 23,75 |
| 15 | - | - | 3,75 | - | - | - | 5,00 | 6,25 | 22,50 |
| 20 | - | - | 3,75 | - | - | - | 5,00 | 6,25 | 22,50 |
| 25 | - | - | 1,25 | - | - | - | 2,50 | 5,00 | 21,25 |
| 30 | - | - | 1,25 | - | - | - | 0,00 | 3,75 | 21,25 |
| 35 | - | - | 0,00 | - | - | - | - | 3,75 | 20,00 |
| 40 | - | - | - | - | - | - | - | 1,25 | 18,75 |
| 50 | - | - | - | - | - | - | - | 0,00 | 17,50 |
| 60 | - | - | - | - | - | - | - | - | 15,00 |
| 70 | - | - | - | - | - | - | - | - | 12,50 |
| 80 | - | - | - | - | - | - | - | - | 12,50 |
| 90 | - | - | - | - | - | - | - | - | 11,25 |
| 100 | - | - | - | - | - | - | - | - | 10,00 |
| 110 | - | - | - | - | - | - | - | - | 10,00 |
| 120 | - | - | - | - | - | - | - | - | 8,75 |
| 130 | - | - | - | - | - | - | - | - | 6,25 |
| 140 | - | - | - | - | - | - | - | - | 2,50 |
| 150 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,00 |

Tabla A.8.2. Valores promedio correspondientes a la estabilidad de la espuma (%) en función del pH a lo largo del tiempo.

| Tiempo (min) | WPH-A | | | WPH-AF | | | WPC-80 | | |
|-----------------|-------|-------|-------|--------|------|------|--------|-------|-------|
| | 4,5 | 5,5 | 6,5 | 4,5 | 5,5 | 6,5 | 4,5 | 5,5 | 6,5 |
| 0 | 5,00 | 12,50 | 10,00 | 7,50 | 0,00 | 0,00 | 20,00 | 15,00 | 16,25 |
| 1 | 2,50 | 10,00 | 3,75 | 5,00 | - | - | 20,00 | 13,75 | 13,75 |
| 2 | 1,25 | 8,75 | 0,00 | 5,00 | - | - | 18,75 | 12,50 | 11,25 |
| 3 | 0,00 | 7,50 | - | 2,50 | - | - | 17,50 | 12,50 | 10,00 |
| 4 | - | 7,50 | - | 2,50 | - | - | 17,50 | 12,50 | 10,00 |
| 5 | - | 5,00 | - | 1,25 | - | - | 16,25 | 11,25 | 8,75 |
| 10 | - | 2,50 | - | 0,00 | - | - | 15,00 | 10,00 | 7,50 |
| 15 | - | 2,50 | - | - | - | - | 15,00 | 8,75 | 7,50 |
| 20 | - | 2,50 | - | - | - | - | 12,50 | 7,50 | 5,00 |
| 25 | - | 2,50 | - | - | - | - | 12,50 | 5,00 | 2,50 |
| 30 | - | 1,25 | - | - | - | - | 11,25 | 5,00 | 0,00 |
| 35 | - | 0,00 | - | - | - | - | 10,00 | 2,50 | - |
| 40 | - | - | - | - | - | - | 10,00 | 0,00 | - |
| 50 | - | - | - | - | - | - | 7,50 | - | - |
| 60 | - | - | - | - | - | - | 5,00 | - | - |
| 70 | - | - | - | - | - | - | 5,00 | - | - |
| 80 | - | - | - | - | - | - | 5,00 | - | - |
| 90 | - | - | - | - | - | - | 5,00 | - | - |
| 100 | - | - | - | - | - | - | 2,50 | - | - |
| 110 | - | - | - | - | - | - | 0,00 | - | - |

Tabla A.8.3. Valores promedio correspondientes a la estabilidad de la espuma (%) en función de la fuerza iónica [% (m/v) de NaCl] a lo largo del tiempo.

| Tiempo (min) | WPH-A | | | | | WPH-AF | | | | | WPC-80 | | | | |
|-----------------|-------|------|-------|------|------|--------|------|------|------|------|--------|-------|-------|-------|-------|
| | 0 | 0,2 | 0,6 | 1 | 2 | 0 | 0,2 | 0,6 | 1 | 2 | 0 | 0,2 | 0,6 | 1 | 2 |
| 0 | 10,00 | 5,00 | 12,50 | 5,00 | 7,50 | 0,00 | 2,50 | 2,50 | 2,50 | 0,00 | 11,25 | 13,75 | 12,50 | 15,00 | 16,25 |
| 1 | 2,50 | 0,00 | 2,50 | 2,50 | 2,50 | | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 11,25 | 13,75 | 12,50 | 12,50 | 16,25 |
| 2 | 0,00 | - | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | - | - | - | - | 11,25 | 13,75 | 12,50 | 12,50 | 16,25 |
| 3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 11,25 | 11,25 | 11,25 | 12,50 | 16,25 |
| 4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 10,00 | 11,25 | 11,25 | 12,50 | 15,00 |
| 5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 7,50 | 11,25 | 11,25 | 11,25 | 15,00 |
| 10 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 5,00 | 7,50 | 10,00 | 10,00 | 12,50 |
| 15 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 5,00 | 6,25 | 8,75 | 8,75 | 10,00 |
| 20 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 5,00 | 5,00 | 7,50 | 6,25 | 6,25 |
| 25 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2,50 | 3,75 | 5,00 | 2,50 | 2,50 |
| 30 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,00 | 2,50 | 5,00 | 0,00 | 0,00 |
| 35 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,00 | 2,50 | - | - |
| 40 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,00 | - | - |

ANEXO 9. Inhibición de la ECA de los ingredientes funcionales en función de la concentración (sección 4.2.B.4.)

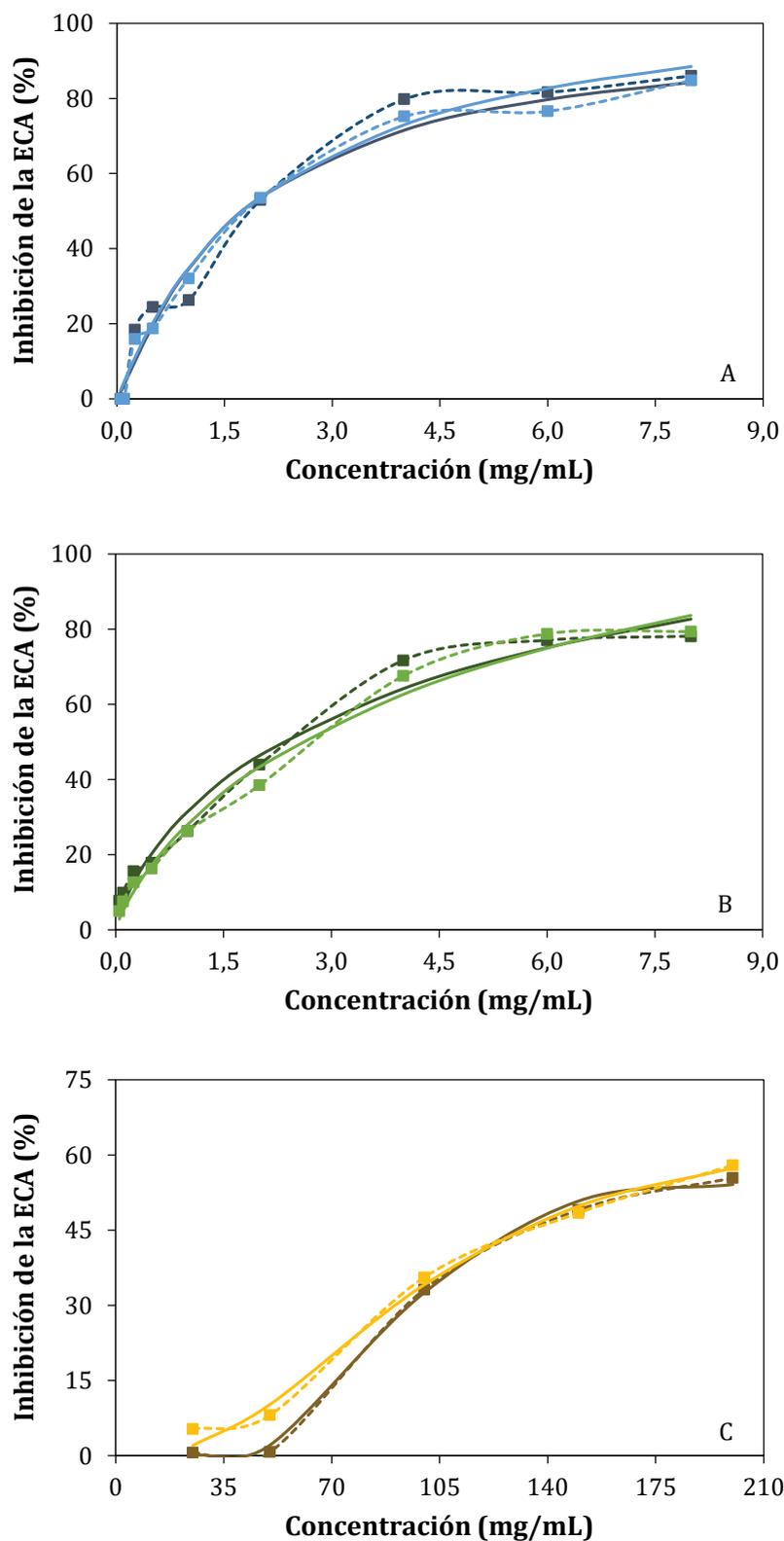


Figura A9. Inhibición de la ECA (%) por duplicado. (A) WPH-A. (B) WPH-AF. (C) WPC-80. Línea entrecortada: datos experimentales. Línea continua: datos predichos por el modelo de ajuste.

ANEXO 10. Análisis estadístico correspondiente al análisis sensorial de formulaciones de postres lácteo basada en consumidores (sección 4.3.A.2.)

Tabla A10. Test exacto de Fisher para la significancia por celda basado en la intención de compra de las formulaciones de postres lácteos (FC, FWPC-80, FWPH-A y FWPH-AF) evaluados a los 3-4 días de elaboración a 8°C.

| | General | | Hombres | | Mujeres | |
|----------------|---------|----|---------|----|---------|----|
| | SI | NO | SI | NO | SI | NO |
| FC | > | < | > | < | > | < |
| FWPC-80 | > | < | > | < | > | < |
| FWPH-A | < | > | < | > | < | > |
| FWPH-AF | < | > | < | > | < | > |

Los valores mostrados en rojo son significativos ($p < 0,05$). SI: compra. NO: no compra.

ANEXO 11. Inhibición de la ECA de los ingredientes funcionales incorporados en formulaciones de postres lácteos en función de la concentración (sección 4.3.C.)

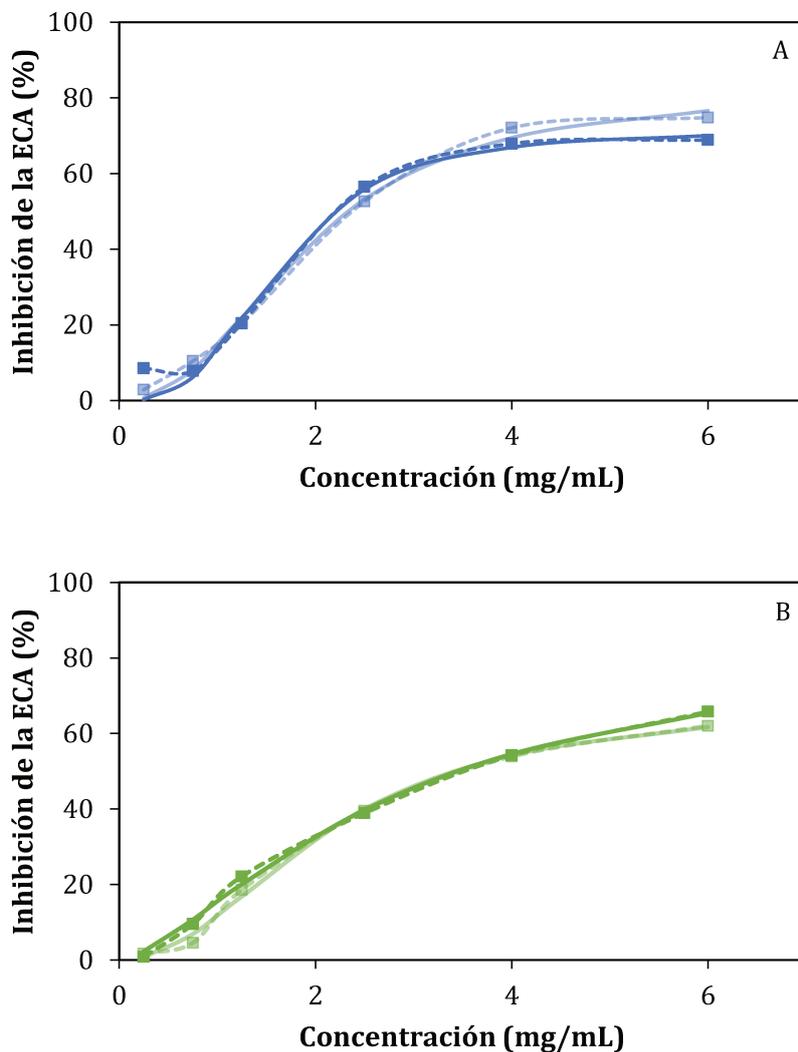


Figura A11. Inhibición de la ECA (%) por duplicado de los ingredientes funcionales incorporados en formulaciones de postres lácteos. (A) WPH-A. (B) WPH-AF. Línea entrecortada: datos experimentales. Línea continua: datos predichos por el modelo de ajuste.