



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**TESIS DOCTORAL**

**ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA FUNCIONAL DE PROTEÍNAS  
HIDROLIZADAS DE LACTOSUERO Y COLÁGENO OVINO**

Para obtener el grado de  
Doctora en Ciencias Agropecuarias

**PRESENTA**

**M. en C. Xóchitl Alejandra Pérez Marroquín**

Director

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez

Codirectora

Dra. Arely León López

Tulancingo de Bravo, Hidalgo., México., 12 agosto 2024.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**TESIS DOCTORAL**

**ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA FUNCIONAL DE PROTEÍNAS**

**HIDROLIZADAS DE LACTOSUERO Y COLÁGENO OVINO**

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias Agropecuarias

**PRESENTA**

**M. en C. Xóchitl Alejandra Pérez Marroquín**

Director

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez

Codirectora

Dra. Arely León López

Asesores

Dr. Constantino III Roberto López Macías

Dr. Rubén Jiménez Alvarado

Dra. Rosa Hayde Alfaro Rodríguez

Tulancingo de Bravo, Hidalgo., México., 12 agosto 2024

01/08/2024

Asunto: Autorización de impresión

**Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado**  
**Directora de Administración Escolar**  
**Presente.**

El Comité Tutorial del **PROYECTO TERMINAL O TESIS** del programa educativo de posgrado titulado **"Elaboración de una bebida funcional de proteínas hidrolizadas de lactosuero y colágeno ovino"**, realizado por la sustentante **XOCHITL ALEJANDRA PÉREZ MARROQUÍN** con número de cuenta **409780** perteneciente al programa de **DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS (TRADICIONAL)**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

### **AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN**

Por lo que el/la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

**Atentamente**

**"Amor, Orden y Progreso"**

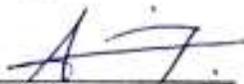
**Tulancingo, Hidalgo a 01 de Agosto de 2024.**

El Comité Tutorial

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Gabriel Aguirre**  
**Álvarez**

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Arely León López**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Constantino López**  
**Macías**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Rubén Jiménez**  
**Alvarado**

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Rosa Hayde Alfaro**  
**Rodríguez**

**AGRADECIMIENTOS**

A Dios y al Universo por conspirar siempre a mi favor y guiar cada uno de mis pasos a lo largo de este trayecto.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada 793009 para realización de los estudios de Doctorado en Ciencias Agropecuarias en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo/Instituto de Ciencias Agropecuarias.

Al Dr. Gabriel Aguirre Álvarez por su dirección académica, por todos los conocimientos transmitidos. Su experiencia y paciencia fueron fundamentales para conformar esta investigación e impulsar mi desarrollo como investigadora.

A la Dra. Arely León López por su labor como Co-Directora en la que demostró no solo un gran conocimiento, sino también una comprensión y calidad humana en el trabajo diario. Sus contribuciones han sido un faro de luz en el proceso de investigación. Ha sido un privilegio aprender bajo su dirección.

A la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Centro Médico Nacional Siglo XXI por permitirme llevar a cabo uno de los objetivos del proyecto.

A mis amigos por su apoyo, confianza y cariño que son invaluable. Trabajar con ustedes ha sido no solo una experiencia de aprendizaje enriquecedora sino una fuente de inspiración constante.

## DEDICATORIA

A mi madre por su profunda inspiración, apoyo incondicional e infinito amor.

A mi hermano por alentarme a perseguir mis objetivos.

*“El hombre se descubre cuando se mide con un obstáculo”  
Saint-Exupéry.*

## RESUMEN

Se determinó el peso molecular de los hidrolizados de colágeno ovino y lactosuero obtenidos mediante SDS-PAGE, observándose bandas alrededor de 14 kDa a 11.5 kDa para el colágeno hidrolizado. Además, se identificaron bandas representativas de las proteínas del suero, como la  $\alpha$ -lactoalbúmina (15 kDa) y la  $\beta$ -lactoglobulina (11.07 kDa).

Se formularon bebidas utilizando los hidrolizados proteicos: colágeno hidrolizado (CH) y lactosuero hidrolizado (SH). Las formulaciones de bebidas de lactosuero con diferentes porcentajes de CH fueron identificadas con los siguientes códigos: SC5 (5% de colágeno hidrolizado), SC10 (10% de colágeno hidrolizado), SC15 (15% de colágeno hidrolizado) y SC20 (20% de colágeno hidrolizado). Todos los tratamientos fueron caracterizados mediante análisis bromatológicos, donde la muestra SC20, con un 20% de colágeno hidrolizado, mostró el mayor contenido proteico ( $1.03 \pm 0.05$  %).

El espectro de FTIR mostró grupos funcionales característicos del colágeno, como las vibraciones de tensión del grupo NH de la amida A ( $3300 \text{ cm}^{-1}$ ) y el pico cercano a los  $1637 \text{ cm}^{-1}$  representativo de la amida I, relacionado con la estructura secundaria del colágeno. En el análisis microbiológico, todas las formulaciones mostraron ausencia de los microorganismos indicadores de contaminación empleados en la prueba.

La determinación de antioxidantes mediante la inhibición del radical ABTS $\bullet$  indicó que SC20 tuvo la mayor inhibición con un porcentaje de  $99.76 \pm 0.08$ , en comparación con el CH ( $39.67 \pm 1.21$ ). Un comportamiento similar se observó con el radical DPPH, donde el tratamiento SC20 presentó una mayor inhibición con un porcentaje de  $69.19 \pm 0.43$  en comparación con el CH ( $18.50 \pm 1.67$ ).

En la determinación de la biodisponibilidad de hidroxiprolina in vitro, se encontró que las formulaciones con CH mostraron una absorción cercana al 97%. La actividad antihipertensiva de la ECA (Enzima Convertidora de Angiotensina) mostró una inhibición del  $67.77 \pm 0.28$  % para el tratamiento SC20, mientras que para el control con CH se reportó un porcentaje de  $65.30 \pm 0.36$ .

Finalmente, la suplementación con CH y SC10 no generó efectos significativos en la recuperación inmunitaria, evaluada a través del peso del bazo, timo y el porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+, en un modelo de inmunosupresión en ratones CD-1.

**ABSTRACT**

The molecular weight of hydrolyzed ovine collagen and whey hydrolysates was determined by SDS-PAGE, where bands were observed around 14 kDa and 11.5 kDa for the hydrolyzed collagen. Bands representative of whey proteins, such as  $\alpha$ -lactalbumin (15 kDa) and  $\beta$ -lactoglobulin (11.07 kDa), were also observed. Beverages were prepared using hydrolyzed collagen (HC) and whey hydrolysates (HW). The formulations of whey beverages with different percentages of HC were identified with the following codes: WC5 (5% hydrolyzed collagen), WC10 (10% hydrolyzed collagen), WC15 (15% hydrolyzed collagen), and WC20 (20% hydrolyzed collagen).

All treatments were characterized through bromatological analysis, with WC20 showing the highest protein content ( $1.03\pm 0.05\%$ ). The FTIR spectrum revealed functional groups characteristic of collagen, such as the stretching vibrations of the NH group of amide A at  $3300\text{ cm}^{-1}$  and the peak near  $1637\text{ cm}^{-1}$ , representative of amide I, which is related to the secondary structure of collagen. Microbiological analysis confirmed that all formulations were free from contamination indicators.

The determination of antioxidant capacity by inhibition of the ABTS $\bullet\bullet$  radical indicated that WC20 had the highest inhibition rate ( $99.76\pm 0.08\%$ ), compared to HC ( $39.67\pm 1.21\%$ ). A similar pattern was observed with the DPPH radical. The bioavailability of hydroxyproline in vitro showed that the HC formulations had an absorption rate close to 97%. The antihypertensive activity of ACE (Angiotensin-Converting Enzyme) inhibition was  $67.77\pm 0.28\%$  for the WC20 treatment, compared to  $65.30\pm 0.36\%$  for HC. Finally, supplementation with CH and SC10 did not produce significant effects on immune recovery, as assessed by spleen and thymus weight and

the percentage of CD4+ and CD8+ T lymphocytes, in an immunosuppression model in CD-1 mice.

## ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	Antecedentes .....	2
1.2	Justificación.....	4
1.3	Planteamiento del problema.....	5
2	MARCO TEÓRICO .....	7
2.1	Alimentos funcionales. ....	7
2.2	Bebidas funcionales. ....	9
2.2.1	Bebidas funcionales a base de lactosuero .....	10
2.3	Lactosuero. ....	10
2.3.1	Propiedades intrínsecas de las proteínas nativas del suero.....	12
2.3.2	Importancia biológica de las proteínas hidrolizadas provenientes del suero	
	18	
2.4	Colágeno.....	19
2.4.1	Estructura del colágeno .....	22
2.5	Colágeno hidrolizado.....	24
2.6	Sistema inmunitario.....	24
2.6.1	Barrera intestinal.....	25
2.6.2	Captación y reconocimiento del antígeno.....	30

2.7	Actividad antioxidante .....	32
2.8	Actividad antihipertensiva.....	34
2.9	Análisis Sensorial .....	37
3	Objetivos e hipótesis .....	39
3.1	Objetivo general .....	39
3.1.1	Objetivos específicos.....	39
3.2	Hipótesis .....	40
4	MATERIALES Y MÉTODOS .....	41
4.1	Obtención e hidrolisis del lactosuero.....	41
4.1.1	Análisis proximal del lactosuero.....	41
4.2	Obtención e hidrólisis del colágeno.....	41
4.3	Peso molecular de los hidrolizados proteicos por SDS-PAGE.....	42
4.4	Formulaciones de la bebida .....	42
4.5	Análisis Bromatológico .....	43
4.6	Determinación de pH.....	43
4.7	Determinación de color .....	43
4.8	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier.....	43
4.9	Análisis Microbiológicos .....	43
4.10	Actividad antioxidante por inhibición de radicales ABTS y DPPH.....	44
4.11	Biodisponibilidad <i>in vitro</i> del colágeno hidrolizado en bebidas.....	45

4.12	Contenido de hidroxiprolina .....	45
4.13	Actividad antihipertensiva <i>in vitro</i> .....	46
4.14	Actividad inmunológica <i>in vivo</i> .....	47
4.15	Evaluación sensorial .....	49
4.16	Análisis estadístico .....	50
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
5.1	Análisis proximal del lactosuero .....	51
5.2	Peso molecular de los hidrolizados proteicos .....	53
5.3	Análisis proximal de las bebidas .....	54
5.4	Determinación de pH.....	56
5.5	Determinación de color .....	57
5.6	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier.....	59
5.7	Análisis microbiológico .....	61
5.8	Actividad antioxidante .....	62
5.9	Biodisponibilidad y determinación de hidroxiprolina .....	66
5.10	Actividad Antihipertensiva .....	68
5.11	Actividad Inmunológica .....	72
5.12	Análisis Sensorial.....	78
6	CONCLUSIONES .....	84
7	BIBLIOGRAFÍA .....	86

8 ANEXOS ..... 102

ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Conversión del procolágeno en colágeno mediante el corte de los propéptidos terminales por las proteinasas N y C del procolágeno. Los intermedios de escisión son el pNcolágeno (que retiene los N-propéptidos) y el pColágeno (que retiene los C-propéptidos). La molécula de colágeno final contiene telopéptidos (ningún péptido Gly-X-Y) que contienen sitios de unión críticos para la formación de fibrillas (Holmes et al., 2018). ..... 23

**Figura 2.** Representación esquemática del sistema inmunitario de la mucosa del tracto gastrointestinal. Las células epiteliales intestinales y la capa mucosa forman una barrera bioquímica y física que mantiene la separación entre el lumen intestinal y el sistema inmunitario de la mucosa. El tejido linfoide asociado al intestino (GALT) está conformado por las placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos que son los principales lugares de inducción de las respuestas inmunitarias mientras que la lámina propia y la capa epitelial se consideran lugares efectores. En conjunto, la barrera epitelial, el tejido linfoide organizado, las células inmunitarias dispersas por la lámina propia y el epitelio forman los componentes primarios del sistema inmunitario intestinal. Célula M: célula microfoldada; CSE: Cúpula subepitelial; CD: Célula dendrítica; PAM: Péptidos antimicrobianos; LsLP: Linfocitos de la lámina propia; IESC: células madre epiteliales intestinales (Ahluwalia et al., 2017). ..... 30

**Figura 3.** Vías potenciales de captación y representación de antígenos (Ahluwalia, Magnusson, & Öhman, 2017)..... 32

**Figura 4.** Gel de poliacrilamida SDS-PAGE de los tratamientos hidrolizados. CH: Colágeno hidrolizado; SH: Suero lácteo hidrolizado; SN: Suero lácteo nativo; CN: Colágeno nativo ..... 54

<b>Figura 5.</b> Espectros de FTIR de los blancos y bebidas. ....	60
<b>Figura 6.</b> Actividad antioxidante de las bebidas a) Inhibición del radical ABTS; b) Inhibición del radical DDPH. Diferentes letras representan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% ( $p \leq 0.05$ ). ANOVA de una sola vía comparación de medias por Tukey. ....	65
<b>Figura 7.</b> Actividad antihipertensiva de las materias primas hidrolizadas y dos formulaciones de bebidas. Diferentes letras representan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% ( $p \leq 0.05$ ). ANOVA de una sola vía comparación de medias por Tukey. ....	71
<b>Figura 8.</b> Activación de células CD4. ....	76
<b>Figura 9.</b> Activación de células CD8. ....	76
<b>Figura 10.</b> Activación de células CD45. ....	77
<b>Figura 11.</b> Relación de las variables físicas de la bebida SC5 y su preferencia. ....	79
<b>Figura 12.</b> Diagrama de dispersión que muestra las variables que condicionan la preferencia de los 85 evaluadores que probaron la bebida CS5. Los valores para las variables que se agrupan en cada componente se incrementan conforme se pasa de la parte negativa a positiva en cada uno de los ejes (X: Prin1, Y: Prin2). ....	80
<b>Figura 13.</b> Relación de las variables físicas de la bebida SC5 y su preferencia. ....	81
<b>Figura 14.</b> Diagrama de dispersión que muestra las variables que condicionan la preferencia de los 85 evaluadores que probaron la bebida CS20. Los valores para las variables que se agrupan en cada componente se incrementan conforme se pasa de la parte negativa a positiva en cada uno de los ejes (X: Prin1, Y: Prin2). ....	82

**Figura 15.** Frecuencia de evaluadores por categorías de preferencia para cada una de las bebidas evaluadas..... 83

ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Aplicaciones y funcionalidad del lactosuero y colágeno..... 3

**Tabla 2.** Comparación de los componentes del suero dulce y suero ácido (Tunick, 2008)..... 11

**Tabla 3.** Composición proteica del suero (Aguero, Bringas, San Roman, Ortiz, & Ibanez, 2017; Fang & Guo, 2019). ..... 13

**Tabla 4.** Tipos de colágeno y sus aplicaciones en la industria o funciones en el cuerpo humano (Avila Rodríguez et al., 2018). ..... 20

**Tabla 5.** Tratamientos con diferentes concentraciones de colágeno hidrolizado. .... 42

**Tabla 6 .** Análisis proximal del lactosuero. .... 52

**Tabla 7** Análisis proximal de los blancos y las bebidas. .... 56

**Tabla 8.** Determinación de pH en las bebidas. .... 57

**Tabla 9** Determinación de color en las bebidas funcionales en la escala de CieLab.59

**Tabla 10.** Análisis microbiológico de las bebidas evaluando la presencia o ausencia de microorganismos indicadores de contaminación (Salmonella spp. E. coli, hongos y levaduras, mesófilos aerobios)..... 62

**Tabla 11** Porcentaje de absorción de hidroxiprolina de las bebidas adicionadas de suero adicionadas con colágeno hidrolizado. Diferentes letras representan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% ( $p \leq 0.05$ ). ANOVA de una sola vía comparación de medias por Tukey. .... 68

**Tabla 12** Peso de timo y bazo de los ratones clasificados en los diferentes grupos. Diferentes letras representan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% ( $p \leq 0.05$ ). ANOVA de una sola vía comparación de medias por Tukey. .... 75

**GLOSARIO**

<b>ABTS:</b>	(2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-sal de diamonio)
<b>ANP:</b>	Péptido natriurético auricular
<b>BSA:</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CATA:</b>	Check-All That Apply
<b>DBO:</b>	Demanda Bioquímica de Oxígeno
<b>DPPH:</b>	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
<b>DQO:</b>	Demanda Química de Oxígeno
<b>ECA:</b>	Enzima Convertidora de Angiotensina
<b>GALT:</b>	Tejido Linfoide Asociado al Intestino
<b>HHL:</b>	Hipuril-L-Histidil-L-Leucina
<b>PAM:</b>	Proteínas antimicrobianas
<b>TROLOX:</b>	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico

# 1 INTRODUCCIÓN

Actualmente algunos alimentos enriquecidos con vitaminas, antioxidantes, minerales o proteínas pueden considerarse funcionales o nutracéuticos. De acuerdo con el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida establece que son aquellos alimentos que tienen un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas en el organismo, mejorando el estado de salud o reduciendo el riesgo de una enfermedad (Rodríguez-Villacis & Hernández-Monzón, 2017). Un ejemplo de alimento funcional son las bebidas elaboradas a base de lactosuero (Armesto, 2015). El lactosuero es el líquido restante después de la elaboración de queso, contiene principalmente componentes solubles: lactosa, sales, proteínas globulares, entre otros (Rocha-Mendoza et al., 2021).

La funcionalidad de las bebidas a base de lactosuero se ve incrementada cuando se incorporan a ellas bacterias probióticas o ingredientes funcionales (Candan, Cebeci, & Ozer, 2016). Las proteínas contenidas en el lactosuero, tienen péptidos con actividad biológica considerados como una de las categorías más importantes dentro de la industria alimentaria. Estos péptidos poseen actividades funcionales como: antioxidante, antimicrobiana, antihipertensivo, anticancerígenas, opioides e inmunomoduladoras (Dullius, Goettert, & de Souza, 2018).

Uno de los ingredientes de importancia en la industria alimentaria es el colágeno hidrolizado, el cual es un conjunto de péptidos que se obtiene por la proteólisis del colágeno nativo. Los péptidos de colágeno pueden ser obtenidos de diversas fuentes marinas, cerdos, bovinos y ovinos; presentan actividad antioxidante, antimicrobiana y

antihipertensiva, por lo que pueden ser catalogados como ingredientes funcionales (Hernández & Gómez González, 2016).

### **1.1 Antecedentes**

Las proteínas son macronutrientes importantes como fuente de aminoácidos esenciales y energía. Además de la nutrición básica, algunas proteínas alimentarias pueden proporcionar beneficios adicionales para la salud mediante la liberación de péptidos bioactivos codificados en sus secuencias (He et al., 2018). De manera general, los péptidos bioactivos son oligopéptidos que están inactivos dentro de la secuencia de la molécula proteica, pero que pueden ser liberados por hidrólisis enzimática, fermentación y digestión gastrointestinal (Chalamaiah, Yu, & Wu, 2018).

Los hidrolizados de proteínas se utilizan en una amplia gama de matrices alimentarias como lácteos, productos para la carne, bebidas, complementos alimenticios o funcionales, debido a su validez nutricional, sus actividades funcionales o rentabilidad; también se han utilizado para sustituir a otras proteínas o para mejorar las propiedades de muchos productos alimenticios (Skrzypczak et al., 2020). Por otra parte, el colágeno hidrolizado puede ser utilizado como ingrediente en alimentos funcionales, ya que mejora las propiedades nutricionales y funcionales sin afectar el producto debido a su baja viscosidad y alta solubilidad en agua, como es el caso de las bebidas (Bilek & Bayram, 2015). Los productos como las bebidas a base de lactosuero de leche se consideran convenientes por su alto valor nutritivo y fácil digestión asociada a los hidrolizados; también por sus propiedades funcionales como se describen a continuación en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Aplicaciones y funcionalidad del lactosuero y colágeno.

<b>Producto</b>	<b>Funcionalidad</b>	<b>Referencia</b>
Suplemento alimenticio de lactosuero de leche en mujeres pos-menopáusicas	Incremento de masa muscular y fuerza	(Weisgarber, Candow, & Farthing, 2015)
Bebida de suero de leche con sabor a frambuesa	Actividad antioxidante e inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)	(Ferreira et al., 2019)
Bebida a base de proteínas de lactosuero de leche	Actividad antioxidante y antimicrobiana, sin modificar propiedades fisicoquímicas.	(Arranz et al., 2019)
Suplemento de lactosuero hidrolizado	Mejora la recuperación de la función muscular y flexibilidad	(Brown, Stevenson, & Howatson, 2018)
Bebida fermentada a base de lactosuero de leche suplementada con colágeno hidrolizado	Actividad antioxidante, mejorando viscosidad y la biodisponibilidad de compuestos, sin modificar el color	(Arely León-López, Pérez-Marroquín, Campos-Lozada, Campos-Montiel, & Aguirre-Álvarez, 2020)
Bebida de colágeno de pescado antienvjecimiento	Actividad antioxidante, mejoró el plegado de proteínas y la reparación del ADN en los fibroblastos de la piel humana	(Lin et al., 2020)
Extracto de curcuminoides, colágeno hidrolizado y extracto de té verde	Inhibición de la síntesis de mediadores inflamatorios y catabólicos por parte de condrocitos bovinos normales y humanos osteoartríticos	(Comblain et al., 2015)

### 1.2 Justificación

En la región del Valle de Tulancingo, Hidalgo se producen alrededor de 17 millones de litros de leche de los cuales el 65 % es utilizado para la elaboración de diferentes tipos de quesos. Este proceso agroindustrial genera un subproducto contaminante para el medio ambiente en virtud de que en 10 L de leche solo se obtiene 1 kg de queso y 9 L de lactosuero el cual se vierte a los drenajes de manera directa generando una gran fuente contaminación. Por otro lado, se tiene el conocimiento que la producción en el año 2020 de carne de canal de ovino en Hidalgo alcanzo 6,736 toneladas de acuerdo con los estadísticos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP; 2020), gran parte de esta producción se destina para la elaboración de un platillo típico denominado barbacoa. Ante la secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural (SENASICA) se tiene registro de un centro de rastro ubicado en Tulancingo, Hidalgo. Sin embargo, existen muchos rastros que no están registrados haciendo que el número de matanzas de ovino incremente, elevando la contaminación que se genera por los desechos de pieles de los animales. La piel de ovinos tiene el 29% de su peso en proteína, llamada colágeno el cual es de gran importancia para diferentes sectores de la industria como la alimentaria, cosmética o farmacéutica.

El presente trabajo tiene por objetivo aportar una posible solución a la problemática generada por la contaminación de estos desechos al considerarlos como materia prima para el desarrollo de una bebida funcional, mediante el aprovechamiento de materia prima como el lactosuero generado en la producción de diversos tipos de quesos. Así, el colágeno presente en la piel de los ovinos utilizados para la elaboración de barbacoa puede ser aprovechado en la región para el desarrollo de una bebida funcional.

### 1.3 Planteamiento del problema

Un estudio realizado por la Asociación Ganadera Local en Tulancingo, Hidalgo, en el 2020 se reportó que diario se procesan 600, 000 L de leche al día para la elaboración de diferentes quesos como botanero, panela, manchego, entre otros. De acuerdo con Osorio-González et al., (2018) se estima que por cada kilogramo de queso se producen de 8 a 9 litros de lactosuero, en este sentido aproximadamente se generan 540,000 L diarios de este subproducto que, al no ser un producto de interés es desechado a mantos acuíferos o al suelo, provocando una alta demanda química de oxígeno (DQO) de 60 a 80 g/L y una demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de 30-50 g/L para llevar a cabo su degradación. La descarga continua de lactosuero sin tratamiento previo, a los cuerpos de agua, causa un rápido consumo de oxígeno lo que produce eutrofización, acidificación, alcalinización o salinización del suelo, generando con ello malos olores y salinización (Osorio-González et al., 2018).

Por otro lado se tiene conocimiento que la ovinocultura en el Valle de Tulancingo ocupa un lugar importante en el sector económico ya que de acuerdo a la Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) en Hidalgo, se tiene registro de una producción de 1, 206, 673 cabezas anuales de ovino, de los cuales más de 7,000 toneladas de carne en canal, lo que representa un valor superior a 500 millones de pesos en la producción, colocando al estado de Hidalgo como el segundo productor de ovinos a nivel nacional y gran parte de esta producción se destina para la elaboración del platillo típico “barbacoa”. En el año 2018 se realizaron 405 sacrificios de ovinos en rastros registrados en el estado de Hidalgo, sin embargo, existen rastros sin registro provocando que el número aumente considerablemente. Si bien la carne es utilizada para consumo humano, en ocasiones la piel puede adquirir importante valor

económico una vez procesada en la industria del curtido, pero las pieles de ovino que no cumplen con los estándares solicitados para su comercio son desechadas generando un problema de contaminación (SIAP, 2019). Se considera que del total de la piel el 29% es proteína la cual puede ser aprovechada en la industria alimentaria, farmacéutica o cosmética.

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 Alimentos funcionales.

Hoy en día, debido a las exigencias del desarrollo sostenible de las sociedades donde se considera el medio ambiente, salud y economía, el diseño de los alimentos ha pasado del diseño clásico basado en el enfoque de la ingeniería directa cuando los alimentos se fabricaban en función de la tecnología y las materias primas, situando al consumidor al final de la cadena alimentaria, a un diseño moderno fundamentado en la ingeniería inversa, en el que la etapa inicial son las preferencias del consumidor y la “anamnesis” de los alimentos requeridos por el consumidor (Hariram, Mekha, Suganthan, & Sudhakar, 2023). El empleo de la ingeniería inversa tiene en cuenta los siguientes aspectos: la realización de una evaluación nutricional, sensorial y funcional de los productos alimenticios de acuerdo a los requisitos del consumidor, la selección de los bioactivos objetivos y los sistemas de administración, la matriz alimentaria, la elección del método de envasado, el impacto en el medio ambiente, y la comprobación de la biodisponibilidad de los nutraceuticos incorporados en los alimentos (Thomopoulos et al., 2019). Los consumidores son conscientes del papel que desempeñan los alimentos funcionales, los alimentos para usos nutricionales particulares o los alimentos medicos que intervienen en la prevención y el tratamiento de ciertas enfermedades (Dima, Assadpour, Dima, & Jafari, 2020). Se considera que los alimentos funcionales deben cubrir ciertos parámetros tales como mejorar la función objetivo, ayudar a prevenir la aparición de enfermedades, mientras que la naturaleza de los alimentos debe seguir siendo un alimento tradicional. El nivel de la

función debe ir más allá de su función nutricional básica y los patrones de consumo deben ser los de la dieta habitual (Nazir et al., 2019).

Recientemente, Granato et al., (2017) definieron los alimentos funcionales como alimentos procesados industrialmente o naturales que, cuando se consumen regularmente dentro de una dieta diversa en niveles eficaces, tienen efectos potencialmente positivos en la salud más allá de la nutrición básica. Además de su valor nutricional como alimento convencional, los alimentos funcionales ayudan a promover condiciones óptimas de salud y pueden reducir riesgos de una o más enfermedades no transmisibles, como dislipidemia, cáncer, diabetes tipo 2, accidentes cerebrovasculares y enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, para ser funcional debe ser validado en ensayos de intervención para cumplir con las regulaciones de cada país, por ejemplo, la Agencia Brasileña de Regulación Sanitaria (ANVISA) en Brasil, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en la Unión Europea y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), en los Estados Unidos (Granato et al., 2020).

Actualmente la categoría alimentos funcionales más activa es la de las bebidas, debido a diversos factores como: a) la facilidad de suministro y almacenamiento de productos estables en el tiempo de refrigeración; b) mayor disponibilidad de incorporar componentes bioactivos y nutrientes deseables y c) la posibilidad y conveniencia de satisfacer las demandas de los consumidores en cuanto a la apariencia, el tamaño, la forma y el contenido del envase (Nazir et al., 2019). Otro factor que actualmente está dando forma al mercado de las bebidas funcionales es el creciente interés de los consumidores por los ingredientes orgánicos en los alimentos y la creciente desconfianza en ingredientes artificiales, incluidos los colorantes y edulcorantes

artificiales. Esta tendencia en el comportamiento de los consumidores ofrece oportunidades a los fabricantes para que sus productos se diferencien de los de la competencia mediante la adición de ingredientes naturales comprobando los beneficios que otorgan a la salud (Maleš et al., 2022).

### **2.2 Bebidas funcionales.**

Entre los diferentes tipos de alimentos funcionales disponibles en el mercado, las bebidas son las más populares debido a que satisfacen fácilmente las demandas de los consumidores en cuanto a tamaño, forma, almacenamiento y posibilidad de contener nutrientes deseables y sustancias bioactivas (S. Kumar, Dhir, Talwar, Chakraborty, & Kaur, 2021). En las últimas décadas, el mercado de las bebidas funcionales ha desarrollado un número creciente de productos, estimados en millones de dólares que destacan por sus características distintivas, como mejorar la salud intestinal o cardiovascular, ayudar al sistema inmune, controlar el peso o para contrarrestar los procesos de envejecimiento (Orrù et al., 2018). De acuerdo con Corvo et al., (2014) clasifican a las bebidas funcionales en tres categorías:

- (i) Bebidas lácteas incluidos los probióticos y bebidas enriquecidas con minerales: contienen varios componentes, además de los básicos, como péptidos, oligosacáridos, enzimas, vitaminas y minerales. Estos componentes pueden cumplir con funciones benéficas para la salud (Mudgil & Barak, 2019).
- (ii) Bebidas de vegetales y de frutas: debido a su potencial bioactivo de las antocianinas, flavonoides, epicatequinas, flavononas, procianidinas, lignanos, carotenoides, fibra soluble e insoluble, isotiocianatos, ácidos

fenólicos, vitaminas C, E, A provenientes de la fruta y verdura (Dey & Sireswar, 2021).

- (iii) Bebidas deportivas y energéticas: Desempeñan un papel importante en la hidratación, en la mejora del rendimiento deportivo y en la prevención o ayuda de condiciones de salud específica. La función principal de estas bebidas es hidratar a los atletas y restaurar los electrolitos, carbohidratos y otros nutrientes que pueden agotarse durante el ejercicio (Corbo et al., 2014).

### **2.2.1 *Bebidas funcionales a base de lactosuero***

La transformación del lactosuero de leche en bebidas tiene dos objetivos principales: la utilización de un gran volumen de lactosuero para ayudar a resolver problemas de contaminación y el desarrollo de bebidas funcionales que otorgan beneficios para la salud (Cong, Bremer, & Miroso, 2020). También son importantes desde el punto de vista nutricional para los deportistas y los culturistas, concediendo mayor resistencia, crecimiento o desarrollo muscular. Su funcionalidad puede incrementarse mediante la incorporación de ingredientes bioactivos como probióticos, fibra dietética, vitaminas o minerales (Mudgil & Barak, 2019).

### **2.3 Lactosuero.**

El lactosuero es un líquido transparente de color amarillento a verdoso que se obtiene tras la coagulación de la leche durante el proceso de elaboración del queso. El líquido del lactosuero representa aproximadamente del 85-95% del volumen de la leche y contiene más del 55% de los nutrientes de la leche, como los minerales, las proteínas del lactosuero y la lactosa (M. Guo, 2019; Kaminarides, Zagari, & Zoidou, 2020). En

función del pH, el lactosuero puede clasificarse como lactosuero ácido (pH<5) y lactosuero dulce (pH 6-7) (Tallapragada & Rayavarapu, 2019). El lactosuero dulce y el lactosuero ácido se obtienen si la coagulación de la leche se ha llevado a cabo por acción enzimática (cuajo) o por adición de ácidos, respectivamente (Abd AL-Razaq, 2019; Shenana, El-Alfy, El-Nagar, & El-Barbary, 2020). Los nutrientes más abundantes en el lactosuero son: lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales (Tabla 2). También hay presencia de algunas sales neutras como NaCl, KCl, sales de calcio (principalmente fosfato), ácidos láctico y cítrico, vitaminas del grupo B, compuestos nitrogenados no proteicos como la urea y el ácido úrico (Smithers, 2008).

**Tabla 2.** Comparación de los componentes del lactosuero dulce y lactosuero ácido (Tunick, 2008).

<b>Características</b>	<b>Suero dulce</b>	<b>Suero ácido</b>
pH	>5.6	<5.6
Agua	93-94%	94-95%
Proteína (g/L)	6-10	6-8
Lactosa (g/L)	46-52	44-46
Minerales (g/L)	2.5-4.7	4.3-7.2
Obtenido por	Acción enzimática	Ácidos orgánicos

Lamentablemente, sólo el 50% del lactosuero producido en el mundo se utiliza para formular productos y el resto es vertido en las aguas superficiales o se destina como alimento para ganado. Es una de las fuentes de subproductos alimentarios más contaminantes, su demanda bioquímica de oxígeno (DBO) es de 435,000 ppm y su

demanda química de oxígeno (DQO) es de 460,000 ppm (Khedkar & Singh, 2018). El continuo crecimiento de la industria quesera, la necesidad de maximizar el rendimiento de la materia prima y de reducir los contaminantes en el efluente, han animado a los productores e investigadores a buscar nuevas formas de utilizar el lactosuero de leche, por lo que se han llevado a cabo numerosas investigaciones para convertir este pasivo en un activo (Arsić et al., 2018; Arely León-López et al., 2020; Prazeres, Carvalho, & Rivas, 2012). El gran valor nutricional del lactosuero de leche potencia los beneficios nutracéuticos reduciendo la aterosclerosis, la obesidad, la diabetes y el riesgo de cáncer además la presencia de aminoácidos azufrados en el lactosuero actúan como agentes de prevención del cáncer como precursores del fuerte refuerzo intracelular del glutatión y en el metabolismo del carbono. El lactosuero de leche se utiliza en alimentación funcional ya que puede contribuir a la regulación del peso corporal al proporcionar señales de saciedad que repercuten en la regulación de ingesta de alimentos a corto y largo plazo (Król, Brodziak, Zaborska, & Litwińczuk, 2017).

### ***2.3.1 Propiedades intrínsecas de las proteínas nativas del lactosuero***

El lactosuero de leche se considera una valiosa fuente de numerosos compuestos nutricionales, funcionales y bioactivos; presenta un elevado contenido de lactosa y proteínas que pueden utilizarse para producir ingredientes con beneficios versátiles (Kareb & Aïder, 2019); se considera un producto valioso por sus proteínas solubles y sus altos niveles de aminoácidos, lactosa, sal y vitaminas B, de las cuales contiene un 55-75% y un 40-70% de vitamina B6 y vitamina B12 respectivamente (S. Singh, P. Khemariya, & A. Rai, 2014). También contiene tiamina, ácido nicotínico, ácido fólico y ácido ascórbico, riboflavina y biotina. Sin embargo, una mayor concentración de

vitamina B12 se desplaza en el lactosuero durante el tratamiento enzimático en comparación con la coagulación ácida (Sudhir Singh, Priti Khemariya, & Ashutosh Rai, 2014). Las proteínas del lactosuero presentan un alto contenido de aminoácidos esenciales y ramificados como la isoleucina, leucina y valina desempeñan un papel importante como regulador de diferentes funciones metabólicas, de la homeostasis de la glucosa en sangre y como fuente equilibrada de los aminoácidos que contienen azufre (Ramos et al., 2016). Minerales como el calcio, magnesio, fósforo y trazas de zinc están presentes en el lactosuero y pueden actuar como base de electrolitos (Deeth & Bansal, 2019; R. Kumar, Chauhan, Shinde, Subramanian, & Nadanasabapathi, 2018). El lactosuero de leche contiene varias proteínas (Tabla 3), que le confieren características funcionales, fisiológicas y nutracéuticas específicas, como se describe a continuación.

**Tabla 3.** Composición proteica del lactosuero (Aguero, Bringas, San Roman, Ortiz, & Ibanez, 2017; Fang & Guo, 2019).

<b>Proteína</b>	<b>Contenido (g/L)</b>
β-lactoglobulina	2.9
α-lactoalbúmina	0.6
Inmunoglobulina	0.3
Albumina de suero	0.6
Lactoferrina	0.1
Lactoperoxidasa	0.03
Proteosa-peptona	1
Glicomacropéptidos (GMP)	0.9

### 2.3.1.1 *β-lactoglobulina*

La  $\beta$ -lactoglobulina es la principal proteína del lactosuero, pertenece a las proteínas coagulables por calor y representa aproximadamente el 50% de la proteína total y 10% de la proteína de la leche. Su peso molecular oscila entre 18.20 kDa y 8.36 kDa; se presenta como un dímero de dos subunidades idénticas formadas por un grupo sulfhidrilo y dos enlaces disulfuro, compuestas por una cadena peptídica de 162 aminoácidos. La solubilidad de esta proteína depende del pH y la fuerza iónica y su desnaturalización por calor se produce entre 70-75 °C (Yadav et al., 2015). Tradicionalmente, la  $\beta$ -lactoglobulina se separa por precipitación fraccionada con sulfato de amonio con o sin calentamiento para provocar la precipitación de todas las proteínas el lactosuero que no sea la  $\beta$ -lactoglobulina; aunque también existen métodos cromatográficos como el intercambio iónico (Schlatterer, Baeker, & Schlatterer, 2004).

Esta proteína es un importante nutriente activo natural, presenta una fuerte sensibilidad al calor y desempeña un papel importante en la industria láctea no sólo como índice de intensidad de tratamiento térmico de la leche, sino también como proteína marcadora de los alérgenos de la leche en los alimentos. La  $\beta$ -lactoglobulina ha sido elegida como un buen ingrediente en las dietas destinadas a prevenir o mejorar enfermedades metabólicas como la obesidad, ya que disminuye el apetito y aumenta la saciedad a través de varios mecanismos, como la regulación de las hormonas y la alteración de la gluconeogénesis hepática (Boscaini et al., 2020; Jakubowicz et al., 2017).

#### 2.3.1.2 *α-lactoalbúmina*

Representa el 11% del total de las proteínas del lactosuero, tiene una alta afinidad con el calcio y una excelente fuente de aminoácidos esenciales representados principalmente por presentar triptófano y cisteína. Esta proteína puede considerarse como homóloga de la  $\alpha$ -lactoalbúmina humana porque es análoga en un 72% respecto a su estructura; sin embargo, en la leche humana no hay  $\beta$ -lactoglobulina, que es la causa de las reacciones alérgicas (El-Agamy, 2011). El peso molecular de la  $\alpha$ -lactoalbúmina es de 14 kDa aproximadamente, está compuesta por 123 polipéptidos que contienen 8 residuos de cisteína y muestra algunos beneficios como aumentar los niveles de triptófano en el plasma, lo que conduce a un mejor rendimiento cognitivo, una buena oxidación de los lípidos, una mejor absorción de los minerales, actividad antibacteriana, efectos inmunomoduladores y actividad antitumoral (Jiang et al., 2020).

#### 2.3.1.3 *Inmunoglobulinas (Ig)*

Son las proteínas más importantes del lactosuero de la leche y representan el 2% del total de proteínas del lactosuero. Estas proteínas se componen de tres clases principales: las inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM. Algunas de sus funciones son encapsular bacterias, neutralizar toxinas e inactivar virus, además de favorecer la digestión gástrica, disminuir la presión arterial al reducir los niveles de colesterol y se utilizan en fórmulas lácteas para niños como sustitutos de la leche (Yadav et al., 2015).

#### 2.3.1.4 *Albúmina sérica bovina (BSA)*

La BSA representa aproximadamente del 5-6% del total de las proteínas del lactosuero, su peso molecular oscila entre 66.26 y 66.5 kDa. Su temperatura de desnaturalización es de  $>65^{\circ}\text{C}$  además, es una fuente aminoácidos esenciales. La

funcionalidad de estas proteínas ha sido reportada para el potencial inhibidor de las células de cáncer de mama humano, la actividad agonista opioide y la propiedad antihipertensiva (Koh, Lee, Ramachandraiah, & Hong, 2019).

#### *2.3.1.5 Lactoferrina*

Es una glicoproteína que se une al hierro, pertenece a la familia de las proteínas de transferencia y se encuentra generalmente en las secreciones exocrinas de la leche, las lágrimas, el moco y la saliva de los mamíferos (B. Wang, Timilsena, Blanch, & Adhikari, 2017). Tiene un peso molecular de 80 kDa y un punto isoeléctrico de 9.5-10. Se compone de una cadena polipeptídica única de 700 aminoácidos, la cual puede contener una o dos cadenas de carbohidratos, las moléculas de lactoferrina son termoestables y resistentes a los ácidos a pH 4; también es resistente a la acción de la tripsina y la quimotripsina pero puede ser hidrolizada con pepsina (Q. Wang, Chen, & Kentish, 2020). Su capacidad para ligar el hierro genera diversas funciones biológicas como la inhibición del crecimiento de bacterias y hongos, promotor de ciertas líneas celulares, prevención de peroxidación lipídica y buena absorción del hierro en el organismo. Sus aplicaciones incluyen suplementos para la salud, alimentos, bebidas funcionales, fórmulas infantiles, cosméticos y productos para el cuidado bucal (Q. Wang et al., 2020).

#### *2.3.1.6 Lactoperoxidasa*

Es una cadena polipeptídica única con 612 aminoácidos con un peso molecular de 78 kDa. Desempeña un papel importante en la protección de la glándula mamaria del lactante y del tracto intestinal de los neonatos contra microorganismos patógenos; puede utilizarse en combinación con otros materiales para la producción de películas

para el envasado de alimentos. Además, participa en la degradación de ciertos carcinógenos y en la protección de las células animales contra los efectos peroxidativos. Todas estas propiedades funcionales permiten utilizar esta enzima en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y agrícola (Shokri & Ehsani, 2017; Urtasun et al., 2017).

#### *2.3.1.7 Proteasa-peptona*

Se define como una mezcla heterogénea de proteínas del lactosuero; es termoestable y soluble a valores de pH ácidos. Puede separarse mediante tratamiento térmico y ajuste del pH a 4.6. La industria alimentaria está interesada en ella porque ha demostrado una buena actividad emulsionante y además, presenta excelentes propiedades de formación de espuma (Hogenboom, Rosi, & Monti, 2020) (Karamoko, Renaville, & Blecker, 2016).

#### *2.3.1.8 Glicomacropéptidos*

Es un péptido soluble de 64 aminoácidos, su peso molecular es de 6.8 kDa y es la forma glicosilada del macropéptido de la caseína. Contiene cantidades variables de oligosacáridos, principalmente galactosamina, galactosa y ácido siálico, está disponible como ingrediente para su aplicación en alimentos, bebidas, cosméticos, suplementos funcionales y medicinales también se asocia con beneficios biológicos y actividades antiinfecciosas y antioxidantes (Chungchunlam, Henare, Ganesh, & Moughan, 2014).

### ***2.3.2 Importancia biológica de las proteínas hidrolizadas provenientes del lactosuero***

La valorización de un residuo puede definirse como un proceso que transforma el residuo por métodos físicos, térmicos, químicos o biológicos para crear productos que puedan incorporarse a las cadenas de producción, como parte de la economía circular (Wainaina et al., 2020). La valorización del lactosuero de leche se centra en la concentración de la lactosa, las proteínas o cualquier otro nutriente presente en el lactosuero, transformándolos en nuevos compuestos de valor añadido (Sebastián-Nicolás et al., 2020; Valdez Castillo et al., 2020). Se han desarrollado varias tecnologías de proceso y enfoques biotecnológicos para convertir este subproducto en un recurso de componentes valiosos (Lappa et al., 2019). Se han extraído algunos compuestos de valor añadido del lactosuero mediante diferentes procesos (enzimáticos, microbianos, térmicos y otros), como los galacto-oligosacáridos probióticos, los ésteres de ácidos grasos de la lactosa, los biocolorantes y compuestos aromáticos y la celulosa bacteriana (Granato et al., 2017)

Se sabe que la dieta es uno de los factores que influyen en la salud humana y en el desarrollo de enfermedades. Las proteínas son un nutriente muy importante en los alimentos y pueden hidrolizarse en una amplia gama de péptidos durante la digestión gastrointestinal (Singh, Kaur, & Katyal, 2023). Algunos de estos péptidos comparten características que actúan en el organismo como hormonas, neurotransmisores o péptidos reguladores (Hernández-Ledesma, García-Nebot, Fernández-Tomé, Amigo, & Recio, 2014). La importancia de los péptidos de la proteína del lactosuero está asociada a sus propiedades funcionales, algunos estudios han demostrado la acción de estos péptidos como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)

en la regulación de la presión sanguínea (Abadía-García, Castaño-Tostado, Cardador-Martínez, Martín-del-Campo, & Amaya-Llano, 2021). En la industria la alimentaria, los péptidos de proteína de lactosuero presentan actividades antimicrobianas y antioxidantes, así como propiedades emulsionantes. Todas las propiedades funcionales de los hidrolizados de proteínas de lactosuero están relacionadas con el peso molecular. Estas propiedades se encuentran en estado latente durante la formación del complejo de la estructura proteica y sólo se activan cuando esa estructura se rompe o se hidroliza por diferentes métodos como la enzimática, la hidrólisis química y mediante la aplicación de tecnologías emergentes como ultrasonidos y los tratamientos térmicos (Dullius, Fassina, Girolodi, Goettert, & Volken de Souza, 2020; Heo et al., 2018; Lee & Hur, 2017).

## **2.4 Colágeno**

El colágeno es una de las proteínas más abundantes producidas en el cuerpo humano, es responsable de la estabilidad y resistencia de los tejidos del cuerpo al crear redes de soporte a lo largo de las estructuras celulares (Avila Rodríguez, Rodríguez Barroso, & Sánchez, 2018). Como principal componente de los tejidos blandos y duros, el colágeno es la proteína más común en los mamíferos, representando aproximadamente un tercio de la masa de tejido proteico del cuerpo, distribuido en varios tejidos, como los huesos, la piel, los tendones y los dientes (Hong, Fan, Chalamaiah, & Wu, 2019). Hasta ahora se han identificado 28 tipos de colágeno y cada uno tiene diversas aplicaciones las cuales se enumeran en la Tabla 4. El contenido de colágeno tipo I es el más abundante en la matriz extracelular, especialmente en los

tendones y los huesos (Kamoun, Kenawy, & Chen, 2017). Los distintos tipos de colágeno tienen estructuras similares; específicamente, hay tres cadenas entrelazadas (cadenas  $\alpha$ -polipéptidos) con homotrimeros o heterotrimeros (Amirrah et al., 2022). Estas estructuras están determinadas por el tipo de colágeno, donde cada cadena tiene una conformación similar a la de la polialanina II. La composición de triple hélice resulta del triplete repetitivo Gly-X-Y, donde X suele ser una prolina (o cualquier otro aminoácido) e Y suele ser hidroxiprolina (Seo, Lee, & Zuckermann, 2011). La glicina es necesaria en una de cada tres posiciones debido a su pequeño volumen, capturando el espacio limitado del centro de la triple hélice (Li et al., 2021).

**Tabla 4.** Tipos de colágeno y sus aplicaciones en la industria o funciones en el cuerpo humano (Avila Rodríguez et al., 2018).

Familia	Tipo	Distribución en los tejidos	Aplicación / Función
Formador de fibrillas	I	Tendones, ligamentos, huesos y córnea	Membranas para la regeneración de tejidos.
	II	Pulmón, córnea, fibras reticulares, cartílago, núcleo pulposo, hueso, cuerpo vítreo y piel.	Reparación del cartílago y tratamiento de artritis.
	III		Hemostáticos y selladores de tejidos.
	V		Materia prima como biomaterial en el tratamiento de córnea.
	XI	Cuerpo vítreo y cartílago	Desarrollo de anticuerpos monoclonales (mAbs) para la osteoartritis.
Membranas basales	IV	Membrana basal	Potenciador de la fijación del cultivo celular e indicador de nefropatía diabética.
Microfibrilar	VI	Dermis, placenta, pulmones, cartílago y disco intervertebral.	
	VII		

Fibrillas de anclaje		Mucosa oral, cérvix, uniones dérmicas y epidérmicas, piel.	Procesos hemostáticos.
Colágeno asociado a fibrillas con triple hélice interrumpida (CAFTI)	IX		Inyección subdérmica como tratamiento de la epidermolisis
	XII	Córnea, cartílago y humor vítreo.	ampollosa distrófica (EAD).
	XIV	Tendón, ligamentos y pericondrio.	Está co-distribuido con el tipo II en cartílago y cuerpo vítreo.
	XIX	Placenta, pared del vaso, hígado, dermis y pulmones.	Asociado al colágeno I, colágeno XIV y también a regular el diámetro fibrilar en las etapas tempranas de la fibrilogénesis.
	XX	Rabdomiosarcoma humano.	Se localiza en la zona de la membrana basal y muestra propiedades antiangiogénicas y antitumorales.
	XXI	Piel embrionaria, tendones, epitelio corneal y cartílago del esternón.	Similar a los tipos XII y XIV. Su función es poco conocida.
	XXIII	Pared del vaso sanguíneo.	Estrechamente relacionado con los colágenos XII, XIV y XX. Contribuye al ensamblaje de la matriz de la red vascular durante la formación de vasos sanguíneos.
Transmembrana	XVII	Folículo del cabello, intestino, hígado, uniones dérmicas y epidérmicas, epidermis y pulmones.	Afecta la formación de hueso e interviene en la inflamación y la vasculogénesis.
Multiplexinas	XV	Uniones dérmicas y epidérmicas.	Estabiliza la adhesión de las células epiteliales a la matriz extracelular circundante.
	XVI		Contribuye en la formación de los dientes.

---

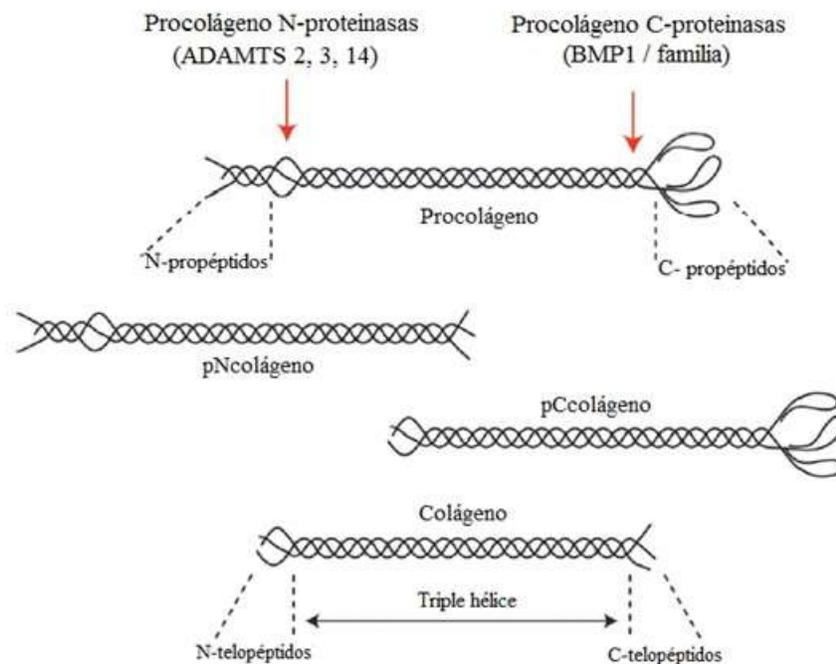
XVIII	Riñón, musculares fibroblastos y páncreas.	células lisas,	Forma un puente que une grandes fibrillas en banda, probablemente fibrillas que contienen colágeno I y III. Puede utilizarse como diana farmacológica o biomarcador. Tiene importancia en la determinación estructural de la retina y en el cierre del tubo neural.
	Queratinocitos fibroblastos.	y	
	Páncreas y pulmones.		

---

#### **2.4.1 Estructura del colágeno**

El colágeno está conformado por tres cadenas  $\alpha$  entrelazadas denominada triple hélice de colágeno y es una repetición casi continua de Gly-X-Y donde el aminoácido glicina ocupa aproximadamente 33% de su composición, X es principalmente prolina e Y es hidroxiprolina juntos constituyen alrededor del 22%. El 45% restante se distribuye en las posiciones X e Y, los cuales son responsables de limitar la rotación del esqueleto peptídico contribuyendo a la estabilidad de la molécula. Las tres cadenas entrelazadas forman la súper hélice, la cual representa la estructura del colágeno conocida como estructura cuaternaria (A. Holwerda & van Loon, 2022). Dicha hélice es muy estable debido a los enlaces de hidrógeno intermoleculares entre la glicina de las cadenas adyacentes, está formada por una región triple helicoidal y dos regiones no helicoidales en cada extremo de la estructura helicoidal con  $\approx 300$  kDa de peso molecular, 280 nm de longitud y 1.4 nm de diámetro (A León-López et al., 2019).

Todos los tipos de colágeno, participan en ensamblajes de orden superior incluyendo redes, filamentos, microfibrillas o fibrillas. Los colágenos que se ensamblan en fibrillas incluyen los tipos I, II, III, V, XI, XXIV y XXVII. Las fibrillas son el principal elemento de tracción y forman la base mecánica de las estructuras óseas, cartilaginosas, fibrosas y tubulares (Salvatore et al., 2021). Los colágenos fibrilares se sintetizan como moléculas precursoras solubles de procolágeno que contienen “propéptidos” globulares en cada extremo de la triple hélice. Estos son eliminados proteolíticamente por las proteinasas N y C del procolágeno para producir colágeno (Figura 1) (A. M. Holwerda et al., 2017). Los colágenos finalmente procesados tienen triples hélices ininterrumpidas de 300 nm de longitud flanqueadas por “telopéptidos” cortos que contienen sitios de unión para el ensamblaje de las fibrillas de colágeno (Holmes, Lu, Starborg, & Kadler, 2018).



**Figura 1.** Conversión del procolágeno en colágeno mediante el corte de los propéptidos terminales por las proteinasas N y C del procolágeno. Los intermedios de escisión son el pNcolágeno (que retiene los N-propéptidos) y el pCcolágeno (que retiene

los C-propéptidos). La molécula de colágeno final contiene telopéptidos (ningún péptido Gly-X-Y) que contienen sitios de unión críticos para la formación de fibrillas (Holmes et al., 2018).

## **2.5 Colágeno hidrolizado**

El colágeno hidrolizado (CH) son proteínas segmentadas de bajo peso molecular entre 1 kDa y 10 kDa, se obtiene mediante la desnaturalización del colágeno nativo seguido de un proceso enzimático que rompe las cadenas de proteínas en pequeños péptidos escindiendo la proteína en enlaces amídicos específicos. El uso de péptidos naturales como los hidrolizados de colágeno ha sido ampliamente utilizado debido a su excelente biocompatibilidad, fácil degradación y débil antigenicidad (Aguirre-Cruz, León-López, Cruz-Gómez, Jiménez-Alvarado, & Aguirre-Álvarez, 2020).

El colágeno hidrolizado se ha utilizado en complementos alimenticios y en la industria farmacéutica porque muchos estudios clínicos han demostrado sus beneficios, como la biodisponibilidad, la rápida absorción en el tracto digestivo, el paso al torrente sanguíneo en forma de pequeños péptidos y la acumulación en la piel 96 h después de la ingestión (A. Holwerda & van Loon, 2022). Con un bajo peso molecular y una rápida absorción, los péptidos de colágeno se distribuyen en diferentes tejidos como la piel, donde se ha demostrado la eficacia y beneficio de los péptidos (Lupu, Gradisteanu Pircalabioru, Chifiriuc, Albulescu, & Tanase, 2020).

## **2.6 Sistema inmunitario**

El sistema inmunitario no sólo protege al organismo contra los peligros del mundo exterior (bacterias, virus, parásitos y hongos), sino que también mantiene la tolerancia o controla la integridad celular detectando las células estresadas y malignas (Nicholson, 2016). Una característica clave del sistema inmunitario es la memoria

inmunológica, es decir, la capacidad de responder rápidamente con mayor intensidad ante un segundo desafío con el mismo antígeno. El sistema inmunitario está compuesto por una multitud de células y factores que son importantes para lograr una respuesta inmune específica, los componentes de este sistema se han clasificado como innatos y adaptativos. La rama adaptativa comprende: linfocitos B, que producen anticuerpos (inmunoglobulinas) y los linfocitos T, que son células efectoras específicas de la inmunidad celular. Las células del sistema inmunitario innato, incluye granulocitos, monocitos/ macrófagos, células linfoides innatas (CLI) y células asesinas (NK), no expresen receptores específicos de antígenos como las células T y B, sino, que expresan una cantidad considerable de receptores activadores e inhibidores que rigen su actividad funcional (Hillion et al., 2020). La activación entre las células inmunitarias y su activación, migración, proliferación y diferenciación está en función por una amplia gama de citoquinas, incluidas interleucinas y las quimiocinas ver Figura 2 (Bhat & Kabelitz, 2020).

### ***2.6.1 Barrera intestinal***

La superficie de la mucosa intestinal está revestida de células epiteliales, que separan físicamente la luz intestinal del medio interno, evitando así el paso de sustancias potencialmente nocivas y manteniendo la absorción de nutrientes y electrolitos (Di Tommaso, Gasbarrini, & Ponziani, 2021). Es considerada un eficaz sistema defensivo en que intervienen elementos intra y extracelulares, que interactúan estrechamente para favorecer el correcto funcionamiento del epitelio, las respuestas inmunitarias y la

adquisición de tolerancia frente a los antígenos alimentarios y la microbiota intestinal (Thaiss Christoph et al., 2018).

La barrera intestinal está compuesta por diferentes elementos, situados en el compartimento luminal como en el interno. Al residir en el lumen (cavidad interna que forma el intestino grueso y delgado), la microbiota restringe la colonización de patógenos e interactúa con las células epiteliales, inmunitarias y neuronales para promover la función de barrera mediante mecanismos que incluyen la adquisición de nutrientes, la regulación de la energía, el metabolismo y la proliferación celular (Albert-Bayo et al., 2019). Los elementos lumínicos extracelulares incluyen el pH, las enzimas de las secreciones gástricas, pancreáticas y biliares, la capa de moco y las moléculas liberadas por las células epiteliales e inmunitarias, entre las que se encuentran las defensinas, la lisozima, los fosfolípidos, los péptidos de la familia del factor trefoil, las catelicidinas, las ribonucleasas y las inmunoglobulinas, principalmente la IgA secretora (Di Tommaso et al., 2021). Además, el peristaltismo y la secreción de agua y cloro en el lumen lavan el contenido y ralentizan la translocación del antígeno a la lámina propia. El epitelio incluye células especializadas que producen y secretan moco (células calciformes), defensinas (células de Paneth), hormonas y neuropéptidos (células enterocromafines); también incluye un tipo celular único especializado en la captación de antígenos del lumen (células M); para garantizar una barrera eficaz, las células epiteliales están estrechamente unidas entre sí por medio de uniones intracelulares (uniones estrechas, en el complejo de unión apical, seguidas de uniones adherentes y desmosomas) (Albert-Bayo et al., 2019).

La contribución inmunitaria en la barrera de la mucosa corre a cargo del tejido linfoide asociado al intestino (GALT), distribuido en estructuras linfoides organizadas, como

los folículos linfoides, las placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos, en los que se inician las respuestas inmunitarias. El GALT también incluye una distribución difusa de células efectoras por todo el epitelio y la lámina propia de la mucosa intestinal, compuesta principalmente por células plasmáticas, macrófagos, mastocitos, linfocitos, eosinófilos y células dendríticas (Kato, Kawamoto, Maruya, & Fagarasan, 2014).

Funcionalmente, la defensa inmunitaria de las mucosas puede dividirse en sitios inductores y sitios efectores. Los sitios inductores, donde antígenos tomados de la superficie de la mucosa activan los linfocitos de memoria T y B, consisten en nodos organizados de folículos linfoides e incluyen las placas de Peyer, folículos linfoides organizados y nódulos linfáticos mesentéricos. Los sitios efectores, donde las células efectoras posterior a su diferenciación realizan su acción, consisten en el epitelio y la lámina propia donde los linfocitos están dispersos por todo el tejido (Ahluwalia et al., 2017; Eckmann & Bamias, 2022).

### *2.6.1.1 Células especializadas del epitelio*

Las células calciformes y las células de Paneth ayudan a establecer funciones de barrera mediante la secreción de mucinas y proteínas antimicrobianas (PAM), respectivamente. Las mucinas altamente glicosiladas, definen la organización de la capa epitelial, la capa de mucosa se organiza funcionalmente para ayudar a crear la primera línea de defensa contra la invasión microbiana por otro lado las células de Paneth refuerzan aún más la barrera física mediante secreción de PAM's, incluyendo defensinas, catelicidinas, fosfolipasa A2 secretora y lisozimas. Las PAM's tienen una actividad selectiva contra la pared celular y las membranas superficiales;

colectivamente las células especializadas del epitelio funcionan para limitar la cantidad y la diversidad de bacterias que llegan a la superficie epitelial y que entran en contacto con la mucosa subyacente (Larsen, Cowley, & Fuchs, 2020; Peterson & Artis, 2014).

#### *2.6.1.2 Lámina propia*

Es la capa de tejido conectivo compacto que se encuentra debajo del epitelio, es el lugar donde se encuentran la mayoría de células inmunitarias intestinales y también contiene el suministro de sangre, el sistema de drenaje linfático y suministro nervioso de la mucosa. La lámina propia es un importante sitio efector de la respuesta inmunitaria intestinal, por lo tanto, es importante para prevenir la entrada y propagación de patógenos a través de la mucosa intestinal (Albores-Saavedra & Angeles-Angeles, 2012).

Dispersos en la lámina se hallan linfocitos libremente dispersos que están representados principalmente por células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y células plasmáticas, que son células B diferenciadas, que producen IgA polimérica (Mowat & Agace, 2014). Se contempla que la lámina propia, junto con el epitelio es el lugar más grande para las células T en el organismo humano; la mayoría de estos linfocitos son células con experiencia en antígenos, es decir, células que ya han estado en contacto con antígenos en los sitios inductores. Además, se alberga una rica red de poblaciones de células inmunitarias innatas que incluyen: células dendríticas, macrófagos, mastocitos, eosinófilos y células linfoides innatas (Ahluwalia et al., 2017).

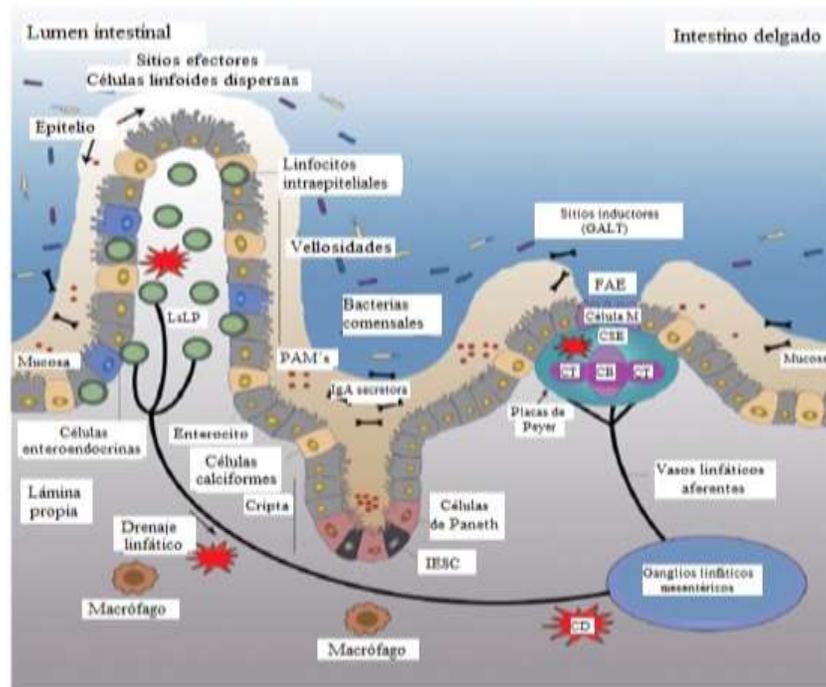
#### *2.6.1.3 Placas de Peyer*

Suelen encontrarse en el íleon distal, se consideran el principal lugar de inducción de la respuesta inmunitaria de la mucosa de igual manera son estructuras organizadas

que consisten en grandes folículos de células B con áreas intermedias de células T más pequeñas contenidas en una estructura en forma de cúpula conocida como cúpula subepitelial (Bilek & Bayram). En este sitio se encuentran células B, linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, células dendríticas, linfocitos B y T y macrófagos, todas ellas necesarias para la respuesta inmunitaria (Ahluwalia et al., 2017).

#### *2.6.1.4 Nódulos linfáticos mesentéricos*

Se considera que tienen tres compartimentos: el paracórtex, la corteza y la médula, que contienen un gran número de linfocitos que se alojan en distintas áreas dentro de estos compartimentos, son los mayores nódulos linfáticos del cuerpo y su función principal es filtrar la linfa procedente del intestino e iniciar la respuesta inmunitaria contra los antígenos entrantes, ya sea en forma libre o llevados al nódulo linfático por las células dendríticas que migran desde la lámina propia (Buettner & Bode, 2012).

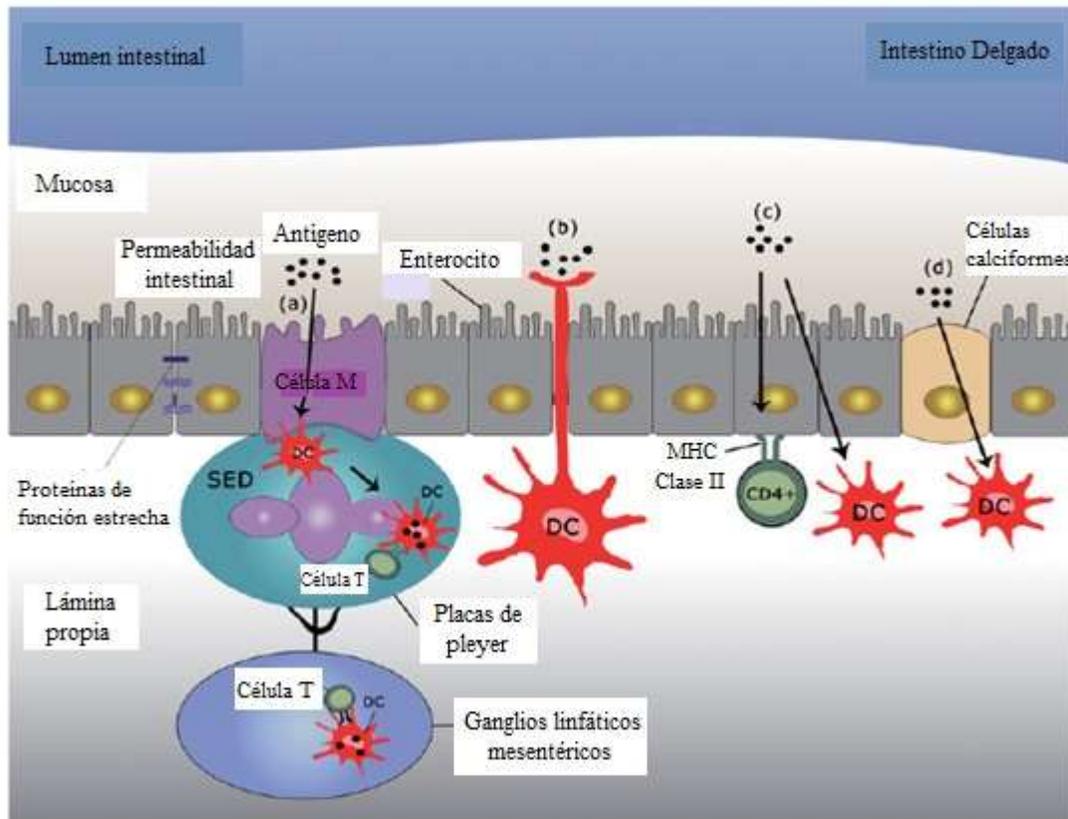


**Figura 2.** Representación esquemática del sistema inmunitario de la mucosa del tracto gastrointestinal. Las células epiteliales intestinales y la capa mucosa forman una barrera bioquímica y física que mantiene la separación entre el lumen intestinal y el sistema inmunitario de la mucosa. El tejido linfode asociado al intestino (GALT) está conformado por las placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos que son los principales lugares de inducción de las respuestas inmunitarias mientras que la lámina propia y la capa epitelial se consideran lugares efectores. En conjunto, la barrera epitelial, el tejido linfode organizado, las células inmunitarias dispersas por la lámina propia y el epitelio forman los componentes primarios del sistema inmunitario intestinal. Célula M: célula microfoldada; CSE: Cúpula subepitelial; CD: Célula dendrítica; PAM: Péptidos antimicrobianos; LsLP: Linfocitos de la lámina propia; IESC: células madre epiteliales intestinales. Modificado de: (Ahluwalia et al., 2017).

### 2.6.2 Captación y reconocimiento del antígeno

Se ha considerado que la entrada de los antígenos (Figura 3) a los sitios de inducción intestinales se podría producir por distintas vías:

- a) Los antígenos pueden entrar a través de las células de micropliegue (M) en el epitelio asociado al folículo (FAE) y pasar a las células dendríticas (McDole et al.) que subyacen en la cúpula subepitelial, las CD presentan al antígeno directamente a las células T en las placas de Peyer. Otra posibilidad es que el antígeno o las células con el antígeno lleguen a los nódulos linfáticos mesentéricos a través de la linfa de drenaje y posteriormente se presenten a las células T de los ganglios (Mabbott, Donaldson, Ohno, Williams, & Mahajan, 2013).
- b) Otra ruta implica el muestreo directo del antígeno en el lumen intestinal por parte de las células dendríticas que extienden las dendritas entre las células epiteliales para alcanzar el lumen (Coombes & Maloy, 2007).
- c) Además, los antígenos pueden entrar a través de los enterocitos del epitelio asociado al folículo que pueden pasar los antígenos a las células dendríticas o posiblemente actuar como células presentadoras de antígeno locales a través de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II (Mabbott et al., 2013).
- d) Investigaciones recientes demuestran que las células calciformes secretoras de mucina pueden funcionar como un pasaje para la entrega de antígenos solubles de bajo peso molecular a las células dendríticas de la lámina propia (McDole et al., 2012).



**Figura 3.** Vías potenciales de captación y representación de antígenos: Modificado de: (Ahluwalia, Magnusson, & Öhman, 2017).

## 2.7 Actividad antioxidante

Los antioxidantes pueden ser sustancias naturales o sintéticas con la capacidad de inhibir o retrasar el daño celular oxidativo en sustratos oxidables a concentraciones relativamente bajas. Se han aceptado varios antioxidantes químicos sintéticos como terbutil hidroquinona (TBHQ), hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), galato de propilo (PG) que presentan una fuerte actividad antioxidante como aditivos alimentarios, los cuales evitan el deterioro y prolongan la vida útil de los

alimentos. Sin embargo, también se ha considerado que tienen consecuencias desfavorables para el ADN y el sistema enzimático humano, por consiguiente su uso debe ser estrictamente limitado (Borrajo et al., 2019).

La importancia antioxidante de los péptidos de proteínas reside en que permiten reducir la degradación oxidativa debido a que reaccionan rápidamente con las especies reactivas del oxígeno. Los radicales libres al ser altamente reactivos químicamente pueden reaccionar con los componentes celulares y dañar las proteínas, lípidos y el ADN (Gupta, Caraballo, & Agarwal, 2019). Los radicales pueden ser inhibidos utilizando antioxidantes que actúan a través de dos mecanismos principales: la transferencia de átomos de hidrógeno y la transferencia de electrones simples (Lorenzo et al., 2018). Algunos métodos para evaluar la actividad antioxidante se describen a continuación:

El ensayo DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) es muy estable, reacciona con compuesto que pueden donar átomos de hidrógeno y tiene un máximo de absorción UV-visible a 515 nm, la prueba se basa en la eliminación de DPPH por parte de los antioxidantes, que tras una reacción de reducción decolora la solución de metanol de DPPH. Por otra parte el test ABTS•+ (Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) se basa en la decoloración de dicho radical, reflejando así la cantidad de radicales ABTS que se eliminan en un periodo de tiempo determinado en relación con la de Trolox (ácido-6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2-carboxílico), la capacidad total de eliminación de radicales de la muestra se calcula relacionando la disminución de la absorbancia de Trolox a 734 nm (Škrovánková, Mišurcová, & Machů, 2012).

## 2.8 Actividad antihipertensiva

La hipertensión es una enfermedad crónica que afecta a millones de personas en todo el mundo. De acuerdo con la ENSANUT (2020) realizada por la Secretaría de Salud 1 de cada 4 adultos en México padece hipertensión es decir, el 2% de los cuales el 40% ignora que tiene la enfermedad y el 60% conoce el diagnóstico pero decide no llevar a cabo un tratamiento médico lo que repercute en su condición de salud.

La presión arterial está regulada por el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). El bajo flujo sanguíneo renal o la baja concentración de sodio en el plasma inician la conversión de pro-renina en renina en las células yuxtaglomerulares de los riñones, la renina en circulación cataliza la conversión del angiotensinógeno en angiotensina I, que posteriormente es convertida en angiotensina II por la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La ECA se produce principalmente en los pulmones y en otros lugares como el revestimiento endotelial de los tejidos vasculares, el corazón, el cerebro, los riñones, la placenta, la médula ósea, el páncreas y los testículos (Rocha-Mendoza et al., 2021). La angiotensina II es un potente vasoconstrictor que hace que los vasos sanguíneos se estrechen, lo que provoca un aumento de la presión arterial. Al mismo tiempo estimula la secreción de la hormona aldosterona desde la corteza suprarrenal, lo que hace que los túbulos renales aumenten la reabsorción de sodio y agua en la sangre, provocando la excreción de potasio (Bellomo, Zarbock, & Landoni, 2024). La inhibición de la ECA disminuye la secreción de aldosterona mediada por la angiotensina II desde la corteza suprarrenal, lo que conduce a una disminución de la reabsorción de agua y sodio así mismo, a una reducción del volumen extracelular que, progresivamente conduce a la vasodilatación y, finalmente a la reducción de la presión arterial (Abuine, Rathnayake, & Byun, 2019).

La hipertensión es controlable con diversos fármacos antihipertensivos convencionales sin embargo, provocan varios efectos adversos por lo que se han desarrollado alternativas naturales más seguras y eficientes (Freeman, Vinh, & Widdop, 2017). Entre las opciones naturales se encuentran los péptidos bioactivos que podrían utilizarse como una estrategia funcional para el control y prevención de la hipertensión. En una reciente investigación realizada por Abdadía-García y colaboradores (2021) resaltan que las proteínas de lactosuero son sustratos complejos debido a su estructura globular compacta que las hace resistentes a la acción enzimática, obteniendo grados de hidrolisis bajos impactando de esta manera en su funcionalidad.

A continuación, se describe la acción de cada componente implicado en el SRAA:

**Renina:** Las células yuxtglomerulares presentes en las arteriolas aferentes del riñón contienen pro-renina. La activación de estas células provoca la escisión de la pro renina en renina. El riñón es el lugar de activación de la pro renina que con ayuda de las enzimas como la proconvertasa 1 y la catepsina B. La renina madura se almacena en los gránulos de las células yuxtglomerulares y se libera a torrente sanguíneo por cuatro estímulos principales (Kurtz, 2012).

- Cambios en la perfusión renal percibidos por el mecanismo transductor de presión en las arteriolas aferentes.
- Aporte de sodio y cloruro al túbulo contorneado distal percibido por la mácula densa.
- Aumento del flujo beta-simpático que actúa a través de los receptores beta-1 adrenérgicos.

- Retroalimentación negativa de factores humorales como la angiotensina I, el potasio y el ANP (péptido natriurético auricular).

Estas condiciones dirigen a una disminución de la perfusión renal y a una reducción del contenido tubular de sodio probando la liberación de la enzima renina a torrente sanguínea, se tiene considerado que la semivida de la renina es de 10-15 minutos (Fountain JH, 2023).

**Angiotensinógeno:** Está molécula se sintetiza principalmente el hígado y se segrega de forma constitutiva. La renina se separa el extremo N-terminal del angiotensinógeno y da lugar a la formación de angiotensina I (Ciau-Solís & Betancur-Ancona, 2021).

**Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA):** Esta enzima se expresa en las membranas plasmáticas de las células endoteliales vasculares, principalmente en la circulación pulmonar y divide los dos aminoácidos del extremo C-terminal de la angiotensina I para formar el péptido angiotensina II (Fountain JH, 2023).

**Angiotensina II:** Es el principal mediador de los efectos fisiológicos del SRAA, como la presión arterial, la regulación del volumen y la secreción de aldosterona (D. F. Guo, Sun, Hamet, & Inagami, 2001). Los efectos fisiológicos de la angiotensina II sobre el volumen extracelular y la regulación de la presión arterial se describen de cinco maneras (Fountain JH, 2023):

- Vasoconstricción pro contracción del musculo liso vascular en las arteriolas.
- Secreción de la aldosterona de la corteza suprarrenal en la zona glomerulosa, mediado por la aldosterona sintasa.

- Aumento de la reabsorción de sodio a través de una mayor actividad del antiportador Na-H del tubo contorneado proximal.
- Aumento del flujo simpático del SNC.
- Liberación de vasopresina desde el hipotálamo.

**Aldosterona:** Se sintetiza principalmente en la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal, su secreción depende de la angiotensina II, ACTH y la concentración de potasio extracelular. La aldosterona influye en la homeostasis de la sal y el agua regulando la sed y el apetito de sal a través de los receptores mineralocorticoides presentes en varias regiones del cerebro (Xue, Zhang, Roncari, Guo, & Johnson, 2012).

## **2.9 Análisis Sensorial**

El análisis sensorial estudia las propiedades (textura, sabor, gusto, aspecto, olor) de un producto o alimento a través de los sentidos (vista, olfato, gusto, tacto y oído) de los panelistas. Su evolución la ha situado como una de las metodologías más importantes para la innovación y aplicación para asegurar la aceptación del producto final por parte de los consumidores, no solo las características sensoriales son las que determinan la aceptación o el éxito de un nuevo producto; factores como el entorno, los conocimientos nutricionales, la salud y el envase también tiene una influencia muy importante (Ruiz-Capillas & Herrero, 2021).

Un mejor conocimiento de las experiencias sensoriales de los consumidores abre una zona para la innovación de alimentos, aunado a ello el análisis sensorial se considera actualmente como una de las herramientas más útiles en las diferentes etapas del

desarrollo de nuevos productos desde el diseño hasta la comercialización, con el objetivo mejorar la calidad de los mismos y garantizar el éxito de la innovación en la captación de mercado entre los consumidores (Ruiz-Capillas & Herrero, 2021).

Los análisis sensoriales descriptivos se han aplicado ampliamente para describir las características de los productos alimentarios y en los últimos años han surgido alternativas en los métodos descriptivos como: Libre elección, perfil flash y el método *Check All That Apply* por sus siglas en inglés se conoce como CATA. Estas tres metodologías consisten en una evaluación rápida del perfil sensorial, bajo en costos y reduce los tiempos de análisis (Silva et al., 2020).

CATA es un enfoque de importancia debido a la rápida obtención de características sensoriales de los productos basadas en el consumidor. En esta técnica, los consumidores se enfrentan a una lista de términos sensoriales con el fin de que ellos seleccionen aquellos que describan la muestra de forma fácil e intuitiva, proporcionando información válida y reproducible de la muestra (Ares & Jaeger, 2015). Se requiere de un gran número de participantes como lo son las pruebas enfocadas en los consumidores, para garantizar validez general y minimizar las incoherencias en las mediciones, entre otros puntos a considerar, la falta de entrenamiento sensorial (Alexi et al., 2018; Silva et al., 2020).

Los métodos sensoriales como CATA y *Projective Mapping* se utilizan actualmente en una amplia gama de aplicaciones, tanto en investigación como en la industria. Ambas pueden arrojar resultados similares a los métodos descriptivos tradicionales, con la ventaja de que son más flexibles y requieren menos tiempo (Galler, Næs, L. Almlí, & Varela, 2020).

### 3 Objetivos e hipótesis

#### 3.1 Objetivo general

Desarrollar una bebida a base de proteínas hidrolizadas de lactosuero y colágeno ovino, con propiedades funcionales.

##### 3.1.1 *Objetivos específicos*

- Obtener y caracterizar fisicoquímicamente los hidrolizados de las proteínas.
- Establecer la formulación de las bebidas de lactosuero con diferentes concentraciones de colágeno hidrolizado.
- Caracterizar fisicoquímicamente la bebida funcional.
- Evaluar la actividad microbiológica para *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, mesófilos aerobios, hongos y levaduras.
- Evaluar las propiedades antioxidantes mediante la inhibición de radicales ABTS y DPPH de la bebida funcional.
- Evaluar la biodisponibilidad *in vitro* del colágeno hidrolizado en las bebidas.
- Determinar la actividad antihipertensiva por prueba *in vitro* de la bebida funcional.
- Determinar si la bebida tiene actividad inmunológica por prueba *in vivo*.
- Evaluar sensorialmente la bebida funcional mediante una prueba CATA.

### **3.2 Hipótesis**

Es posible desarrollar una bebida a base de proteínas hidrolizadas de lactosuero y colágeno ovino que posea propiedades funcionales

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Obtención e hidrolisis del lactosuero

El lactosuero se obtuvo como subproducto de la elaboración de queso panela, omitiendo la etapa de salado. El lactosuero se pasteurizó a 60°C por 30 min. Posteriormente se hidrolizó con la enzima HT Proteolitic 200, en una concentración de 0.1 g de enzima por cada 100 ml de lactosuero a 50°C por 3 horas. Las condiciones de acción de la enzima fueron proporcionadas por el fabricante ENMEX, S.A DE C.V. Se almacenó a 4°C hasta su posterior análisis.

#### 4.1.1 *Análisis proximal del lactosuero*

Se caracterizó fisicoquímicamente a través del equipo FOSS Integrated Milk Testing Milkoscan FT 6000 (Foss Electric, Hillerød, Dinamarca) en el cual se determinó el contenido de proteína, lactosa, materia grasa, sales minerales, punto crioscópico y nitrógeno no proteínico, el análisis se realizó por triplicado.

### 4.2 Obtención e hidrólisis del colágeno

Para la obtención del colágeno se preparó una solución de colágeno: agua (1g:10 ml). Posteriormente se homogenizó durante 5 minutos a 5 rpm en el equipo ULTRA-TURRAX® IKA T25 digital. La mezcla fue transferida a una membrana de diálisis molecular Spectra/Por® MWCO con un tamaño de poro 6-8 kDa. La membrana se colocó en un vaso de precipitado de 600 ml cubierta por agua y se dejó en agitación constante durante 12 h con constantes cambios de agua cada 3 h. Finalmente se llevó a cabo una hidrolisis térmica a 70°C por 3 h.

### 4.3 Peso molecular de los hidrolizados proteicos por SDS-PAGE

Se siguió la metodología descrita por León- López et al., (2019) de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) algunas modificaciones. 1ml de muestra se disolvió en tampón Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 (1% SDS, 10% glicerol y 0.01% azul de bromofenol) y se colocó a ebullición por 5 min. A continuación, se preparó un gel de resolución al 17.5% y un gel de apilamiento al 4% que contenía los carriles donde se colocaron 10 µl de la muestra desnaturalizada y 5 µl de marcador con un peso molecular de 10 a 250 kDa (BenchMark Protein Ladeer, Thermo Scientific, Pierce <sup>TM</sup> MA, EE. UU). Se aplicó un voltaje de 50 V por 30 min, una vez que las proteínas se movilizaron al gel de resolución, se aumentó el voltaje a 100 V durante 4h. El gel se tiñó con azul de Coomasie por una hora.

### 4.4 Formulaciones de la bebida

En 100 ml de lactosuero hidrolizado se adicionó 5%, 10%, 15% y 20% (v/v) de colágeno hidrolizado, seguido de 2% cocoa (p/v) y 0.6% de sustituto de azúcar (p/v) y se homogenizó por 5 min de forma manual (Tabla 5). Los tratamientos se pasteurizaron a 60°C por 30 min y se almacenaron a 4°C para posteriores análisis.

**Tabla 5.** Tratamientos con diferentes concentraciones de colágeno hidrolizado.

Clave	Tratamiento
CH	Colágeno hidrolizado
SH	Suero hidrolizado
SC5	Suero hidrolizado + Colágeno hidrolizado 5%
SC10	Suero hidrolizado + Colágeno hidrolizado 10%
SC15	Suero hidrolizado + Colágeno hidrolizado 15%
SC20	Suero hidrolizado + Colágeno hidrolizado 20%

### 4.5 Análisis Bromatológico

Se determinaron los parámetros de humedad (950.27), grasa (2000.18), proteína (9991.2) y ceniza (923.03) de acuerdo a la Asociación Oficial de Química Analítica (AOAC, 2019).

### 4.6 Determinación de pH

Se llevó a cabo por el método 981.12 de la (AOAC, 2019), midiendo el pH con un potenciómetro (HANNA Instruments, modelo HI 2210; Limena, Italy).

### 4.7 Determinación de color

El color de las bebidas y los blancos se determinó en la escala de CieLab mediante un colorímetro, modelo CR-400/410 (Konica Minolta, Foster City, EE.UU). Se evaluaron los parámetros L, a\* y b\*.

### 4.8 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier

Los grupos funcionales se caracterizaron utilizando un espectrofotómetro Frontier FT-MIR (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE.UU.) equipado con un accesorio de reflexión total atenuada (ATR). Las muestras se colocaron en el cristal de diamante del ATR y los espectros se registraron en modo de absorbancia en el intervalo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  combinando 32 barridos. El espectro de fondo del aire se restó de todos los espectros. Las bandas principales se analizaron utilizando el software Spectrum 10.4.2.

### 4.9 Análisis Microbiológicos

La determinación de microorganismos indicadores de contaminación *Salmonella spp* y *E. coli* se llevó a cabo siguiendo la NOM-210-SSA-2014, utilizando Agar *Salmonella Shigella* (Becton Dickinson; Heidelberg, Alemania) y Agar Eosina Azul de Metileno

(Becton Dickinson; Heidelberg, Alemania), respectivamente. Para la determinación de hongos y levaduras en alimentos se siguió la metodología de la NOM -092-SSA-1994 utilizando Agar Sabouraud Dextrosa. Para el recuento de bacterias aerobias (mesófilos aerobios) se utilizó el agar para el Método Estándar. Las muestras se incubaron en cajas petri (90x15 mm) durante 24 h en una estufa (FELISA modelo FE-131; Zapopan, Jalisco, México) a  $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Los resultados se expresaron como presencia (+) o ausencia (-) de microorganismos.

#### **4.10 Actividad antioxidante por inhibición de radicales ABTS y DPPH.**

Para el radical ABTS se obtuvo mediante la reacción ABTS 7 mM (Sigma-Aldrich; St. Louis, MI, EE.UU) y persulfato potásico 2.45 mM (Sigma-Aldrich; St. Louis, MI, EE.UU), incubando a temperatura  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  en oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS se diluyó con metanol hasta obtener un valor de absorbancia de  $0.700 \pm 0.2$  a 734 nm. A continuación, se mezclaron 2 ml de muestra y 1 ml de solución de solución radical ABTS estabilizado, transcurridos 6 min de reacción se leyeron las muestras en un espectrofotómetro UV-Vis (Jenway Genova, Model 6705, Bibby Scientific; Staffordshire, UK).

Para el radical DPPH se siguió el método de Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, (1995). Se mezclaron 0.5 ml de la muestra con 2.5 ml de la solución de metanol con DPPH ( $6 \times 10^{-5}\text{ M}$ ); la mezcla se guardó en la oscuridad durante 60 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se midió la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Jenway Genova, Model 6705, Bibby Scientific; Staffordshire, UK). La actividad antioxidante de los radicales se calculó siguiendo la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{AI - AF}{AI} \times 100$$

Donde:

AI= absorbancia inicial

AF= absorbancia final

### 4.11 Biodisponibilidad *in vitro* del colágeno hidrolizado en bebidas

Se utilizó la metodología de Minekus et al., (2014) con algunas modificaciones. Primero se mezclaron 5 ml de la bebida con 20 ml de una solución de CaCl<sub>2</sub> (0.3 M) + HCl (0.1 M) y pepsina (40,000 unidades) se ajustó el pH 3 de la solución con HCl 6 M y se incubaron a 38°C en un baño térmico con movimiento constante para simular la fase gástrica durante 2 h. Para la fase intestinal se tomaron 12.5 ml de la fase anterior + 1.25 ml de la mezcla (Pancreatina, sales biliares en NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M), ajustando el pH a 7 con NaHCO<sub>3</sub> (0.5 M) las muestras se incubaron a 38°C por 2 h.

### 4.12 Contenido de hidroxiprolina

Se colocaron 2 ml de muestra en un matraz aforado de 25 ml en el cual se adicionaron en el siguiente orden: 2 ml de CuSO<sub>4</sub> (0.05 M), 2 ml NaOH (1.25) y 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6%), los matraces se agitaron una vez por minuto durante 5 min y después se colocaron en un baño térmico a 40°C por 15 min para eliminar el exceso de peróxido de hidrógeno. Transcurrido el tiempo se enfriaron rápidamente en agua y se adicionaron 10 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.9 M) seguido de 5 ml de una solución de C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO (5%) los matraces se llevaron a un baño térmico a 70°C por 30 min. Se dejaron enfriar a 25 °C y se diluyeron con agua destilada hasta la señal de aforo. Las absorbancias se midieron en un espectrofotómetro UV-Vis (Jenway Genova, Model 6705, Bibby Scientific;

Staffordshire, UK) a 555 nm. Los resultados se obtuvieron mediante la siguiente ecuación y los resultados fueron reportados como porcentaje de hidroxiprolina:

$$\% \text{ Hidroxiprolina} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra} - \text{Absorbancia de la curva estándar}}{0.0041}$$

### 4.13 Actividad inhibidora de la ECA *in vitro*

La actividad inhibidora de la ECA fue evaluada por espectroscopia UV-Vis basada en la formación del ácido hipúrico del Hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL) catalizado por la ECA, siguiendo la metodología de Rachmawati et al., (2016), donde 50  $\mu$ l de ECA (6.25 mU/ml) fue incubada con 50  $\mu$ l de la solución muestra a una temperatura de 37°C por 10 minutos. Posteriormente, se adicionaron 150  $\mu$ l del sustrato (8.3 mM de HHL en 50 mM del buffer borato de sodio conteniendo 0.5 M de NaCl, pH 8.3), la mezcla fue incubada a 37°C por 30 minutos. La reacción se detuvo adicionando 250  $\mu$ l de HCl 1 M, después se adicionaron 1.5 ml de acetato de etilo, la mezcla se agitó en vórtex por 1 minuto y se dejó reposar por 5 minutos y se tomaron 1 ml del sobrenadante en un tubo y el solvente fue evaporado al vacío. El ácido hipúrico formado fue disuelto en 2 ml de agua destilada y fue medido en un espectrofotómetro UV-Vis (Jenway Genova, Model 6705, Bibby Scientific; Staffordshire, UK) a una absorbancia de 228 nm. Lisinopril fue utilizado como referencia a una concentración de 0.004 mg/ml. El porcentaje de inhibición de la ECA fue calculado por la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición de la ECA} = \frac{\text{AbsCtrl} - \text{Abs Muestra}}{\text{AbsCtrl}} \times 100$$

Donde:

Abs Ctrl: Absorbancia del control (Lisinopril)

Abs Muestra: Absorbancia de las muestras.

### **4.14 Actividad inmunológica *in vivo***

La metodología se basó en la previa investigación realizada por Yazaki (2017). Para evaluar la actividad inmunológica se trabajó con dos muestras el CH (colágeno hidrolizado) y la SC10 (colágeno hidrolizado al 10%) derivado de los resultados de los bromatológicos. En un frasco de 100 mL de bebida al 10% se tienen 90 ml de lactosuero y 10 ml de colágeno hidrolizado por cada ml de lactosuero se tiene una concentración de 110 mg de CH. En el caso del tratamiento de CH si se tiene una relación 1:1, por cada mL de agua destilada se tiene una concentración de 10 mg de CH. Derivado de lo anterior se consideró que las dosis a suministrar a los ratones fueron: 900 y 1800 mg/kg de peso del ratón.

Estudios con ratones y consideraciones éticas: todos los estudios con ratones se realizaron en condiciones específicas libres de patógenos. Se utilizaron 40 ratones hembra CD-1 de 12-16 semanas de edad divididas en 6 grupos de 8 ratones cada uno.

Los grupos de estudio fueron:

#### **Grupos control:**

*Grupo 1:* Grupo Control sin tratamiento.

*Grupo 2:* Grupo Control inmno-suprimido, se administraron 25 mg/kg de Dexametazona (DEX), por vía intraperitoneal durante 3 días para inducir la inmunosupresión.

#### **Grupos experimentales:**

*Grupo 3 y 4:* Ratones del modelo inmunosupresor tratados con DEX, seguido de administración oral de colágeno hidrolizado (CH) a dosis de 900 mg/kg y 1800 mg/kg, respectivamente durante 7 días.

*Grupo 5 y 6:* Ratones del modelo inmunosupresor tratados con DEX, seguido de la administración oral de bebida de colágeno hidrolizado (BH) a dosis de 900 mg/kg y 1800 mg/kg, respectivamente por 7 días.

Al día 8 se extrajo sangre a través de punción de la vena facial y se recolectó en tubos vacutainer para determinar los niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Posteriormente, se practicó eutanasia por anestesia seguida de una dislocación cervical, se obtuvieron y pesaron los órganos: bazo y timo para su posterior análisis.

### *4.14.1.1 Análisis de citometría de flujo*

Se obtuvieron 25  $\mu$ l de sangre de ratón y se preparó FACS Lysing 1X diluyendo 30  $\mu$ l de esta solución en 270  $\mu$ l de tampón fosfato salino 1X por cada 25  $\mu$ l de sangre. Tras agregar el FACS Lysing diluido a la muestra de sangre se mantuvo en hielo por 15 min, se procedió a lavarla con 1 ml de tampón fosfato salino (1X) y se centrifugó a 1,200 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se realizó la tinción de viabilidad mezclando 1  $\mu$ l de Zombie Aqua en 299  $\mu$ l de tampón fosfato salino 1X y se añadió, 150  $\mu$ l de esta solución a cada tubo. Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente protegiendo las muestras de la luz, se lavó con 1 ml de tampón fosfato salino 1X, se centrifugó a 1,200 rpm durante 5 min y se decantó. Se colocó el panel de anticuerpos correspondiente a cada tubo: anti-CD45 PE/Cy7, anti-CD4 APC y anti-CD8a PE. Se incubaron a 4°C durante 20 minutos, seguido de la lectura en el citómetro

de flujo espectral Aurora, utilizando el software FlowJo para el análisis posterior de los datos.

### **4.15 Evaluación sensorial**

Se desarrolló un estudio sensorial para determinar los criterios de aceptación de dos bebidas SC5 (5% de colágeno hidrolizado) y SC20 (20% de colágeno hidrolizado), e identificar si existen diferencias entre ellas con respecto al resabio y debido al bajo contenido de grasa que presentaron en el análisis proximal. Se realizó una previa encuesta rápida para elegir a los evaluadores con el objetivo de seleccionar personas que consumieran de manera habitual productos lácteos o productos probióticos. Posteriormente se contactaron a 85 evaluadores 55 mujeres y 33 hombres en un rango de edad de 17 a 53 años, todos estudiantes del Instituto de Ciencias Agropecuarias, para participar en la evaluación CATA a quienes sin conocer los detalles de las bebidas se les presentaron muestras de 10 ml cada una a una temperatura de  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ , en vasos de plástico individuales del número cero n codificados con número de 3 dígitos, y se colocaron frente a cada panelista. Cada participante recibió las dos muestras, un lápiz, un vaso de agua a temperatura ambiente para enjuagarse la boca entre muestras y un par de cuestionarios (Anexo 1), para conocer sus impresiones sobre aspectos visuales, olfativos, gustativos y gusto del consumidor por las bebidas.

Por naturaleza cualitativa de la investigación, los valores ordinales de las variables se recategorizaron (Anexo 2) de manera cuantitativa discreta, con la finalidad de facilitar los análisis estadísticos.

### 4.16 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar y un análisis de varianza (Corbo et al., 2014), todos los datos se realizaron por triplicado y se analizaron con el programa estadístico SPSS versión 23 incluyendo la prueba de Tukey con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ .

Para el análisis en la evaluación sensorial se desarrolló un análisis de correlación y un análisis de componentes principales (ACP). Los valores de las variables fueron estandarizados y jerarquizados por el método de correlaciones, ambos análisis se ejecutaron en el software estadístico de libre acceso R-Studio.

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Análisis proximal del lactosuero

Aproximadamente el 50% de los sólidos lácteos están presentes en el lactosuero, la lactosa representa la fracción predominante seguida de proteínas, minerales, nitrógeno no proteico y otros compuestos en menores cantidades (Tsermoula, Khakimov, Nielsen, & Engelsen, 2021).

El contenido de grasa representa un pequeño porcentaje (~0.05%), su composición es de aproximadamente 66% de lípidos no polares (principalmente triacilgliceroles y diacilgliceroles) y 33% de lípidos polares (fosfolípidos) (Ferreiro & Rodríguez-Otero, 2018). Como se muestra en la Tabla 6, la concentración de grasa en el lactosuero fue de 0.15% mostrando un valor inferior a previas investigaciones en lactosuero de cabra en polvo de 7.51% el bajo porcentaje podría estar relacionado al proceso de descremado al que se sometió la leche previo a la elaboración del queso (Pinheiro et al., 2024).

Las proteínas del lactosuero son la fracción más valiosa, con propiedades nutricionales y biológicas muy beneficiosas. Incluso su bioactividad se puede relacionar a componentes como proteínas, enzimas y péptidos (Herreman, Nommensen, Pennings, & Laus, 2020). El porcentaje de proteínas fue de 0.72%, resultados similares fueron hallados por Minj (2020) con 0.8% y también describe que los principales constituyentes de las proteínas del lactosuero son la  $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, seroalbúmina, inmunoglobulinas, lactoferrina bovina, lactoperoxidasa bovina y pequeñas cantidades de macropéptidos.

La lactosa constituye el principal carbohidrato de lactosuero dulce, funciona como fuente primordial de energía y tiene un alto valor nutricional porque favorece la absorción de Ca, Mg, P en el intestino y representa del 70-75% del total de sólidos (Tsermoula et al., 2021). El porcentaje de lactosa en el lactosuero fue de 4.93% resultados similares fueron reportados por Pires et al., (2021) en distintas fuentes de lactosuero: bovino (4.2-5.0%), ovino (4.3-6.1%), caprino (5.02-6.7%). La diferencia en los porcentajes depende de la fuente donde se obtenga el lactosuero. Con respecto a los sólidos totales se obtuvo un porcentaje de 5.43%. Barros et al. (2021) reportaron 6.55% de sólidos en concentrado de lactosuero proveniente del queso minas frescal. Las características y la composición del lactosuero dependerán del origen de la leche, los tipos de quesos fabricados (cuajo o coagulación ácida) y de los factores que afectan a la composición de la leche como raza, los ciclos estacionales, la alimentación y la fase de lactancia (Pires et al., 2021).

**Tabla 6 .** Análisis proximal del lactosuero.

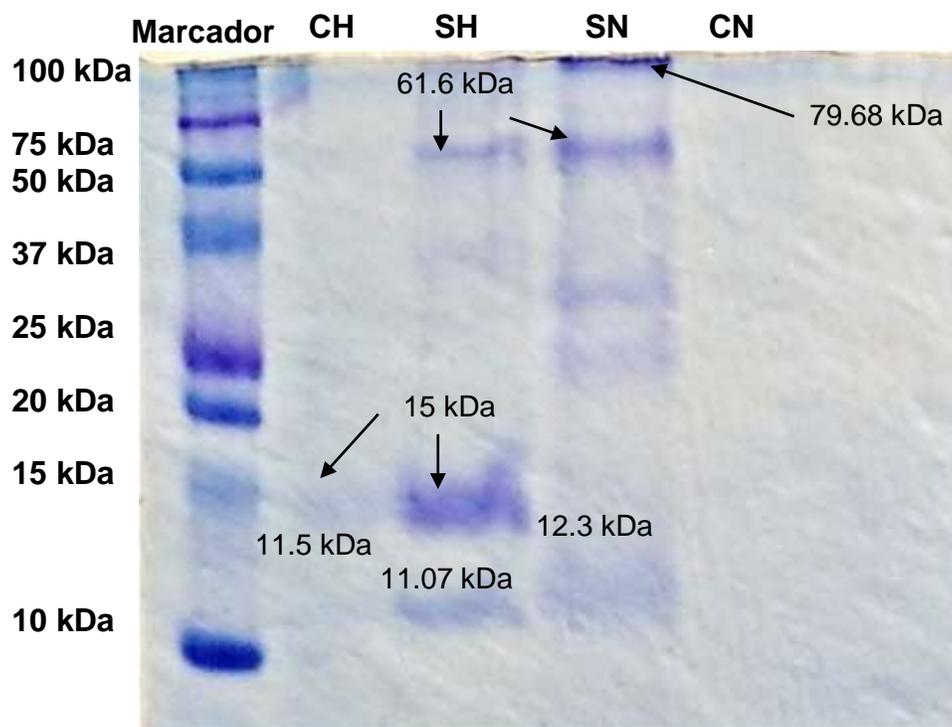
<b>Parámetro evaluado</b>	<b>Contenido</b>	<b>Parámetros de referencia</b>
Materia grasa (%)	0.15	0.1-0.3 %
Proteína (%)	0.72	0.8-1%
Lactosa (%)	4.93	4.8-5.0%
Sólidos Totales (%)	5.43	6.0-7.0%
Crioscopia °Horvert	0.465	0.530-0.560
Sólidos no grasos (%)	5.29	8.30%
Caseína	1.0	--
Urea (mg/dL)	5.12	--

### 5.2 Peso molecular de los hidrolizados proteicos

En la Figura 4 se muestran las bandas representativas de las proteínas nativas e hidrolizadas. CH presentó bandas cercanas a 15 y 11.5 kDa en comparación con la muestra del colágeno nativo (CN) en donde no se observan bandas derivado de que el marcador molecular que se utilizó fue de 10 a 250 kDa y de acuerdo con León-López (2019) reporta que el peso molecular del colágeno nativo es cercano a los  $\approx 300$  kDa. El colágeno se constituye por cadenas  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 y  $\beta$  con un peso de  $\pm 120$  kDa,  $\pm 110$  kDa y  $\pm 200$  kDa respectivamente mostrando un peso molecular alto ( $\approx 300$  kDa) (Nurilmala, Hizbullah, Karnia, Kusumaningtyas, & Ochiai, 2020). En previos estudios realizados por Hou y Chen, (2023) quienes extrajeron colágeno de piel de pez esturión, el cual fue hidrolizado enzimáticamente y posteriormente, se le aplicó un tratamiento térmico (40-50°C/5 h), se obtuvieron péptidos de menor peso molecular  $\approx 1$ -2 kDa. Los diferentes procesos que se apliquen al colágeno para hidrolizarlo conducen a distintas distribuciones del peso molecular, de tal manera que entre más severos sean los tratamientos que se le apliquen, la triple hélice se fraccionará en péptidos de pesos moleculares más bajos (Schmidt et al., 2020).

En el tratamiento SH se observaron bandas en 79.68, 61.6, 15 y 11.07 kDa, y en la muestra SN 79.68, 61.6, 12.3 kDa aproximadamente. Resultados similares se han reportado por Xiong et al., (2020) en donde las bandas se atribuyen a las diferentes proteínas características del lactosuero:  $\alpha$ -lactoalbúmina (13 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina (16 kDa), albúmina de lactosuero bovino (65-70 kDa), lactoferrina (80kDa). La diferencia en las bandas se puede atribuir al tratamiento de hidrólisis del lactosuero y al tipo de enzima empleada, ya que enzimas como las endoproteasas cortan el enlace peptídico

dentro de la molécula de proteína, mientras que las exoproteasas rompen el enlace peptídico del aminoácido terminal esto determina no solo la estructura y tamaño sino también las propiedades funcionales de los hidrolizados (Cui, Sun, Zhou, Cheng, & Guo, 2021).



**Figura 4.** Gel de poliacrilamida SDS-PAGE de los tratamientos hidrolizados. CH: Colágeno hidrolizado; SH: Lactosuero hidrolizado; SN: Lactosuero nativo; CN: Colágeno nativo

### 5.3 Análisis proximal de las bebidas

En la Tabla 7 se muestra la caracterización proximal de las bebidas elaboradas en la presente investigación. Se presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los blancos y las bebidas con colágeno con respecto al porcentaje de humedad, en la

evaluación de una bebida de lactosuero con sabor a fruta el porcentaje de humedad fue de 82.03% (Gimhani & Liyanage, 2019) este porcentaje fue menor al de esta investigación, lo que puede atribuirse a la formulación de la bebida.

Existe un incremento en el contenido de proteína en relación al porcentaje de CH adicionado. El porcentaje de proteína 1.03% fue menor al compararlo con una bebida a base de lactosuero dulce con maracuyá (1.09%) donde se evaluó la relación de las fracciones lipídicas y proteicas posterior al proceso digestivo (García-Casas et al., 2022). Resultados similares fueron reportados por León-López et al. (2020) en bebidas de lactosuero enriquecidas con colágeno hidrolizado y refieren que la variación en el porcentaje de proteínas puede ser desde 0.94%. Esto sugiere que la adición de CH aumenta el valor nutricional de las bebidas (García-Casas et al., 2022; Arely León-López et al., 2020). El contenido de cenizas en las bebidas funcionales se relaciona con la cantidad de minerales presentes en ellas. Lima et al., (2016) mencionan que los minerales que se encuentran en forma de óxidos son: sulfatos, fosfatos, nitratos, cloruros y otros haluros, sin embargo, los minerales principales del lactosuero son el sodio y el potasio. Previa investigación realizada por Naik et al., (2023) registraron un porcentaje de 7.83% en bebidas de lactosuero adicionada con jugo de zanahoria. El contenido de grasa es un componente muy importante en los alimentos ya que son necesarias para proporcionar energía al organismo; en una bebida a base de lactosuero con zumo de caña de azúcar el porcentaje de grasa fue de 0.86 (Zaman et al., 2023). Saha et al., (2017) registraron un porcentaje 0.18 y 0.17 en bebidas de lactosuero fermentado. Finalmente el contenido de carbohidratos de las bebidas de esta investigación fue mayor comparado con una bebida de lactosuero formulada con

avena pasteurizada a 65°C por 30 minutos reportando un porcentaje de 2.36 (Herrera-Ponce et al., 2022).

El contenido nutrimental de las formulaciones de la bebidas pueden variar con respecto a las características del lactosuero utilizado ya que éste presenta diferentes características nutricionales relacionadas al tipo de ganado, la dieta del animal, la leche a partir de la cual se produce, las técnicas de proceso utilizadas y otros factores

Tratamientos	Humedad (%)	Cenizas (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	Carbohidratos (%)
CH	98.5 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.03 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.47 ± 0.05 <sup>e</sup>	0.71 ± 0.20 <sup>d</sup>
SH	97.7 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.24 ± 0.06 <sup>d</sup>	0.50 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.64 ± 0.01 <sup>d</sup>	1.48 ± 0.38 <sup>c</sup>
SC5	94.2 ± 0.11 <sup>cd</sup>	0.44 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.10 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.88 ± 0.01 <sup>c</sup>	3.85 ± 0.11 <sup>ab</sup>
SC10	94.5 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.51 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.98 ± 0.02 <sup>b</sup>	4.28 ± 0.07 <sup>b</sup>
SC15	93.9 ± 0.06 <sup>e</sup>	0.50 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.98 ± 0.05 <sup>b</sup>	4.42 ± 0.08 <sup>a</sup>
SC20	94.11 ± 0.02 <sup>de</sup>	0.49 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.12 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.03 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.42 ± 0.02 <sup>a</sup>

ambientales (Minj & Anand, 2020).

**Tabla 7** Análisis proximal de los blancos y las bebidas.

Diferentes letras representan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% ( $p \leq 0.05$ ). ANOVA de una sola vía comparación de medias por Tukey.

#### 5.4 Determinación de pH

El valor de pH del lactosuero depende del tipo de cuajo utilizado para coagular la caseína en la fabricación de quesos (Pires et al., 2021). El lactosuero utilizado para la obtención de las bebidas fue de tipo dulce, de acuerdo a las investigaciones realizadas por Sağlam et al., (2019) los valores de pH que se sitúan entre 6-7 corresponden a lactosuero dulce, cuando el lactosuero es sometido a fermentaciones, el pH del lactosuero es inferior a 6.

Existieron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) del tratamiento control CH con respecto a las bebidas con diferentes concentraciones de colágeno (Tabla 8). Resultados similares se reportaron en bebidas de leche desnatada con diferentes concentraciones

de aislados de proteína de lactosuero en las que se evaluó el efecto de tratamiento térmico (precalentamiento 63°C y 77°C) en diferentes parámetros fisicoquímicos, el pH de las bebidas osciló de 6.54 a 6.87 (Kelleher et al., 2020). En bebidas de lactosuero dulce y zumo de morera negra se reportó un valor de pH de 5.3, éste valor descendió tras 21 días de almacenamiento a 4°C debido a la actividad metabólica de las bacterias ácido lácticas que producen ácido láctico y galactosa por consumo de lactosa durante el almacenamiento en frío (Abdulalim, Zayan, Campelo, & Bakry, 2018). La combinación de lactosuero dulce con zumo de nopal y zumo de caqui contribuyeron a una disminución en el valor pH de la bebida registrando un valor de 5.56 (Aly, Darwish, & Tawfek, 2019).

En función del pH Tallapragada y Rayavarapu (2019), sugieren que el lactosuero dulce presenta características importantes como materia prima para las formulaciones de bebidas lácteas dado que el lactosuero ácido ( $\text{pH} \leq 5$ ) puede provocar la sedimentación de las proteínas.

**Tabla 8.** Determinación de pH en las bebidas.

Tratamientos	pH
CH	6.48 ± 0.12 <sup>a</sup>
SH	6.68 ± 0.25 <sup>b</sup>
SC5	6.67 ± 0.67 <sup>b</sup>
SC10	6.68 ± 0.45 <sup>b</sup>
SC15	6.66 ± 0.78 <sup>b</sup>
SC20	6.67 ± 0.36 <sup>b</sup>

Diferentes letras representan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% ( $p \leq 0.05$ ). ANOVA de una sola vía comparación de medias por Tukey.

### 5.5 Determinación de color

El color como característica sensorial y nutricional es un atributo importante que está relacionado con parámetros como la calidad y la aceptación del producto por parte de

los consumidores (Pathare, Opara, & Al-Said, 2013). El efecto que tiene sobre el color la adición de cocoa a las bebidas se muestra en la Tabla 9. Los tratamientos presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) exhibiendo mayor luminosidad el tratamiento SH (37.05) en comparación con la bebida SC20 (19.75) a la cual se le adicionó mayor contenido de colágeno. En las bebidas la coordenada  $a^*$  mostró un aumento con valor positivo indicando coloraciones rojizas y en la coordenada  $b^*$  los valores crecientes positivos mostraron tendencia a los colores amarillentos (Ly, Dyer, Feig, Chien, & Del Bino, 2020). La investigación realizada por Al-Aribah et al. (2020) elaboraron una bebida de chocolate preparada con cacao en polvo baja en grasa, obtuvieron valores menores en las coordenadas L,  $a^*$  y  $b^*$  comparadas con las del presente estudio. La diferencia podría ser atribuida a los componentes de su bebida, la cual está adicionada con  $\iota$ -carragenano,  $\kappa$ -carragenano y goma xantana. En una infusión de cáscara de cacao los valores de L,  $a^*$  y  $b^*$  oscilaron entre 24.40, 0.84 y 0.90 respectivamente, mostrando un color marrón derivado de las melanoidinas que otorgan pigmentos rojos, derivados de la reacción de Maillard y proantocianidinas (Delgado-Ospina et al., 2023).

La coloración amarilla-verdosa de las bebidas a base lactosuero se debe principalmente al contenido de riboflavina, la cual es susceptible a la degradación por efecto de la temperatura inclusive, puede aumentar cuando hay un contenido considerable de minerales en la bebida, por lo tanto a mayor contenido de riboflavina presente en el lactosuero el cambio de color será modificado (Baba et al., 2016). Pero, cuando a este tipo de bebidas se les adiciona otro tipo de aditivo (colorante, saborizante) el color se verá alterado como en la investigación realizada por Rocha et al., (2019) donde las bebidas formuladas con lactosuero y adicionadas con

antocianinas provenientes de jabitucaba (*Syzygium cumini*) presentaron tonalidades que iban del amarillo al rojo, con mayor inclinación a coloraciones rojizas.

**Tabla 9** Determinación de color en las bebidas funcionales en la escala de CieLab.

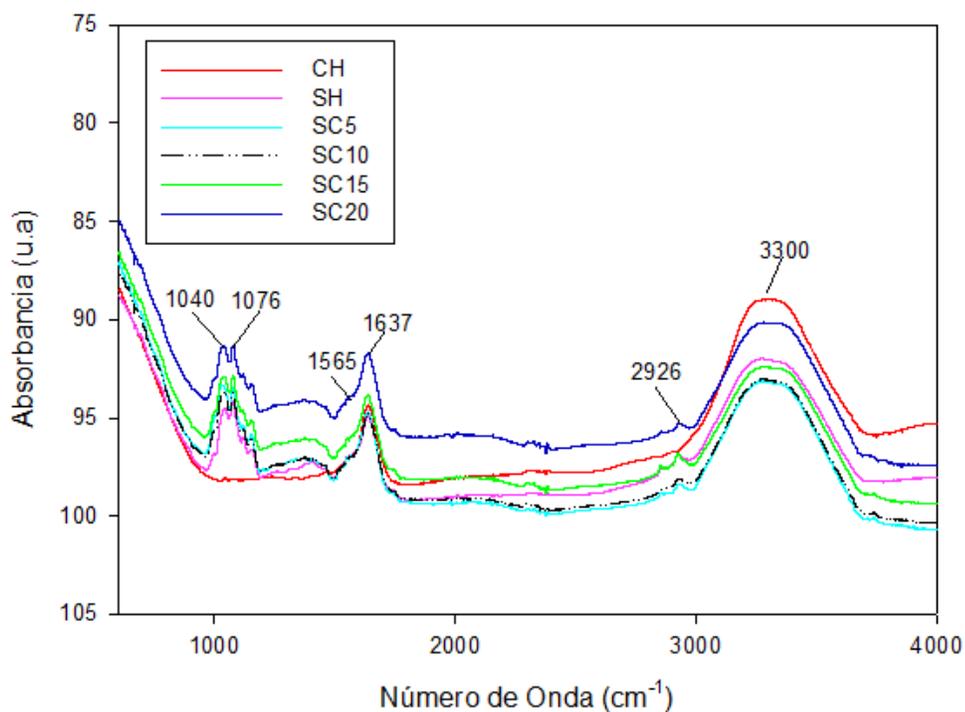
Tratamientos	L	a*	b*
CH	36.50 ± 0.24 <sup>a</sup>	1.67 ± 0.40 <sup>c</sup>	3.18 ± 0.03 <sup>d</sup>
SH	37.05 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.12 ± 0.01 <sup>d</sup>	7.97 ± 0.10 <sup>a</sup>
SC5	18.29 ± 0.20 <sup>c</sup>	4.29 ± 0.10 <sup>b</sup>	4.09 ± 0.08 <sup>d</sup>
SC10	18.70 ± 0.91 <sup>ab</sup>	4.34 ± 0.30 <sup>ab</sup>	5.73 ± 0.30 <sup>c</sup>
SC15	19.14 ± 0.22 <sup>ab</sup>	4.47 ± 0.16 <sup>ab</sup>	5.73 ± 0.28 <sup>c</sup>
SC20	19.75 ± 0.40 <sup>b</sup>	4.80 ± 0.20 <sup>a</sup>	5.85 ± 0.48 <sup>b</sup>

Diferentes letras representan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% ( $p \leq 0.05$ ). ANOVA de una sola vía comparación de medias por Tukey.

## 5.6 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier

La espectrofotometría infrarroja (FTIR), se basa en frecuencias vibratorias naturales de los enlaces químicos presentes en las moléculas y permite analizar sustancias sin utilizar disolventes orgánicos (Fanelli, Zimmermann, Totóli, & Salgado, 2018). En la Figura 5 se puede observar un desplazamiento gradual en el pico  $\sim 1637 \text{ cm}^{-1}$  que puede ser atribuido a la amida I y puede estar relacionado con el aumento del contenido de colágeno. Un aumento en la cantidad de péptidos en la muestra se ve reflejado en un aumento en la cantidad de aminoácidos hidroxiprolina y prolina, fragmentos estructurales del colágeno (Kristoffersen et al., 2023). Al comparar los espectros de las bebidas con el espectro de colágeno hidrolizado, se observan picos

similares en  $3300\text{ cm}^{-1}$  puede asociarse la intensidad relativa de la amida A. El cambio de intensidad sugiere que el grupo NH de un péptido está involucrado en el enlace de hidrógeno (Y. Zhang et al., 2021). Se observó una vibración de tensión de la Amida B cercana a los  $2926\text{ cm}^{-1}$  y en  $1565\text{ cm}^{-1}$  se podría atribuir a la Amida II con interacciones intermoleculares, representando las vibraciones de estiramiento del grupo CN y la deformación del grupo NH de los enlaces amida (A. León-López et al., 2019). Se evidenció una banda cercana a  $1040\text{ cm}^{-1}$  que podrían asignarse al estiramiento C-O-C. La variación con respecto a otros espectros se deben a la presencia de otras macromoléculas (principalmente proteínas y lípidos) presentes en la matriz alimentaria procedentes de los demás ingredientes añadidos a la formulación de la bebidas de lactosuero (Arruda, Silva, Pereira, Meireles, & Pastore, 2020).



**Figura 5.** Espectros de FTIR de los blancos y bebidas.

### 5.7 Análisis microbiológico

La Tabla 10 muestra el análisis microbiológico de los tratamientos al día 0, 7, 15, 30 y 60 reportando ausencia contra los microorganismos indicadores de contaminación. La hidrólisis de las proteínas del lactosuero puede generar péptidos bioactivos con actividades antioxidantes, antimicrobianas, antihipertensivas y antidiabéticas. Los péptidos de la  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina están relacionados a una actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluidas algunas variantes resistentes a los antibióticos (A. Singh et al., 2023). Adicional a esta actividad que otorga el lactosuero, la presencia de colágeno hidrolizado está asociada a la actividad antibacteriana contra bacterias Gram negativas (*Salmonella*, *E. coli*) siendo los péptidos que provienen de la cadena  $\alpha$ -1 del colágeno tipo 1 (principal componente proteínico), los responsables de esta funcionalidad (Atef et al., 2021). Estudios previos de Vidal et al., (2022), señalan que el colágeno hidrolizado tiene actividad antimicrobiana, esto podría atribuirse a péptidos de bajo peso molecular con carga positiva y compuestos de moléculas anfipáticas (regiones hidrofílicas e hidrofóbicas). Natsir et al., (2021) describen que los péptidos antibacterianos de colágeno siguen el modelo de la alfombra. El cual comienza con las interacciones en las membranas celulares posteriormente, pueden formar canales en una bicapa lipídica generando una acumulación en la superficie de la membrana afectando su integridad y así provocar la lisis celular.

La actividad antimicrobiana de los péptidos está vinculada a su estructura, que determina la carga y las propiedades anfipáticas. Se ha reportado que la anfipaticidad de los péptidos determinada por la formación de una estructura secundaria que segregan residuos de aminoácidos polares y apolares puede favorecer la formación

de poros y la inserción del péptido a través de la membrana plasmática, dañando consecuentemente la funcionalidad de las bacterias (Innocente et al., 2023).

**Tabla 10.** Análisis microbiológico de las bebidas evaluando la presencia o ausencia de microorganismos indicadores de contaminación (*Salmonella spp.*, *E. coli*, hongos y levaduras, mesófilos aerobios). Los resultados se expresaron como presencia (+) o ausencia (-) de microorganismos.

<b>Tiempo</b>	<b>CH</b>	<b>SH</b>	<b>SC5</b>	<b>SC10</b>	<b>SC15</b>	<b>SC20</b>
Día 0	-	-	-	-	-	-
Día 7	-	-	-	-	-	-
Día 15	-	-	-	-	-	-
Día 30	-	-	-	-	-	-
Día 60	-	-	-	-	-	-

### 5.8 Actividad antioxidante

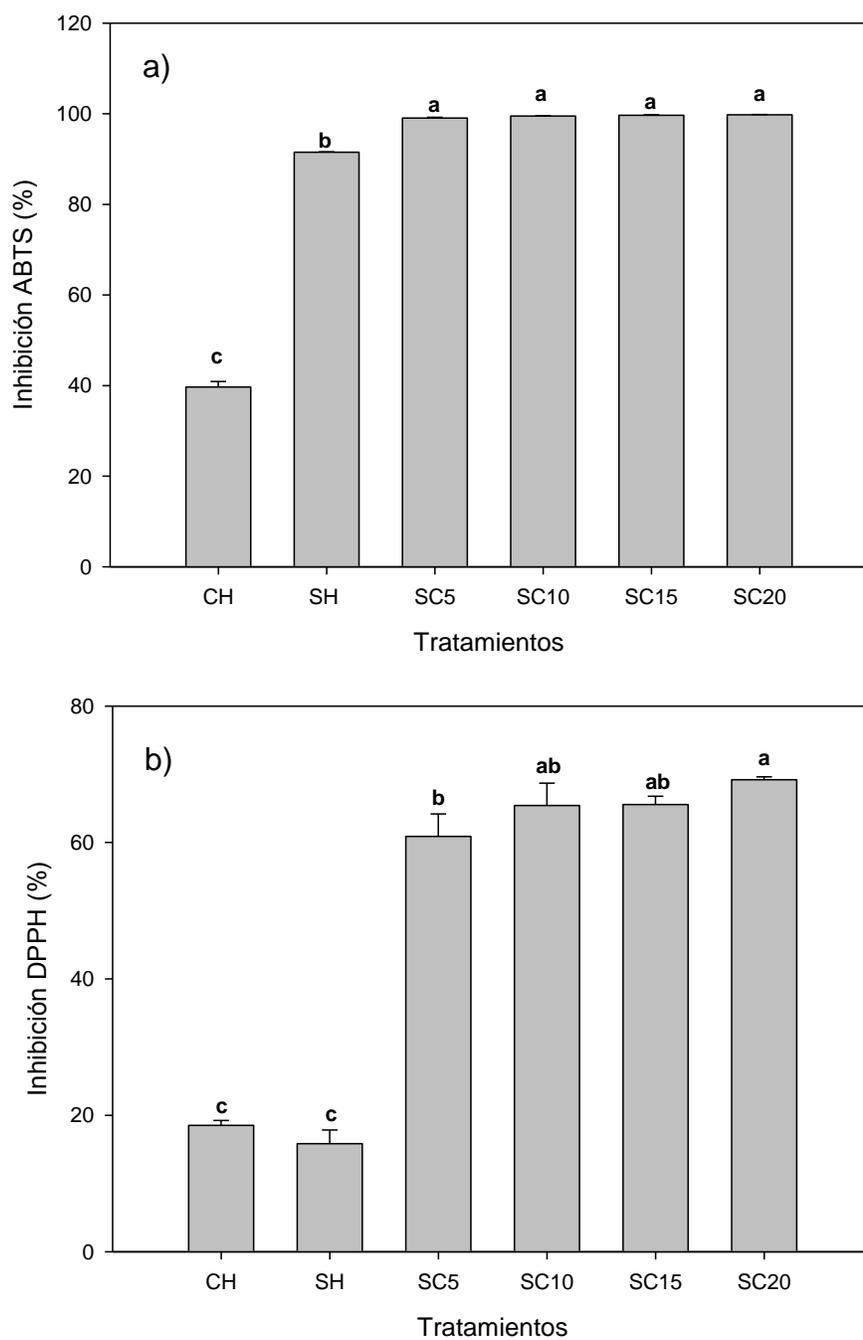
La función de los antioxidantes es neutralizar los radicales libres en las células biológicas, que al metabolizar el oxígeno, crean especies reactivas de oxígeno (ROS), generando un impacto negativo en los organismos vivos (Munteanu & Apetrei, 2021). En la reacción del ABTS en primer lugar se generan radicales de color verde azulado mediante la reacción de oxidación con persulfato potásico. A continuación se añaden antioxidantes y, en función de la transferencia de electrones, el radical se reduce al reactivo ABTS a incoloro (Haque, Morozova, Ferrentino, & Scampicchio, 2021). En la Figura 6a) se puede observar que los tratamientos de las bebidas inhibieron al radical ABTS  $\approx 99\%$  mostrando diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). Arranz et al., (2019) reportaron una inhibición para éste radical del 40% aproximadamente en una bebida a base de lactosuero de leche enriquecida con polifenoles de fuentes vegetales. Una leche aromatizada y enriquecida con 2% de hidrolizados de proteína de lactosuero la

actividad antioxidante aumentó hasta un 42% de inhibición del radical, lo que puede atribuirse a la presencia de aminoácidos con residuos aromáticos como la tirosina y el triptófano que pueden donar protones a los radicales deficientes de electrones (Mann et al., 2015). Previa investigación realizada por Corrochano et al. (2018) describieron que diversas secuencias de aminoácidos en el lactosuero tienen propiedades antioxidantes identificando principalmente a los péptidos  $\beta$ -Lactoglobulina y  $\alpha$ -Lactoalbúmina como responsables de esta acción.

El DPPH es un radical libre basado en el nitrógeno, presenta un color violeta; cuando este acepta un electrón del compuesto antioxidante cambia a color amarillo reduciéndose al radical difenilpicrilhidrazina (Dinkçi, Akdeniz, & Akalın, 2023). En la figura 6b) se muestra el porcentaje de inhibición para el radical DPPH, el tratamiento SC20 mostró un valor de 69.19% ( $p \leq 0.05$ ) porcentaje mayor en comparación con los tratamientos CH y SH con porcentajes de 18.50 y 25.83, respectivamente. Estudios realizados por Sharma et al. (2022) reportaron una inhibición del 18.35% para este radical en bebidas a base de lactosuero proveniente de leche de camello y cabra, combinadas con zumo de aloe vera, miel y sal negra. Por otra parte Silveira et al. (2019) registraron un valor de 4.30% de inhibición de este radical en una bebida de lactosuero con sabor a guayaba. Previa investigación realizada por Dinkçi et al. (2023) consideran que la  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina, la albúmina de lactosuero bovino, las inmunoglobulinas y la lactoferrina presentes en el lactosuero son las principales fuentes responsables de la actividad antioxidante. La variabilidad de la actividad antioxidante está relacionada con diversos factores como el tipo y composición química del lactosuero, condiciones de proceso y tipo de enzimas utilizadas para la hidrólisis (Krunić & Rakin, 2022). La presencia de CH interviene en

la actividad antioxidante, dependiendo de la conformación de los péptidos, la abundancia y la posición de determinados aminoácidos dentro de las secuencias peptídicas por ejemplo: la glicina y prolina aumentan la capacidad de captación de radicales y con ello aumenta la actividad antioxidante (Nakchum & Kim, 2016). Zhang et al., (2019) han descrito que el residuo de glicina podría aportar una gran flexibilidad al esqueleto de los péptidos y neutralizar las especies radicales activas, mediante la donación el único átomo de hidrógeno de su cadena lateral. La glicina es el aminoácido más abundante en el colágeno, encontrando repeticiones en los tripéptidos (Gli-X-Y) lo que podría contribuir a la actividad antioxidante (Zhao et al., 2018). Resultados similares se reportaron en una bebida a base de extracto de rosa mosqueta con colágeno hidrolizado de pescado al 7% (p/v), exhibiendo una actividad antioxidante de 91.26% (Saati, Ilma, Wibawani, Winarsih, & Wahyudi, 2022).

Diversos estudios clínicos y nutricionales han sugerido que la ingesta de alimentos ricos en antioxidantes tienen el potencial de reducir el riesgo de muchas enfermedades como cardiopatías, osteoporosis, cáncer, diabetes, síntomas menopáusicos y obesidad (Azi, Tu, Rasheed, & Dong, 2020).



**Figura 6.** Actividad antioxidante de las bebidas a) Inhibición del radical ABTS; b) Inhibición del radical DPPH. Diferentes letras representan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% ( $p \leq 0.05$ ). ANOVA de una sola vía comparación de medias por Tukey.

### 5.9 Biodisponibilidad y determinación de hidroxiprolina

La biodisponibilidad se puede definir como la cantidad relativa de un compuesto bioactivo que atraviesa la barrera intestinal, llega a la circulación sanguínea y está disponible para procesos metabólicos o almacenamiento en el organismo (Sibilla, Godfrey, Brewer, Budh-Raja, & Genovese, 2015). El objetivo de realizar esta prueba fue conocer el porcentaje de absorción en el organismo de CH. Los resultados de la biodisponibilidad *in vitro* se muestran en la Tabla 11, en la que se puede observar que el porcentaje de absorción fue de 96-97% para las bebidas superando a los tratamientos de SH (50.65%) y CH (95.83 ± 0.05%), presentando diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de las bebidas ( $p \leq 0.05$ ). Previos estudios realizados por Bilek et al. (2015) en bebidas de zumo de fruta con colágeno hidrolizado, indicaron que las bebidas de naranja (95.37%) y manzana (90.71%) mostraron una mejor biodisponibilidad que la mezcla con zumo de uva blanca (86.34%). La diferencia de la biodisponibilidad podría deberse a los compuestos fenólicos del zumo de la uva blanca, debido a su capacidad de reducir la digestibilidad de las proteínas ya sea por precipitación directa o por inhibición de la actividad enzimática. Una bebida de lactosuero fermentada y adicionada con colágeno hidrolizado (1%) reportó un porcentaje de absorción de 58.95% (Arely León-López et al., 2020).

Se ha reportado que, dependiendo del comportamiento de las proteínas en la digestión gastrointestinal, se determinará la absorción de los péptidos liberados. La pepsina actúa en los enlaces pépticos próximos a los aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, el triptófano y la tirosina, mientras que la tripsina actúa en los aminoácidos básicos arginina y lisina, de esta manera debido a la diferente especificidad enzimática,

esta determinará el tipo de péptidos liberados durante la digestión gastrointestinal y en consecuencia, sus propiedades fisiológicas (Amigo & Hernández-Ledesma, 2020). Las propiedades fisicoquímicas de la estructura primaria de los péptidos de las proteínas alimentarias también pueden influir en la secuencia y la actividad de los péptidos liberados (Jahan-Mihan, Luhovyy, El Khoury, & Anderson, 2011).

Tripéptidos de tipo X-Hidroxiprolina-Glicina, procedentes de los hidrolizados de colágeno/gelatina son resistentes a las peptidasas y pueden llegar intactos al plasma debido a la presencia de hidroxiprolina (Abeer, Trajkovic, & Brayden, 2021). Se ha reportado la presencia de al menos once péptidos que contienen hidroxiprolina (Pro-Hip, Hip-Gli, Ala-Hip, Ile-Hip, Leu-Hip, Fen-Hip, Glu-Hip, Pro-Hip, Gli-Pro-Hip, Ala-Hip-Gli y Ser-Hip,Gli) en el plasma humano tras la ingestión de colágeno hidrolizado. El péptido Pro-Hip representa aproximadamente el 50% de los péptidos de colágeno de origen alimentario presentes en el plasma sanguíneo humano, seguido por el péptido Hip-Gli (Sato, Jimi, & Kusubata, 2019).

Los péptidos de los hidrolizados pueden mejorar la función cardiovascular, digestiva, inmunitaria, antioxidante, diabética, inflamatoria y sistema nervioso (Abeer et al., 2021).

**Tabla 11** Porcentaje de absorción de hidroxiprolina de las bebidas adicionadas con lactosuero adicionadas con colágeno hidrolizado.

Tratamientos	Absorción de Hidroxiprolina (%)
CH	95.83 ± 0.05 <sup>c</sup>
SH	50.65 ± 0.09 <sup>d</sup>
SC5	96.58 ± 0.54 <sup>b</sup>
SC10	97.18 ± 0.19 <sup>ab</sup>
SC15	97.48 ± 0.18 <sup>a</sup>
SC20	97.43 ± 0.17 <sup>a</sup>

Diferentes letras representan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% ( $p \leq 0.05$ ). ANOVA de una sola vía comparación de medias por Tukey.

### 5.10 Actividad Antihipertensiva

La hipertensión es una causa preponderante en el desarrollo de diversas enfermedades como infarto al miocardio, la insuficiencia cardiaca, ictus y la insuficiencia renal que derivan en la muerte. Diversas investigaciones han enfocado los estudios a combatir estas enfermedades desarrollando fármacos antihipertensivos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), vasodilatadores periféricos, betabloqueantes y bloqueantes de los receptores alfa, entre otros (Sangshetti et al., 2019). En la Figura 7 se muestra la actividad antihipertensiva de los diferentes tratamientos, como control se utilizó IECA comercial (0.004 mg/ml) el cual mostró la mejor actividad con  $87.303 \pm 0.791\%$ . La bebida SC20 fue el mejor tratamiento comparado con las muestras CH, SH y SC5, donde se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en virtud de que exhibió un porcentaje de inhibición de la ECA de  $67.77 \pm 0.287$  en contraste con el tratamiento SH que presentó un porcentaje de

inhibición de  $63.350 \pm 0.344$ . En previas investigaciones donde se extrajo CH de piel bovina sin curtir, los péptidos comprendidos entre 10-100 kDa revelaron una inhibición cercana al 90%, mientras que los péptidos de 5-10 kDa inhibieron a la ECA en un 70% aproximadamente (Bayarjargal et al., 2021). En otra investigación realizada por Pratiwi et al., (2021) donde se obtuvieron hidrolizados de colágeno de la piel de cabra *Kacang* la inhibición de la ECA osciló de 36.27-91.26% asociando esta actividad al hexapéptido Trp-Tyr-Pro-Ala-Ala-Pro. La investigación realizada por Yu et al., (2020) empleando el colágeno hidrolizado de pescado (fracción peptídica de 600-1000 Da) impidió la actividad enzimática en un intervalo del 23-45%, la diferencia se puede atribuir a dos factores: el primero el peso molecular y el segundo el fraccionamiento peptídico que se empleó para su análisis. Fracciones peptídicas como X-Hyp-Gli inhibieron la ECA, previas investigaciones sugieren que se debe especialmente a los aminoácidos alifáticos de cadena larga (Taga et al., 2018). La acción antihipertensiva presentada en esta investigación estaría respaldada por un mecanismo propuesto por Jogi et al., (2022), considerando que la vía de administración de los péptidos antihipertensivos es oral, se presentan las fases para llevar a cabo dicha acción:

Fase 1 Digestión: inicia en el estómago donde actúa la pepsina en un rango de pH de 1.5-2.0.

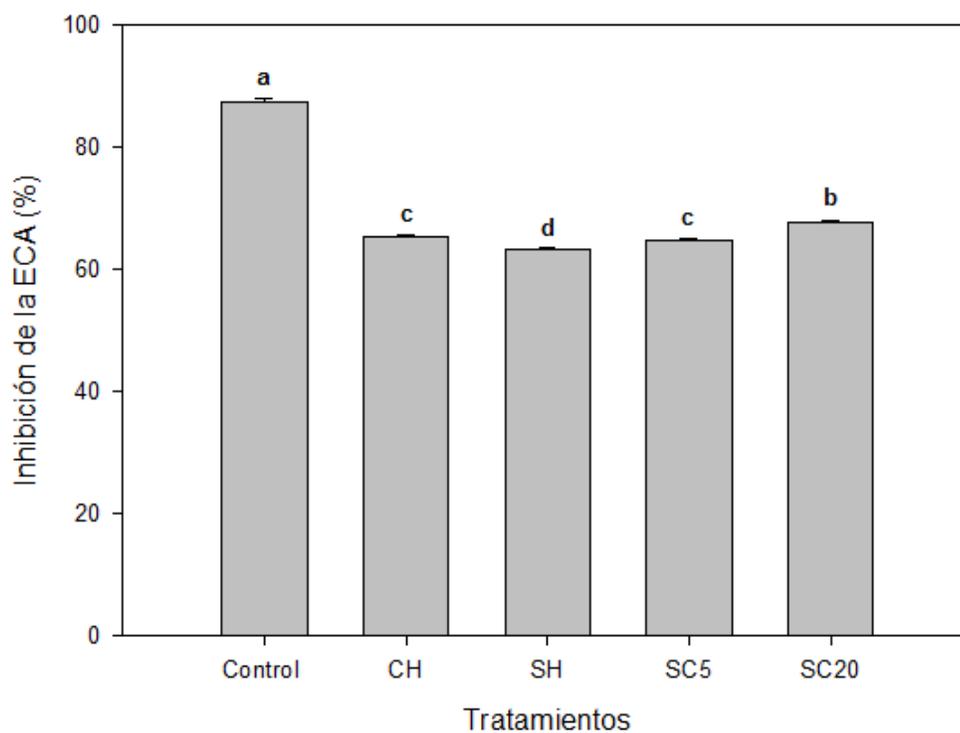
Fase 2 Hidrolisis: las proteínas son hidrolizadas a pequeños oligopéptidos o aminoácidos libres por efecto de las enzimas tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa y elastasa, que son absorbidos por los enterocitos intestinales.

Fase 3 Absorción: dependiendo de la longitud de su cadena se absorberán en diferentes regiones del intestino delgado a un ritmo distinto. En el duodeno se

impregnan fácilmente los dipéptidos y tripéptidos, mientras que en el yeyuno se absorben aminoácidos libres.

Etapa 4 Transporte: se considera que los responsables del transporte de los péptidos son PepT1 y PepT2, el primero transporta los di y tripéptidos inhibidores de la ECA-1 a través de la membrana del borde en forma de cepillo de los enterocitos intestinales hasta el torrente sanguíneo y el segundo que se encuentra en el riñón, pulmones donde la sangre reabsorbe los péptidos.

Otra investigación considera que los péptidos pueden transportarse de manera paracelular, donde los péptidos atraviesan las uniones estrechas que existen entre el epitelio de los enterocitos. Sin embargo, solo los oligopéptidos con tamaño  $<8$  angstroms ( $\text{\AA}$ ) pueden atravesar esta unión estrecha ya que el radio de la unión es de  $8 \text{\AA}$ . Por otra parte se contempla que, los péptidos pueden transportarse por interacción hidrofóbica con la bicapa lipídica de la membrana celular (transcitosis), a través del epitelio intestinal (Jogi et al., 2022).



**Figura 7.** Actividad antihipertensiva de las materias primas hidrolizadas y dos formulaciones de bebidas. Diferentes letras representan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% ( $p \leq 0.05$ ). ANOVA de una sola vía comparación de medias por Tukey.

### 5.11 Actividad Inmunológica

El timo es el principal órgano linfoide que regula ciertas funciones de los sistemas inmunitario y endocrino, mediante el control de niveles de hormonas y citocinas. La glándula de timo controla la proliferación celular, la apoptosis, las hormonas y neuropéptidos, además regula la diferenciación y producción de las células T (Al-Suhaimi et al., 2021). El bazo es uno de los tejidos linfoides de mayor importancia en el organismo, dentro de su estructura—en la pulpa roja tienen lugar varios procesos como la filtración de sangre, liberación rápida de anticuerpos, entre otras y en la pulpa blanca se desarrolla la inmunidad celular y humoral por lo tanto en el bazo se desempeñan regulaciones de la homeostasis inmunitaria (da Silva et al., 2021). De acuerdo a la Tabla 12 con respecto al peso del timo se puede observar que hubo diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre el grupo 2 y el grupo 6, el cual disminuyó su peso con respecto a los demás tratamientos. Con relación al bazo, no se presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos y los controles.

En previas investigaciones realizadas por Si et al., (2021), donde se suministró por 7 días péptidos de colágeno en diferentes concentraciones e inmunosuprimieron a los ratones con dexametasona (25 mg/kg), reportaron que el peso del timo de los ratones fue mayor en comparación con los ratones que se les aplicó dexametasona, los pesos del timo se restablecieron en los ratones suplementados con péptidos de colágeno. Los resultados de esta investigación coinciden con los reportados con el mismo autor, donde los pesos del bazo no mostraron diferencias significativas entre los ratones tratados con péptidos y los del grupo inmunosuprimido.

Gao, et al., (2019) reportaron que los pesos de los bazos de los ratones dosificados con una baja (50 mg /kg) y mediana (100 mg/kg) dosis de hidrolizados de colágeno provenientes de Yak (*Bos grunniens*) fueron significativamente superiores a los del grupo inmunosuprimido con ciclofosfamida. Cuando se les administró una dosis alta (200 mg/kg) de hidrolizados los pesos de timo y bazo no mostraron diferencias significativas.

Los linfocitos B y T son contrapartes celulares interrelacionados del sistema inmunitario adquirido, que se expresan como receptores de superficie que reconocen antígenos específicos y tienen potencial de memoria inmunológica a largo plazo (Booth & Toapanta, 2021). Los linfocitos se generan en la médula ósea, donde solo los linfocitos B maduran y se exportan a la periferia. Sin embargo, los linfocitos T, como precursores hematopoyéticos migran al timo para crecer, desarrollarse y diferenciarse de otras células (Thapa & Farber, 2019). En las Figuras 8, 9 y 10 se muestra el porcentaje de células positivas para los linfocitos CD4, CD8 y CD45 las cuales no tuvieron diferencias significativas con respecto al control. Los linfocitos CD4 y CD8 son reconocidos como indicadores importantes para evaluar el estado inmunoregulator y la respuesta a la homeostasis del sistema inmune intrínseco, la baja proporción de estas células se considera un signo de disminución de la función inmunitaria (Hadrup et al., 2006), lo que puede estar relacionado con el riesgo de adquirir infecciones (Yin et al., 2015).

Las células CD4 efectoras proporcionan al huésped mecanismos defensivos contra patógenos mediante la producción de citoquinas efectoras que activan a otras células inmunitarias como los macrófagos y las células CD8<sup>+</sup> para destruir células infectadas y ayudar a las células B a producir anticuerpos para mediar en las respuestas

inmunitarias humorales. Por otra parte las dexametasona, esteroide sintético es uno de los frecuentes glucocorticoides utilizados para inducir la inmunosupresión en análisis experimentales (Zhu & Zhu, 2020). En ese estudio, la inyección de dexametasona que se suministró durante tres días no indujo cambios significativos ( $p \geq 0.05$ ) en activación de células. Sin embargo, en la Figura 9 se muestran diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre el tratamiento 1800 mg BH (Grupo 6) y el control, lo que sugiere que la Dexametasona (DEX) podría inhibir la proliferación de células en ratones.

En esta investigación la suplementación con CH (Colágeno hidrolizado) y BH (Grupo 5 y 6) no generó efectos evidentes sobre los índices de bazo, timo y células de los ratones control o inmunosupresores. Aunque se haya utilizado colágeno procedente de origen previamente reportado, sí el método de obtención es distinto los péptidos pueden presentar inactividad o su funcionalidad se verá transformada (A León-López et al., 2019).

Previas investigaciones han reportado, que tras la administración oral de colágeno hidrolizado (5g disuelto en 100 ml de agua, con un peso molecular medio de 3-5kDa), obtenido de tendón bovino, aumentó la concentración de péptidos en sangre, 4 horas posteriores a la ingesta en comparación con el colágeno procedente de piel bovina, exhibiendo actividad quimiotáctica de fibroblastos (Taga et al., 2022).

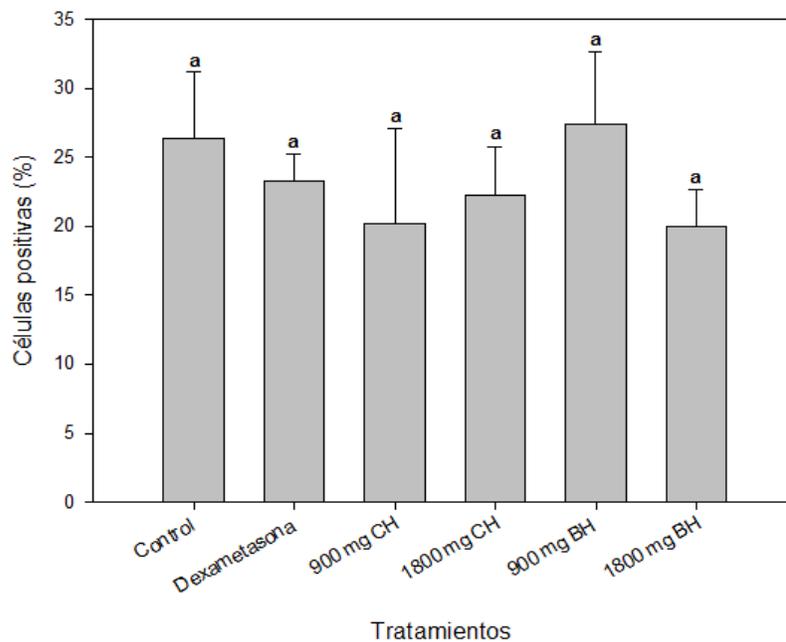
La investigación realizada por Si et al., (2021), administraron péptidos de colágeno a diferentes concentraciones (0, 300, 600, 600 mg/kg de peso corporal) por sonda durante 7 días, aumentaron el índice de proliferación y la secreción de interleucina-2 y la proporción de linfocitos CD4/CD8, los resultados sugieren que los péptidos de

colágeno podrían desempeñar un papel protector en la inmunosupresión. Esto sugiere que para futuras investigaciones es necesario considerar el tiempo de administración y las concentraciones de colágeno en ratones para detectar cambios significativos en órganos y células.

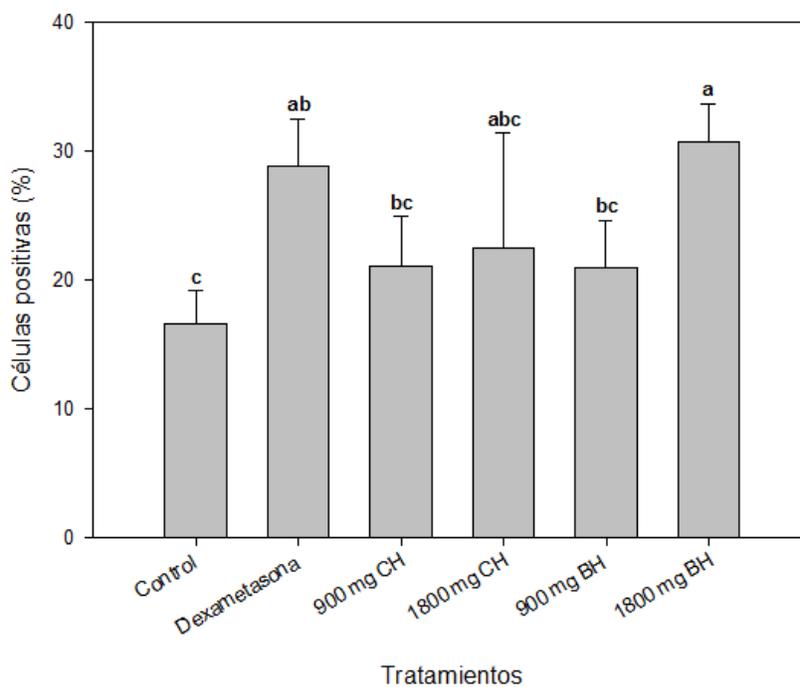
**Tabla 12** Peso de timo y bazo de los ratones clasificados en los diferentes grupos.

Tratamientos	Peso de Timo (g)	Peso de Bazo (g)
Grupo 1	0.0408 ± 0.015 <sup>ab</sup>	0.143 ± 0.032 <sup>a</sup>
Grupo 2	0.0533 ± 0.028 <sup>a</sup>	0.178 ± 0.051 <sup>a</sup>
Grupo 3	0.0422 ± 0.025 <sup>ab</sup>	0.140 ± 0.032 <sup>a</sup>
Grupo 4	0.0356 ± 0.015 <sup>ab</sup>	0.130 ± 0.032 <sup>a</sup>
Grupo 5	0.0427 ± 0.011 <sup>ab</sup>	0.129 ± 0.024 <sup>a</sup>
Grupo 6	0.0238 ± 0.010 <sup>b</sup>	0.128 ± 0.045 <sup>a</sup>

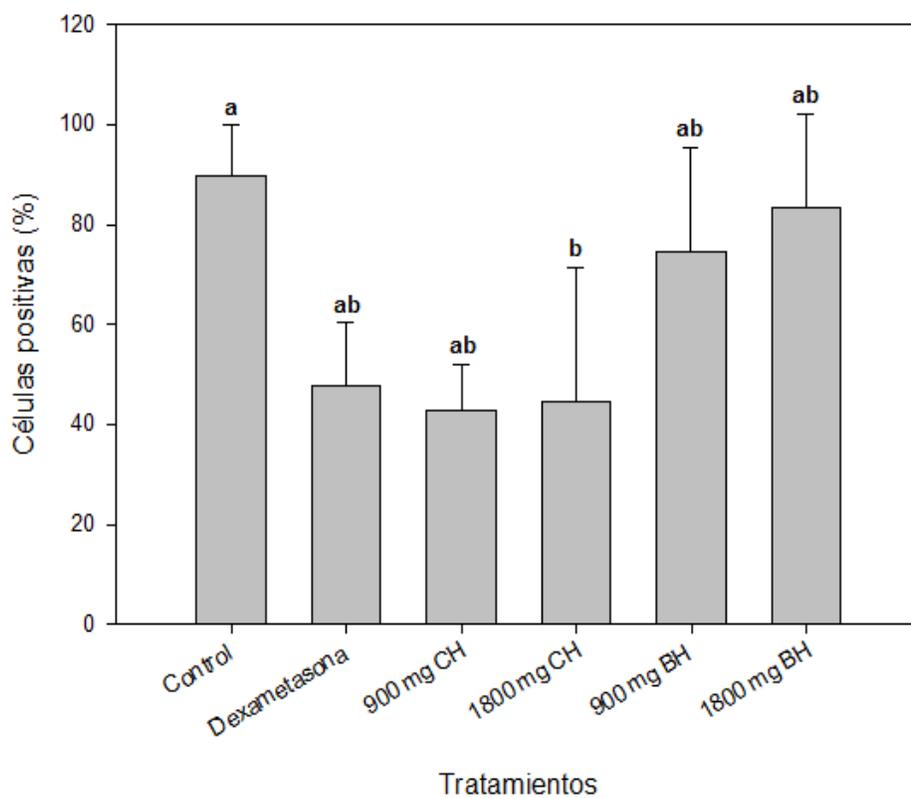
Diferentes letras representan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% ( $p \leq 0.05$ ). ANOVA de una sola vía comparación de medias por Tukey.



**Figura 8.** Activación de células T CD4<sup>+</sup>.



**Figura 9.** Activación de células T CD8<sup>+</sup>.

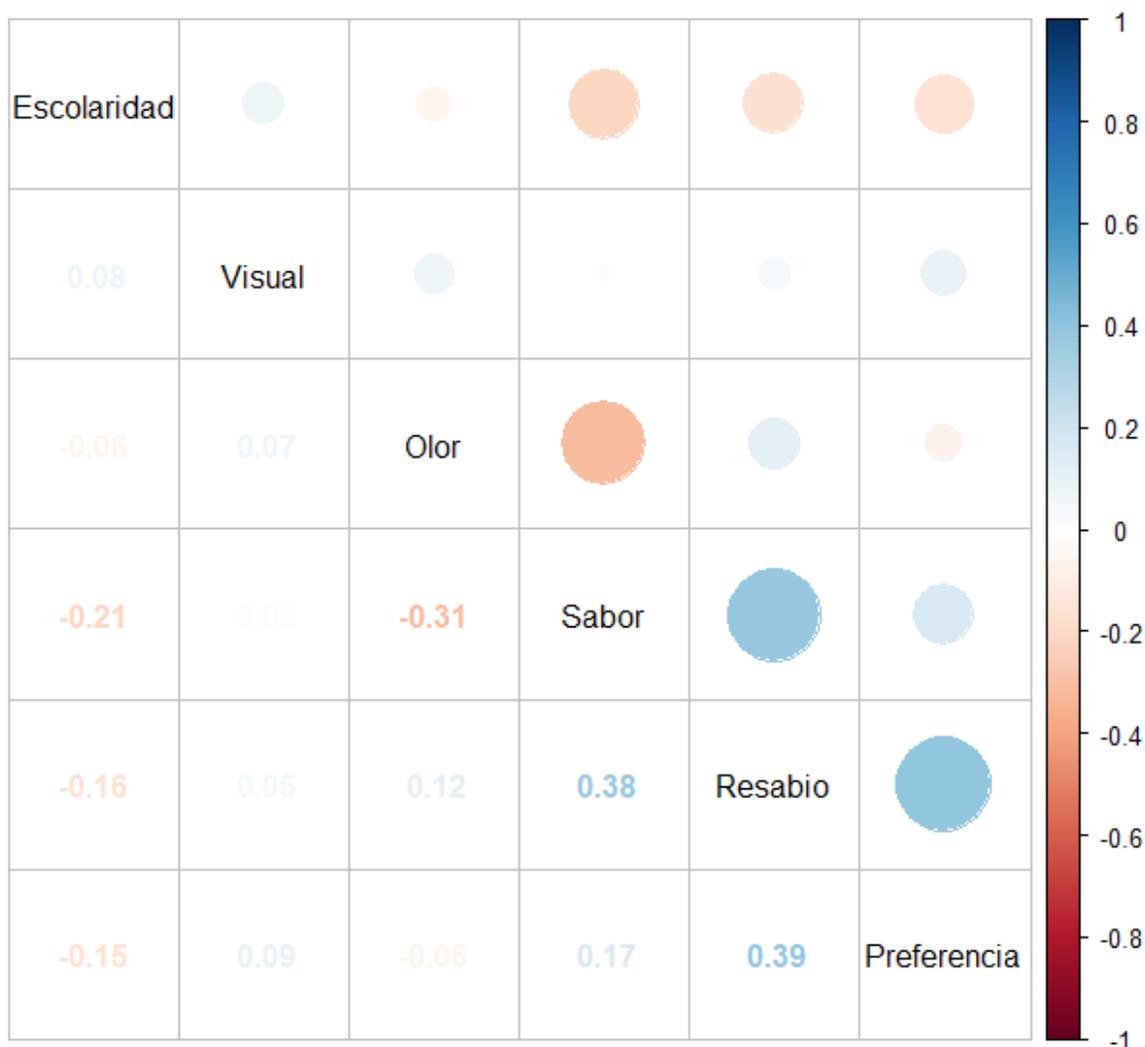


**Figura 10.** Activación de células T CD45<sup>+</sup>.

### 5.12 Análisis Sensorial

La aplicación de la técnica CATA es una alternativa rápida para recabar información sobre la percepción del consumidor de las características sensoriales de alimentos proporcionando información similar a la obtenida mediante los análisis descriptivos con jueces entrenados. Aunque el formato para realizar la evaluación es fácil y rápido para los participantes, las respuestas de la prueba CATA son fiables, derivado de que las preguntas tienen un gran potencial para explorar la percepción del consumidor en aplicaciones tanto académicas como industriales (Ares & Jaeger, 2015).

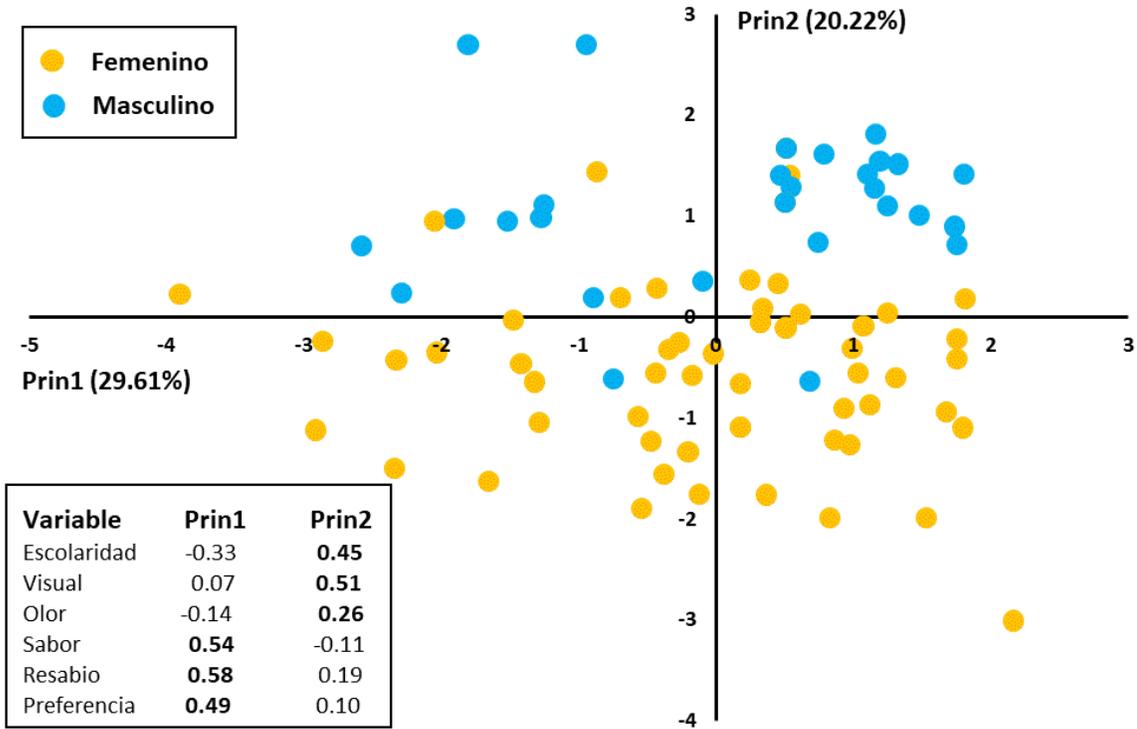
Los coeficientes de correlación no mostraron diferencias estadísticas ( $p \geq 0.05$ ). Sin embargo, las mayores asociaciones se registraron entre las variables de resabio, sabor y olor (Figura 11). La bebida de SC5 (5% de colágeno hidrolizado) presenta mayor preferencia cuando el sabor y resabio tienden a ser más dulces, aun cuando las notas de olor son más ácidas o agrias. Este aspecto es importante si se considera que los consumidores prefieren bebidas con olores agradables y sabores dulces (Igor & Vigo, 2019).



**Figura 11.** Relación de las variables físicas de la bebida SC5 y su preferencia.

El ACP (Análisis de Componentes Principales) determinó que en el Prin 1 con un 29.61% se agruparon principalmente las variables asociadas al sabor, resabio y preferencia, mientras que en el Prin 2 con el 20.22% se englobaron las variables visuales y de olor. En la Figura 12 se observa que la preferencia de la bebida SC5 es indistinto del género; sin embargo, destaca que los jueces de género masculino detectaron en la bebida sabores y olores más dulces, visualmente lo asociaron a tonalidades más oscuras. De acuerdo con Quitral et al., (2015), encontraron que en

general las mujeres son más sensibles a los olores y que los hombres prefieren los sabores dulces, determinando de esta manera la percepción olfativa en las féminas.



**Figura 12.** Diagrama de dispersión que muestra las variables que condicionan la preferencia de los 85 evaluadores que probaron la bebida CS5. Los valores para las variables que se agrupan en cada componente se incrementan conforme se pasa de la parte negativa a positiva en cada uno de los ejes (X: Prin1, Y: Prin2).

A diferencia de lo encontrado en la bebida SC5, para la bebida SC20 (Figura 13) la relación entre preferencia y resabio fue estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ), lo que implica que la preferencia a consumir la bebida SC20 está directamente asociada al resabio dulce que deja la bebida después de ingerirla. Aldrete et al., (2017) reportaron que uno de los factores que condicionan el consumo de bebidas azucaradas, es el resabio a dulzura, incluso por encima del aspecto nutricional.

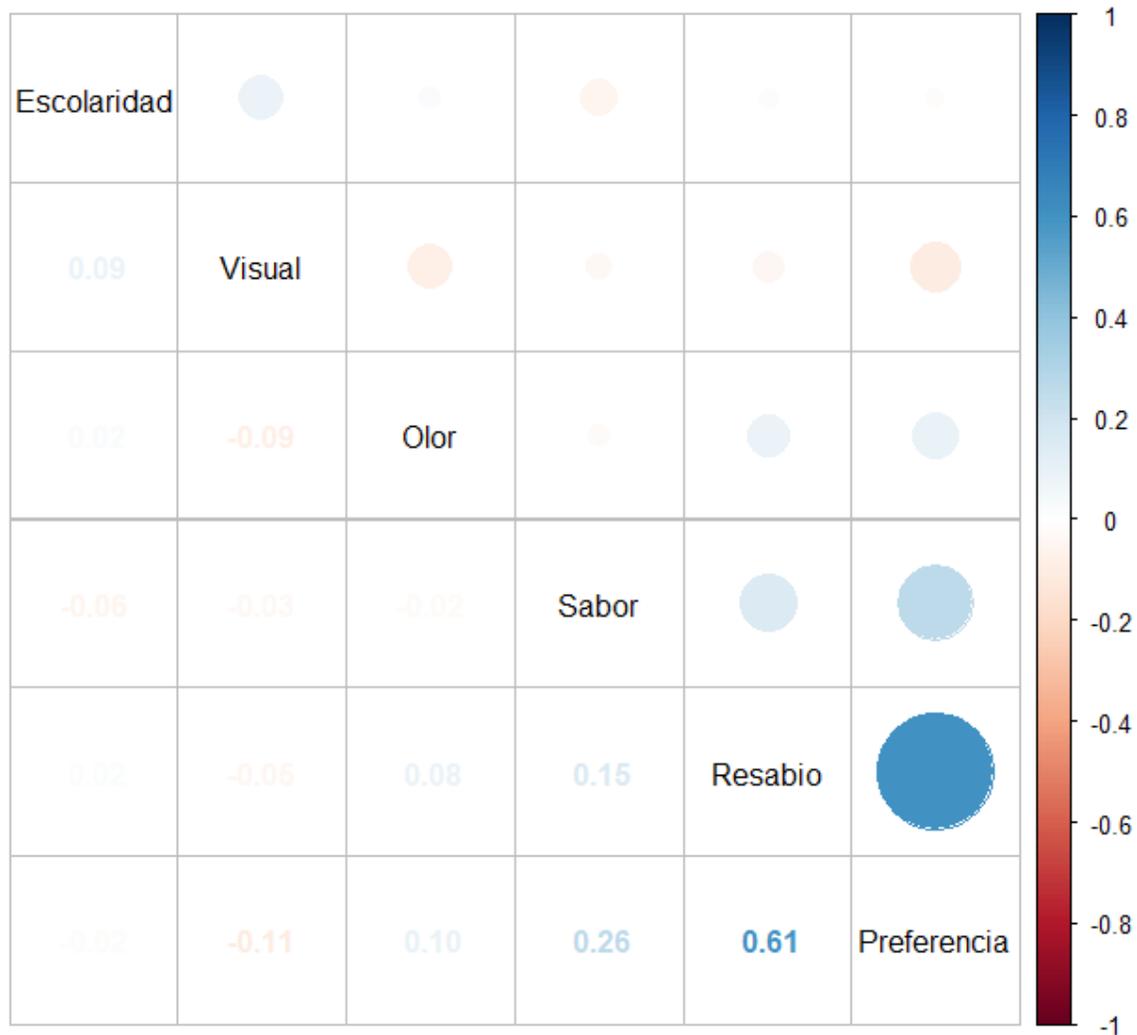
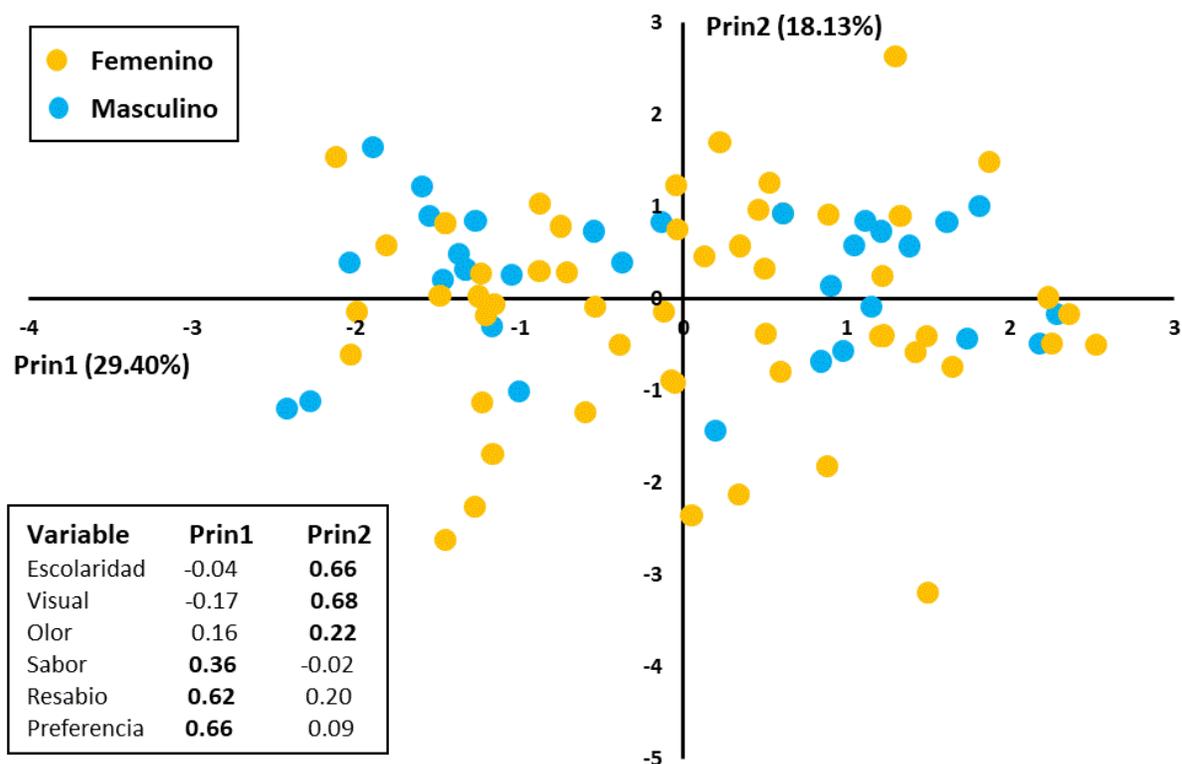


Figura 13. Relación de las variables físicas de la bebida SC5 y su preferencia

El ACP reveló que en la Prin 1 se asociaron las variables asociadas a sabor, resabio y referencia mientras que en la Prin 2 se concentraron las variables asociadas a aspectos visuales y olfativas (Figura 14). De igual manera la preferencia de la bebida SC20 fue indiferente al género pero la percepción fue mayor en el género femenino que en el masculino.



**Figura 14.** Diagrama de dispersión que muestra las variables que condicionan la preferencia de los 85 evaluadores que probabron la bebida CS20. Los valores para las variables que se agrupan en cada componente se incrementan conforme se pasa de la parte negativa a positiva en cada uno de los ejes (X: Prin1, Y: Prin2).

Las variables antes descritas condicionaron la aceptación de las bebidas, lo que justifica porque los consumidores prefirieron la bebida SC5 presentando mayores frecuencias de aceptación como se muestra en la Figura 15. Aldrete et al., (2017) mencionaron que la aceptación de las bebidas depende de factores como la

consistencia, el sabor, el olor y el resabio son fundamentales para su consumo, un aroma agradable en combinación con un sabor dulce y que el resabio se mantenga después de la ingesta, favorecen la aceptación de las bebidas.

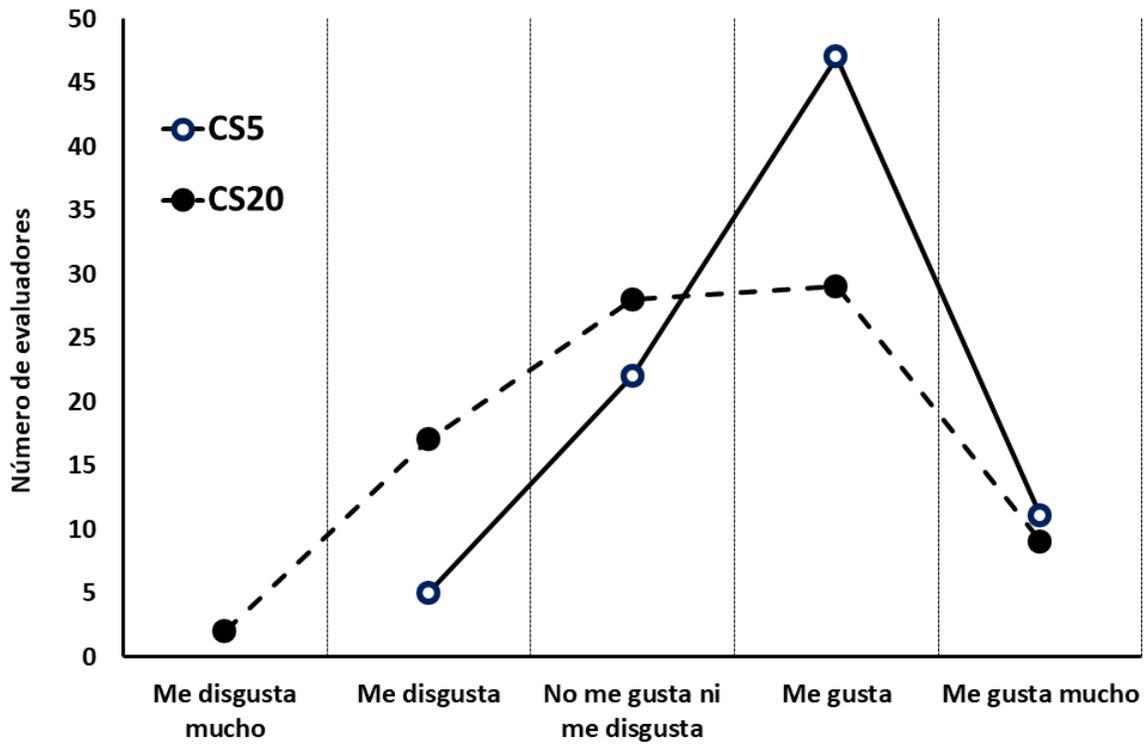


Figura 15. Frecuencia de evaluadores por categorías de preferencia para cada una de las bebidas evaluadas.

## 6 CONCLUSIONES

La elaboración de bebidas con posible acción funcional a base de hidrolizados proteicos: lactosuero y colágeno, contribuyeron a aumentar el valor nutricional debido a la alta concentración de proteína ( $1.03\pm 0.05\%$ ), el contenido de grasa y carbohidratos no mostraron diferencia significativa ( $p>0.05$ ) entre los tratamientos con menor (SC5) y mayor (SC20) concentración de colágeno hidrolizado. El espectro de FTIR mostró los grupos funcionales característicos del colágeno asociados a una hidrólisis. Los resultados de los análisis microbiológicos fueron satisfactorios en virtud de que todas las formulaciones mostraron ausencia en los microorganismos indicadores de contaminación.

La determinación de la acción antioxidantes por inhibición de radicales mostró diferencia significativa ( $p\leq 0.05$ ) del tratamiento con mayor contenido de colágeno SC20, mostrando una inhibición de 99% para ABTS y 69.19% para DPPH. El mismo comportamiento fue detectado en la actividad antihipertensiva inhibiendo un 67.77 % la ECA para los mismos tratamientos. Todos los tratamientos fueron sometidos a análisis de porcentaje de absorción de hidroxiprolina *in vitro*, donde todas las formulaciones de las bebidas mostraron una absorción cercana al 97%. Esto hizo notar que cuanto mayor fue la concentración de colágeno hidrolizado adicionado, la actividad funcional aumentó. De las dos formulaciones que se sometieron a análisis sensorial, la de mayor agrado por los evaluadores fue la formulación SC5 debido a que detectaron sabores y olores dulces, éste comportamiento podría estar relacionado a la concentración de colágeno hidrolizado.

De acuerdo a los resultados reportados en esta investigación, se puede considerar que el mejor tratamiento fue SC20 en virtud de su aporte nutricional el cual se refleja en el contenido de proteína. Aunque este tratamiento no fue el de mayor preferencia por los evaluadores sensoriales presentó la mejor actividad antioxidante y antihipertensiva, impactando de esta manera en la salud al ser ingerido. Sí bien se puede ampliar la evaluación funcional, lo que se aquí se muestra puede ser tomado como referencia para futuras investigaciones.

Cada año se desechan grandes cantidades de lactosuero y pieles a nivel local, lo que provoca un importante número de residuos incrementando la contaminación del suelo, agua y aire. La reutilización de subproductos agroindustriales como el lactosuero puede ser una alternativa para la elaboración de nuevos productos debido a su alto valor nutricional y de esta manera transformar los residuos en ingredientes que otorgarán funcionalidad a los alimentos donde se agreguen, ayudando a reducir significativamente el impacto ambiental.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

- Abadía-García, L., Castaño-Tostado, E., Cardador-Martínez, A., Martín-del-Campo, S. T., & Amaya-Llano, S. L. (2021). Production of ACE Inhibitory Peptides from Whey Proteins Modified by High Intensity Ultrasound Using Bromelain. *Foods*, 10(9). doi: 10.3390/foods10092099
- Abd AL-Razaq, A. H. (2019). Whey applications in plants. *Plant Archives*, 19(1), 45-48.
- Abdulalim, T., Zayan, A., Campelo, P., & Bakry, A. (2018). Development of new functional fermented product: Mulberry-whey beverage. *Journal of Nutrition, Food Research and Technology*, 1. doi: 10.30881/jnfrt.00013
- Abeer, M. M., Trajkovic, S., & Brayden, D. J. (2021). Measuring the oral bioavailability of protein hydrolysates derived from food sources: A critical review of current bioassays. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 144, 112275. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112275>
- Abuine, R., Rathnayake, A. U., & Byun, H.-G. (2019). Biological activity of peptides purified from fish skin hydrolysates. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 22(1), 10. doi: 10.1186/s41240-019-0125-4
- Aguero, R., Bringas, E., San Roman, M. F., Ortiz, I., & Ibanez, R. (2017). Membrane Processes for Whey Proteins Separation and Purification. A Review. *Current Organic Chemistry*, 21(17), 1740-1752. doi: 10.2174/1385272820666160927122523
- Aguirre-Cruz, G., León-López, A., Cruz-Gómez, V., Jiménez-Alvarado, R., & Aguirre-Álvarez, G. (2020). Collagen Hydrolysates for Skin Protection: Oral Administration and Topical Formulation. *Antioxidants*, 9(2). doi: 10.3390/antiox9020181
- Ahluwalia, B., Magnusson, M. K., & Öhman, L. (2017). Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. *Scand J Gastroenterol*, 52(11), 1185-1193. doi: 10.1080/00365521.2017.1349173
- Al-Aribah, S., Sanjaya, A., Muhammad, D. R. A., & Praseptiangga, D. (2020). *Sensorial and physical properties of chocolate beverage prepared using low fat cocoa powder* (Vol. 2219).
- Al-Suhaimi, E. A., Aljafary, M. A., Alkhulaifi, F. M., Aldossary, H. A., Alshammari, T., Al-Qaaneh, A., . . . Homeida, A. M. (2021). Thymus Gland: A Double Edge Sword for Coronaviruses. *Vaccines*, 9(10). doi:10.3390/vaccines9101119
- Albert-Bayo, M., Paracuellos, I., González-Castro, A. M., Rodríguez-Urrutia, A., Rodríguez-Lagunas, M. J., Alonso-Cotoner, C., . . . Vicario, M. (2019). Intestinal Mucosal Mast Cells: Key Modulators of Barrier Function and Homeostasis. *Cells*, 8(2). doi: 10.3390/cells8020135
- Albores-Saavedra, J., & Angeles-Angeles, A. (2012). 11 - Diseases of the gallbladder. In A. D. Burt, B. C. Portmann & L. D. Ferrell (Eds.), *MacSween's Pathology of the Liver (Sixth Edition)* (pp. 563-599). Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Alexi, N., Nanou, E., Lazo, O., Guerrero, L., Grigorakis, K., & Byrne, D. V. (2018). Check-All-That-Apply (CATA) with semi-trained assessors: Sensory profiles

- closer to descriptive analysis or consumer elicited data? *Food Quality and Preference*, 64, 11-20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.10.009>
- Aly, E., Darwish, A., & Tawfek, M. (2019). Quality characteristics of sweet whey-based fruits beverages fermented with *Lactobacillus plantarum*. *Egyptian Journal of Food Science*. doi: 10.21608/ejfs.2019.17601.1024
- Amigo, L., & Hernández-Ledesma, B. (2020). Current Evidence on the Bioavailability of Food Bioactive Peptides. *Molecules*, 25(19). doi:10.3390/molecules25194479
- Amirrah, I. N., Lokanathan, Y., Zulkiflee, I., Wee, M. F. M. R., Motta, A., & Fauzi, M. B. (2022). A Comprehensive Review on Collagen Type I Development of Biomaterials for Tissue Engineering: From Biosynthesis to Bioscaffold. *Biomedicines*, 10(9). doi:10.3390/biomedicines10092307
- AOAC. (2019). Official Methods of Analysis
- Ares, G., & Jaeger, S. R. (2015). 11 - Check-all-that-apply (CATA) questions with consumers in practice: experimental considerations and impact on outcome. In J. Delarue, J. B. Lawlor & M. Rogeaux (Eds.), *Rapid Sensory Profiling Techniques* (pp. 227-245): Woodhead Publishing.
- Armesto, D. (2015). Elaboración de una bebida láctea a base de lactosuero fermentado usando *Streptococcus salivarius* ssp., *Thermophilus* y *Lactobacillus casei* ssp. *Casei*. @LIMENTECH CIENCIA Y TECNOLOGÍA ALIMENTARIA, 13, 13-19. doi: 10.24054/16927125.v1.n1.2015.1612
- Arranz, E., Corrochano, A. R., Shanahan, C., Villalva, M., Jaime, L., Santoyo, S., . . . Giblin, L. (2019). Antioxidant activity and characterization of whey protein-based beverages: Effect of shelf life and gastrointestinal transit on bioactivity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 57, 102209. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102209>
- Arruda, H. S., Silva, E. K., Pereira, G. A., Meireles, M. A. A., & Pastore, G. M. (2020). Inulin thermal stability in prebiotic carbohydrate-enriched araticum whey beverage. *LWT*, 128, 109418. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109418>
- Arsić, S., Bulatović, M., Zarić, D., Kokeza, G., Subić, J., & Rakin, M. (2018). Functional fermented whey carrot beverage-qualitative, nutritive and techno-economic analysis. *Romanian Biotechnological Letters*, 23(2), 13496-13504.
- Atef, M., Chait, Y. A., Ojagh, S. M., Latifi, A. M., Esmaeili, M., Hammami, R., & Udenigwe, C. C. (2021). Anti-Salmonella Activity and Peptidomic Profiling of Peptide Fractions Produced from Sturgeon Fish Skin Collagen (*Huso huso*) Using Commercial Enzymes. *Nutrients*, 13(8). doi:10.3390/nu13082657
- Avila Rodríguez, M. I., Rodríguez Barroso, L. G., & Sánchez, M. L. (2018). Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *J Cosmet Dermatol*, 17(1), 20-26. doi: 10.1111/jocd.12450
- Azi, F., Tu, C., Rasheed, H. A., & Dong, M. (2020). Comparative study of the phenolics, antioxidant and metagenomic composition of novel soy whey-based beverages produced using three different water kefir microbiota. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(4), 1689-1697. doi: <https://doi.org/10.1111/ijfs.14439>
- Baba, W. N., Din, S., Punoo, H. A., Wani, T. A., Ahmad, M., & Masoodi, F. A. (2016). Comparison of cheese and paneer whey for production of a functional pineapple

- beverage: Nutraceutical properties and Shelf life. *J Food Sci Technol*, 53(6), 2558-2568. doi: 10.1007/s13197-016-2218-8
- Barros, E., Silva, C., Canella, M. H., Verruck, S., Prestes, A., Vargas, M., . . . Prudencio, E. (2021). Effect of replacement of milk by block freeze concentrated whey in physicochemical and rheological properties of ice cream. *Food Science and Technology*, 42. doi: 10.1590/fst.12521
- Bayarjargal, M., Lkhagvamaa, E., Zolzaya, B., Enkh-Ariun, A., Oyuntuya, B., Gan-Erdene, T., & Ariun, N. (2021, 2021/10/05). *Antioxidant and Antihypertensive Activity of Collagen and Elastin Hydrolysate at Different Molecular Weights*. Paper presented at the Proceedings of the 5th International Conference on Chemical Investigation and Utilization of Natural Resource (ICCIUNR-2021).
- Bellomo, R., Zarbock, A., & Landoni, G. (2024). Angiotensin II. *Intensive Care Medicine*, 50(2), 279-282. doi: 10.1007/s00134-023-07290-7
- Bhat, J., & Kabelitz, D. (2020). Chapter 1 - An introduction to immunology and epigenetics. In D. Kabelitz & J. Bhat (Eds.), *Epigenetics of the Immune System* (Vol. 16, pp. 1-23): Academic Press.
- Bilek, S. E., & Bayram, S. K. (2015). Fruit juice drink production containing hydrolyzed collagen. *Journal of Functional Foods*, 14, 562-569. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.024>
- Booth, J. S., & Toapanta, F. R. (2021). B and T Cell Immunity in Tissues and Across the Ages. *Vaccines*, 9(1). doi:10.3390/vaccines9010024
- Borrajo, P., Pateiro, M., Barba, F. J., Mora, L., Franco, D., Toldrá, F., & Lorenzo, J. M. (2019). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Peptides Extracted from Meat By-products: a Review. *Food Analytical Methods*, 12(11), 2401-2415. doi: 10.1007/s12161-019-01595-4
- Boscaini, S., Cabrera-Rubio, R., Nychyk, O., Speakman, J. R., Cryan, J. F., Cotter, P. D., & Nilaweera, K. N. (2020). Age-and duration-dependent effects of whey protein on high-fat diet-induced changes in body weight, lipid metabolism, and gut microbiota in mice. *Physiological reports*, 8(15), e14523.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. doi: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brown, M. A., Stevenson, E. J., & Howatson, G. (2018). Whey protein hydrolysate supplementation accelerates recovery from exercise-induced muscle damage in females. *Appl Physiol Nutr Metab*, 43(4), 324-330. doi: 10.1139/apnm-2017-0412
- Buettner, M., & Bode, U. (2012). Lymph node dissection--understanding the immunological function of lymph nodes. *Clin Exp Immunol*, 169(3), 205-212. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04602.x
- Candan, G. G., Cebeci, A., & Ozer, B. (2016). Probiotic dairy beverages: Microbiology and technology (pp. 165-195).
- Ciau-Solís, N., & Betancur-Ancona, D. (2021). Sistema renina-angiotensina (SRA) en las patologías cardiovasculares: papel sobre la hipertensión arterial. *Journal of Negative and No Positive Results*, 6, 163-176.
- Comblain, F., Sanchez, C., Lespoune, I., Balligand, M., Serisier, S., & Henrotin, Y. (2015). Curcuminoids extract, hydrolyzed collagen and green tea extract synergically inhibit inflammatory and catabolic mediator's synthesis by normal

- bovine and osteoarthritic human chondrocytes in monolayer. *PLoS One*, 10(3), e0121654. doi: 10.1371/journal.pone.0121654
- Cong, L., Bremer, P., & Miroso, M. (2020). Functional Beverages in Selected Countries of Asia Pacific Region: A Review. *Beverages*, 6(2). doi:10.3390/beverages6020021
- Coombes, J. L., & Maloy, K. J. (2007). Control of intestinal homeostasis by regulatory T cells and dendritic cells. *Semin Immunol*, 19(2), 116-126. doi: 10.1016/j.smim.2007.01.001
- Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Petruzzi, L., Casanova, F. P., & Sinigaglia, M. (2014). Functional Beverages: The Emerging Side of Functional Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6), 1192-1206. doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12109>
- Corrochano, A. R., Buckin, V., Kelly, P. M., & Giblin, L. (2018). Invited review: Whey proteins as antioxidants and promoters of cellular antioxidant pathways. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 4747-4761. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13618>
- Cui, Q., Sun, Y., Zhou, Z., Cheng, J., & Guo, M. (2021). Effects of Enzymatic Hydrolysis on Physicochemical Properties and Solubility and Bitterness of Milk Protein Hydrolysates. *Foods*, 10(10). doi:10.3390/foods10102462
- Chalamaiah, M., Yu, W., & Wu, J. (2018). Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chem*, 245, 205-222. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.10.087
- Chungchunlam, S. M., Henare, S. J., Ganesh, S., & Moughan, P. J. (2014). Effect of whey protein and glycomacropeptide on measures of satiety in normal-weight adult women. *Appetite*, 78, 172-178.
- da Silva, R. d. N. O., Santos-Eichler, R. A., Dias, C., Rodrigues, S. F., Skiba, D. S., Landgraf, R. G., . . . Akamine, E. H. (2021). Immune spleen cells attenuate the inflammatory profile of the mesenteric perivascular adipose tissue in obese mice. *Scientific Reports*, 11(1), 11153. doi: 10.1038/s41598-021-90600-0
- Deeth, H., & Bansal, N. (2019). Chapter 1 - Whey Proteins: An Overview. In H. C. Deeth & N. Bansal (Eds.), *Whey Proteins* (pp. 1-50): Academic Press.
- Delgado-Ospina, J., Esposito, L., Molina-Hernandez, J. B., Pérez-Álvarez, J. Á., Martuscelli, M., & Chaves-López, C. (2023). Cocoa Shell Infusion: A Promising Application for Added-Value Beverages Based on Cocoa's Production Coproducts. *Foods*, 12(13). doi:10.3390/foods12132442
- Dey, G., & Sireswar, S. (2021). Tailoring functional beverages from fruits and vegetables for specific disease conditions-are we there yet? *Crit Rev Food Sci Nutr*, 61(12), 2034-2046. doi: 10.1080/10408398.2020.1769021
- Di Tommaso, N., Gasbarrini, A., & Ponziani, F. R. (2021). Intestinal Barrier in Human Health and Disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(23). doi:10.3390/ijerph182312836
- Dima, C., Assadpour, E., Dima, S., & Jafari, S. M. (2020). Bioactive-loaded nanocarriers for functional foods: from designing to bioavailability. *Current Opinion in Food Science*, 33, 21-29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.11.006>

- Dinkçi, N., Akdeniz, V., & Akalın, A. S. (2023). Probiotic Whey-Based Beverages from Cow, Sheep and Goat Milk: Antioxidant Activity, Culture Viability, Amino Acid Contents. *Foods*, 12(3). doi:10.3390/foods12030610
- Dullius, A., Fassina, P., Girolodi, M., Goettert, M. I., & Volken de Souza, C. F. (2020). A biotechnological approach for the production of branched chain amino acid containing bioactive peptides to improve human health: A review. *Food Research International*, 131, 109002. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109002>
- 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. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.063>
- Eckmann, L., & Bamias, G. (2022). Mucosal immune system *Yamada's Textbook of Gastroenterology* (pp. 242-270).
- El-Agamy, E. I. (2011). Nutrition and Health | Milk Allergy. In J. W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)* (pp. 1041-1045). San Diego: Academic Press.
- ENSANUT, & Nutrición, E. N. d. S. y. (2020). Hipertensión arterial en adultos mexicanos. Retrieved Mayo 2021, 2021
- Fanelli, S., Zimmermann, A., Totóli, E. G., & Salgado, H. R. N. (2018). FTIR Spectrophotometry as a Green Tool for Quantitative Analysis of Drugs: Practical Application to Amoxicillin. *Journal of Chemistry*, 2018, 3920810. doi: 10.1155/2018/3920810
- Fang, T., & Guo, M. (2019). Physicochemical, texture properties, and microstructure of yogurt using polymerized whey protein directly prepared from cheese whey as a thickening agent. *Journal of Dairy Science*, 102(9), 7884-7894. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16188>
- Ferreira, M. V. S., Cappato, L. P., Silva, R., Rocha, R. S., Guimarães, J. T., Balthazar, C. F., . . . Cruz, A. G. (2019). Ohmic heating for processing of whey-raspberry flavored beverage. *Food Chemistry*, 297, 125018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125018>
- Ferreiro, T., & Rodríguez-Otero, J. L. (2018). Evolution and distribution of phospholipids in cheese and whey during the manufacturing of fresh cheese from cows' milk. *International Journal of Dairy Technology*, 71(3), 820-823. doi: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12499>
- Fountain JH, K. J., Lappin SL. (2023). Physiology, Renin Angiotensin System. . *National Library of Medicine*. doi: [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470410/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470410/)
- Freeman, A. J., Vinh, A., & Widdop, R. E. (2017). Novel approaches for treating hypertension. *F1000Res*, 6, 80. doi: 10.12688/f1000research.10117.1
- Galler, M., Næs, T., L. Almli, V., & Varela, P. (2020). How children approach a CATA test influences the outcome. Insights on ticking styles from two case studies with 6–9-year old children. *Food Quality and Preference*, 86, 104009. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.104009>
- Gao, S., Hong, H., Zhang, C., Wang, K., Zhang, B., Han, Q.-a., . . . Luo, Y. (2019). Immunomodulatory effects of collagen hydrolysates from yak (*Bos grunniens*) bone on cyclophosphamide-induced immunosuppression in BALB/c mice.

- Journal of Functional Foods*, 60, 103420. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103420>
- García-Casas, V. E., Seiquer, I., Pardo, Z., Haro, A., Recio, I., & Olías, R. (2022). Antioxidant Potential of the Sweet Whey-Based Beverage Colada after the Digestive Process and Relationships with the Lipid and Protein Fractions. *Antioxidants*, 11(9). doi:10.3390/antiox11091827
- Gimhani, I., & Liyanage, C. (2019). Development and Quality Evaluation of Ready to Drink Fruit Flavoured Whey Beverage. *International Journal of Scientific and Research Publications (IJSRP)*, 9, p92107. doi: 10.29322/IJSRP.9.08.2019.p92107
- Granato, D., Barba, F. J., Bursać Kovačević, D., Lorenzo, J. M., Cruz, A. G., & Putnik, P. (2020). Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annual Review of Food Science and Technology*, 11(1), 93-118. doi: 10.1146/annurev-food-032519-051708
- Granato, D., Nunes, D. S., & Barba, F. J. (2017). An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends in Food Science & Technology*, 62, 13-22. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.12.010>
- Guo, D. F., Sun, Y. L., Hamet, P., & Inagami, T. (2001). The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins. *Cell Res*, 11(3), 165-180. doi: 10.1038/sj.cr.7290083
- Guo, M. (2019). *Whey Protein Production, Chemistry, Functionality, and Applications*: John Wiley & Sons.
- Gupta, S., Caraballo, M., & Agarwal, A. (2019). Chapter 3.3 - Total Antioxidant Capacity Measurement by Colorimetric Assay. In R. Henkel, L. Samanta & A. Agarwal (Eds.), *Oxidants, Antioxidants and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction* (pp. 207-215): Academic Press.
- Hadrup, S. R., Strindhall, J., Køllgaard, T., Seremet, T., Johansson, B., Pawelec, G., . . . Wikby, A. (2006). Longitudinal studies of clonally expanded CD8 T cells reveal a repertoire shrinkage predicting mortality and an increased number of dysfunctional cytomegalovirus-specific T cells in the very elderly. *J Immunol*, 176(4), 2645-2653. doi: 10.4049/jimmunol.176.4.2645
- Haque, M. A., Morozova, K., Ferrentino, G., & Scampicchio, M. (2021). Electrochemical Methods to Evaluate the Antioxidant Activity and Capacity of Foods: A Review. *Electroanalysis*, 33(6), 1419-1435. doi: <https://doi.org/10.1002/elan.202060600>
- Hariram, N. P., Mekha, K. B., Suganthan, V., & Sudhakar, K. (2023). Sustainalism: An Integrated Socio-Economic-Environmental Model to Address Sustainable Development and Sustainability. *Sustainability*, 15(13). doi:10.3390/su151310682
- He, Y., Shen, L., Ma, C., Chen, M., Pan, Y., Yin, L., . . . Ma, H. (2018). Protein Hydrolysates' Absorption Characteristics in the Dynamic Small Intestine In Vivo. *Molecules*, 23(7). doi:10.3390/molecules23071591
- Heo, S.-Y., Ko, S.-C., Nam, S. Y., Oh, J., Kim, Y.-M., Kim, J.-I., . . . Jung, W.-K. (2018). Fish bone peptide promotes osteogenic differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts through upregulation of MAPKs and Smad pathways activated BMP-2 receptor. *Cell Biochemistry and Function*, 36(3), 137-146. doi: <https://doi.org/10.1002/cbf.3325>

- Hernández-Ledesma, B., García-Nebot, M. J., Fernández-Tomé, S., Amigo, L., & Recio, I. (2014). Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. *International Dairy Journal*, 38(2), 82-100. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.11.004>
- Hernández, C., & Gómez González, R. (2016). Obtención de andamios de colágeno para la restauración del tejido del miocardio. *Revista Cubana de Ingeniería*, VII, 15-24.
- Herreman, L., Nommensen, P., Pennings, B., & Laus, M. C. (2020). Comprehensive overview of the quality of plant- And animal-sourced proteins based on the digestible indispensable amino acid score. *Food Sci Nutr*, 8(10), 5379-5391. doi: 10.1002/fsn3.1809
- Herrera-Ponce, A. L., Salmeron-Ochoa, I., Rodriguez-Figueroa, J. C., Santellano-Estrada, E., Garcia-Galicia, I. A., Vargas-Bello-Pérez, E., & Alarcon-Rojo, A. D. (2022). Effects of Ultrasound versus Pasteurization on Whey&ndash;Oat Beverage Processing: Quality and Antioxidative Properties. *Processes*, 10(8). doi:10.3390/pr10081572
- Hillion, S., Arleevskaya, M. I., Blanco, P., Bordron, A., Brooks, W. H., Cesbron, J. Y., . . . Renaudineau, Y. (2020). The Innate Part of the Adaptive Immune System. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 58(2), 151-154. doi: 10.1007/s12016-019-08740-1
- Hogenboom, J. A., Rosi, V., & Monti, L. (2020). Effect of processing and storage conditions on the evolution of the proteose peptone content in pasteurized and extended shelf-life milk. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 70(6), 24-28.
- Holmes, D. F., Lu, Y., Starborg, T., & Kadler, K. E. (2018). Collagen Fibril Assembly and Function. *Curr Top Dev Biol*, 130, 107-142. doi: 10.1016/bs.ctdb.2018.02.004
- Holwerda, A., & van Loon, L. (2022). The impact of collagen protein ingestion on musculoskeletal connective tissue remodeling: a narrative review. *Nutr Rev*, 80(6), 1497-1514. doi: 10.1093/nutrit/nuab083
- Holwerda, A. M., Paulussen, K. J. M., Overkamp, M., Smeets, J. S. J., Gijzen, A. P., Goessens, J. P. B., . . . van Loon, L. J. C. (2017). Daily resistance-type exercise stimulates muscle protein synthesis in vivo in young men. *Journal of Applied Physiology*, 124(1), 66-75. doi: 10.1152/jappphysiol.00610.2017
- Hong, H., Fan, H., Chalamaiah, M., & Wu, J. (2019). Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): Current progress, challenges, and future perspectives. *Food Chemistry*, 301, 125222. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125222>
- Hou, N.-T., & Chen, B.-H. (2023). Extraction, purification and characterization of collagen peptide prepared from skin hydrolysate of sturgeon fish. *Food Quality and Safety*, 7. doi: 10.1093/fqsafe/fyad033
- Igor, M. B. E., & Vigo, E. F. A. (2019). Formulación y nivel de aceptabilidad de una bebida elaborada a partir de pitahaya (*Selenicereus megalanthus*). *INGENIERÍA: Ciencia, Tecnología e Innovación*, 6(1). doi: 10.26495/icti.v6i1.1080
- Innocente, N., Calligaris, S., Di Filippo, G., Melchior, S., Marino, M., & Nicoli, M. C. (2023). Process design for the production of peptides from whey protein isolate

- with targeted antimicrobial functionality. *International Journal of Food Science & Technology*, 58(5), 2505-2517. doi: <https://doi.org/10.1111/ijfs.16393>
- J, A.-V., López García, R., Zuñiga-Guajardo, S., Riobó-Serván, P., Serra-Majem, L., Suverza-Fernández, A., . . . Laviada-Molina, H. (2017). Análisis de la evidencia disponible para el consumo de edulcorantes no calóricos. *Medicina Interna Méx*, 33(1), 61-83. doi: 10.1155/2020/8031795
- Jahan-Mihan, A., Luhovyy, B. L., El Khoury, D., & Anderson, G. H. (2011). Dietary Proteins as Determinants of Metabolic and Physiologic Functions of the Gastrointestinal Tract. *Nutrients*, 3(5), 574-603. doi:10.3390/nu3050574
- Jakubowicz, D., Wainstein, J., Landau, Z., Ahren, B., Barnea, M., Bar-Dayana, Y., & Froy, O. (2017). High-energy breakfast based on whey protein reduces body weight, postprandial glycemia and HbA1C in Type 2 diabetes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 49, 1-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.07.005>
- Jiang, B., Wang, L., Na, J., Zhang, X., Yuan, Y., Liu, C., & Feng, Z. (2020). Environmentally-friendly strategy for separation of  $\alpha$ -lactalbumin from whey by aqueous two phase flotation. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 3391-3402. doi: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.11.013>
- Jogi, N., Yathisha, U. G., Bhat, I., & Mamatha, B. S. (2022). Antihypertensive activity of orally consumed ACE-I inhibitory peptides. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 62(32), 8986-8999. doi: 10.1080/10408398.2021.1938508
- Kaminarides, S., Zagari, H., & Zoidou, E. (2020). Effect of whey fat content on the properties and yields of whey cheese and serum. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 71(2), 2149-2156.
- Kamoun, E. A., Kenawy, E.-R. S., & Chen, X. (2017). A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of Advanced Research*, 8(3), 217-233. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.01.005>
- Karamoko, G., Renaville, R., & Blecker, C. (2016). Interfacial activities of milk total proteose-peptone: Contribution and miscibility of nonhydrophobic and hydrophobic fractions. *International Dairy Journal*, 61, 29-36. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.03.015>
- Kareb, O., & Aider, M. (2019). Whey and its derivatives for probiotics, prebiotics, synbiotics, and functional foods: a critical review. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(2), 348-369.
- Kato, L. M., Kawamoto, S., Maruya, M., & Fagarasan, S. (2014). The role of the adaptive immune system in regulation of gut microbiota. *Immunol Rev*, 260(1), 67-75. doi: 10.1111/imr.12185
- Kelleher, C. M., Aydogdu, T., Murphy, K. M., O'Mahony, J. A., Kelly, A. L., O'Callaghan, D. J., & McCarthy, N. A. (2020). The effect of protein profile and preheating on denaturation of whey proteins and development of viscosity in milk protein beverages during heat treatment. *International Journal of Dairy Technology*, 73(3), 494-501. doi: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12679>
- Khedkar, R., & Singh, K. (2018). Food industry waste: A panacea or pollution hazard? *Paradigms in Pollution Prevention* (pp. 35-47): Springer.
- Koh, B.-B., Lee, E.-J., Ramachandraiah, K., & Hong, G.-P. (2019). Characterization of bovine serum albumin hydrolysates prepared by subcritical water processing.

- Food Chemistry*, 278, 203-207. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.069>
- Kristoffersen, K. A., Måge, I., Wubshet, S. G., Böcker, U., Riiser Dankel, K., Lislelid, A., . . . Afseth, N. K. (2023). FTIR-based prediction of collagen content in hydrolyzed protein samples. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 301, 122919. doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2023.122919>
- Król, J., Brodziak, A., Zaborska, A., & Litwińczuk, Z. (2017). Comparison of whey proteins and lipophilic vitamins between four cow breeds maintained in intensive production system. *Mljekarstvo/Dairy*, 67(1).
- Krunić, T. Ž., & Rakin, M. B. (2022). Enriching alginate matrix used for probiotic encapsulation with whey protein concentrate or its trypsin-derived hydrolysate: Impact on antioxidant capacity and stability of fermented whey-based beverages. *Food Chemistry*, 370, 130931. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130931>
- Kumar, R., Chauhan, S. K., Shinde, G., Subramanian, V., & Nadasabapathi, S. (2018). Whey Proteins: A potential ingredient for food industry-A review. *Asian Journal of Dairy & Food Research*, 37(4).
- Kumar, S., Dhir, A., Talwar, S., Chakraborty, D., & Kaur, P. (2021). What drives brand love for natural products? The moderating role of household size. *Journal of Retailing and Consumer Services*, 58, 102329. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jretconser.2020.102329>
- Kurtz, A. (2012). Control of renin synthesis and secretion. *Am J Hypertens*, 25(8), 839-847. doi: 10.1038/ajh.2011.246
- Lappa, I. K., Papadaki, A., Kachrimanidou, V., Terpou, A., Koulougliotis, D., Eriotou, E., & Kopsahelis, N. (2019). Cheese Whey Processing: Integrated Biorefinery Concepts and Emerging Food Applications. *Foods*, 8(8). doi: 10.3390/foods8080347
- Larsen, S. B., Cowley, C. J., & Fuchs, E. (2020). Epithelial cells: liaisons of immunity. *Curr Opin Immunol*, 62, 45-53. doi: 10.1016/j.coi.2019.11.004
- Lee, S. Y., & Hur, S. J. (2017). Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. *Food Chemistry*, 228, 506-517. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.039>
- León-López, A., Fuentes-Jiménez, L., Hernández-Fuentes, A. D., Campos-Montiel, R. G., & Aguirre-Álvarez, G. (2019). Hydrolysed Collagen from Sheepskins as a Source of Functional Peptides with Antioxidant Activity. *International Journal Molecular Sciences*, 20(16). doi: 10.3390/ijms20163931
- León-López, A., Morales-Peñaloza, A., Martínez-Juárez, V., Vargas-Torres, A., Zeugolis, D., & Aguirre-Álvarez, G. (2019). Hydrolyzed Collagen—Sources and Applications. *Molecules*, 24(22). doi:10.3390/molecules24224031
- León-López, A., Pérez-Marroquín, X. A., Campos-Lozada, G., Campos-Montiel, R. G., & Aguirre-Álvarez, G. (2020). Characterization of Whey-Based Fermented Beverages Supplemented with Hydrolyzed Collagen: Antioxidant Activity and Bioavailability. *Foods*, 9(8), 1106.
- Li, Y., Liu, Y., Li, R., Bai, H., Zhu, Z., Zhu, L., . . . Huang, L. (2021). Collagen-based biomaterials for bone tissue engineering. *Materials & Design*, 210, 110049. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2021.110049>

- Lima, A., Nicolau, E., Minafra-Rezende, C., Torres, M., Novais, L., & Soares, N. (2016). Characterization and sensory preference of fermented dairy beverages prepared with different concentrations of whey and araticum pulp. *Semina: Ciências Agrárias*, 37, 4011. doi: 10.5433/1679-0359.2016v37n6p4011
- Lin, P., Hua, N., Hsu, Y. C., Kan, K. W., Chen, J. H., Lin, Y. H., . . . Kuan, C. M. (2020). Oral Collagen Drink for Antiaging: Antioxidation, Facilitation of the Increase of Collagen Synthesis, and Improvement of Protein Folding and DNA Repair in Human Skin Fibroblasts. 2020, 8031795. doi: 10.1155/2020/8031795
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E. S., Gómez, B., Barba, F. J., Mora, L., Pérez-Santaescolástica, C., & Toldrá, F. (2018). Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 79, 136-147. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.003>
- Lupu, M.-A., Gradisteanu Pircalabioru, G., Chifiriuc, M.-C., Albulescu, R., & Tanase, C. (2020). Beneficial effects of food supplements based on hydrolyzed collagen for skin care (Review). *Experimental and therapeutic medicine*, 20(1), 12-17. doi: 10.3892/etm.2019.8342
- Ly, B. C. K., Dyer, E. B., Feig, J. L., Chien, A. L., & Del Bino, S. (2020). Research Techniques Made Simple: Cutaneous Colorimetry: A Reliable Technique for Objective Skin Color Measurement. *J Invest Dermatol*, 140(1), 3-12.e11. doi: 10.1016/j.jid.2019.11.003
- Mabbott, N. A., Donaldson, D. S., Ohno, H., Williams, I. R., & Mahajan, A. (2013). Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunology*, 6(4), 666-677. doi: 10.1038/mi.2013.30
- Maleš, I., Pedisić, S., Zorić, Z., Elez-Garofulić, I., Repajić, M., You, L., . . . Dragović-Uzelac, V. (2022). The medicinal and aromatic plants as ingredients in functional beverage production. *Journal of Functional Foods*, 96, 105210. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105210>
- 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. *J Food Sci Technol*, 52(6), 3235-3241. doi: 10.1007/s13197-014-1361-3
- McDole, J. R., Wheeler, L. W., McDonald, K. G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K. A., . . . Miller, M. J. (2012). Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature*, 483(7389), 345-349. doi: 10.1038/nature10863
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., . . . Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113-1124. doi: 10.1039/C3FO60702J
- Minj, S., & Anand, S. (2020). Whey Proteins and Its Derivatives: Bioactivity, Functionality, and Current Applications. *Dairy*, 1(3), 233-258. doi:10.3390/dairy1030016
- Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, 14(10), 667-685. doi: 10.1038/nri3738

- Mudgil, D., & Barak, S. (2019). 3 - Dairy-Based Functional Beverages. In A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Milk-Based Beverages* (pp. 67-93): Woodhead Publishing.
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). doi:10.3390/ijms22073380
- Naik, B., Kohli, D., Walter, N., Gupta, A. K., Mishra, S., Khan, J. M., . . . Kumar, V. (2023). Whey-carrot based functional beverage: Development and storage study. *Journal of King Saud University - Science*, 35(6), 102775. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102775>
- Nakchum, L., & Kim, S. M. (2016). Preparation of squid skin collagen hydrolysate as an antihyaluronidase, antityrosinase, and antioxidant agent. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 46(2), 123-130. doi: 10.1080/10826068.2014.995808
- Natsir, H., Dali, S., Sartika, Leliani, & Arif, A. (2021). ENZYMATIC HYDROLYSIS OF COLLAGEN FROM YELLOWFIN TUNA BONES AND ITS POTENTIAL AS ANTIBACTERIAL AGENT. *Rasayan Journal of Chemistry*, 14, 594-600. doi: 10.31788/RJC.2021.1415914
- Nazir, M., Arif, S., Khan, R. S., Nazir, W., Khalid, N., & Maqsood, S. (2019). Opportunities and challenges for functional and medicinal beverages: Current and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 513-526. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.011>
- Nicholson, L. B. (2016). The immune system. *Essays Biochem*, 60(3), 275-301. doi: 10.1042/ebc20160017
- Nurilmala, M., Hizbullah, H., Karnia, Kusumaningtyas, E., & Ochiai. (2020). Characterization and Antioxidant Activity of Collagen, Gelatin, and the Derived Peptides from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Skin. *Marine Drugs*, 18, 98. doi: 10.3390/md18020098
- Orrù, S., Imperlini, E., Nigro, E., Alfieri, A., Cevenini, A., Polito, R., . . . Mancini, A. (2018). Role of Functional Beverages on Sport Performance and Recovery. *Nutrients*, 10(10). doi: 10.3390/nu10101470
- Osorio-González, C. S., Sandoval-Salas, F., Hernández-Rosas, F., Hidalgo-Contreras, J. V., Gómez-Merino, F. C., & Ávalos de la Cruz, D. A. (2018). Potential for the use of cheese whey in Mexico *Agro Productividad*, 11(7), 101-106.
- Pathare, P. B., Opara, U. L., & Al-Said, F. A.-J. (2013). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 36-60. doi: 10.1007/s11947-012-0867-9
- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 141-153. doi: 10.1038/nri3608
- Pinheiro, V., Volino, M., Vieira de Oliveira, G., Monteiro, M., Aquino, A., Conte Junior, C., & Alvares, T. (2024). Physicochemical and protein profile of goat whey powder. *Ciência Rural*, 54. doi: 10.1590/0103-8478cr20220317
- Pires, A. F., Marnotes, N. G., Rubio, O. D., Garcia, A. C., & Pereira, C. D. (2021). Dairy By-Products: A Review on the Valorization of Whey and Second Cheese Whey. *Foods*, 10(5). doi:10.3390/foods10051067

- Pratiwi, A., Hakim, T. R., Abidin, M. Z., Fitriyanto, N. A., Jamhari, J., Rusman, R., & Erwanto, Y. (2021). Angiotensin-converting enzyme inhibitor activity of peptides derived from Kacang goat skin collagen through thermolysin hydrolysis. *Vet World*, *14*(1), 161-167. doi: 10.14202/vetworld.2021.161-167
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, *110*, 48-68. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>
- Quitral R, V., Pinheiro F, A. C., Carrera P, C., Gallo U, G., Moyano S, P., Salinas V, J., & Jimenez P, P. (2015). Efecto de edulcorantes no calóricos en la calidad sensorial de jugo de naranja. *Revista chilena de nutrición*, *42*, 77-82.
- Rachmawati, H., Soraya, I. S., Kurniati, N. F., & Rahma, A. (2016). In Vitro Study on Antihypertensive and Antihypercholesterolemic Effects of a Curcumin Nanoemulsion. *Sci Pharm*, *84*(1), 131-140. doi: 10.3797/scipharm.ISP.2015.05
- Ramos, O. L., Pereira, R. N., Rodrigues, R. M., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Malcata, F. X. (2016). Whey and Whey Powders: Production and Uses. In B. Caballero, P. M. Finglas & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 498-505). Oxford: Academic Press.
- Rocha-Mendoza, D., Kosmerl, E., Krentz, A., Zhang, L., Badiger, S., Miyagusuku-Cruzado, G., . . . García-Cano, I. (2021). Invited review: Acid whey trends and health benefits. *Journal of Dairy Science*, *104*(2), 1262-1275. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19038>
- Rocha, J. d. C. G., Viana, K. W. C., Mendonça, A. C., Neves, N. d. A., Carvalho, A. F. d., Minim, V. P. R., . . . Stringheta, P. C. (2019). Protein beverages containing anthocyanins of jaboticaba. *Food Science and Technology*, *39*.
- Rodríguez-Villacis, D. H., & Hernández-Monzón, A. (2017). Desarrollo de una bebida fermentada de suero con la adición de jugo de Aloe vera y pulpa de fruta. *Tecnología Química*, *37*, 40-50.
- Ruiz-Capillas, C., & Herrero, A. M. (2021). Sensory Analysis and Consumer Research in New Product Development. *Foods*, *10*(3). doi: 10.3390/foods10030582
- Saati, E. A., Ilma, R., Wibawani, S., Winarsih, S., & Wahyudi, V. A. (2022). Non-alcohol rose-apple antioxidant drink with halal fish collagen hydrolysate. *AIP Conference Proceedings*, *2534*(1), 040004. doi: 10.1063/5.0105734
- Sağlam, H., Sarioglu, T., Karahan, A., & Oner, Z. (2019). An investigation for the development of whey-based probiotic beverages. *Romanian Biotechnological Letters*, *24*, 1097-1106. doi: 10.25083/rbl/24.6/1097.1106
- Saha, P., Ghatak, S., Bag, T., Hazra, P., Saha, & Ray, P. (2017). Physico-chemical quality and storage stability of fermented Chhana whey beverages. *70*, 398-403.
- Salvatore, L., Gallo, N., Natali, M. L., Terzi, A., Sannino, A., & Madaghiele, M. (2021). Mimicking the Hierarchical Organization of Natural Collagen: Toward the Development of Ideal Scaffolding Material for Tissue Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*, *9*, 644595. doi: 10.3389/fbioe.2021.644595
- Sangshetti, J., Pathan, S. K., Patil, R., Akber Ansari, S., Chhajed, S., Arote, R., & Shinde, D. B. (2019). Synthesis and biological activity of structurally diverse phthalazine derivatives: A systematic review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *27*(18), 3979-3997. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.07.050>
- Sato, K., Jimi, S., & Kusubata, M. (2019). Generation of bioactive prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp) by oral administration of collagen hydrolysate and degradation of

- endogenous collagen. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(6), 1976-1980. doi: <https://doi.org/10.1111/ijfs.14145>
- Schlatterer, B., Baeker, R., & Schlatterer, K. (2004). Improved purification of  $\beta$ -lactoglobulin from acid whey by means of ceramic hydroxyapatite chromatography with sodium fluoride as a displacer. *Journal of Chromatography B*, 807(2), 223-228. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.04.013>
- Schmidt, M., Fontoura, A., Vidal, A., Prestes Dornelles, R., Kubota, E., Mello, R., . . . Soltovski, C. (2020). Characterization of hydrolysates of collagen from mechanically separated chicken meat residue. *Food Science and Technology*, 40. doi: 10.1590/fst.14819
- Sebastián-Nicolás, J. L., González-Olivares, L. G., Vázquez-Rodríguez, G. A., Lucho-Constantino, Carlos A., Castañeda-Ovando, A., & Cruz-Guerrero, A. E. (2020). Valorization of whey using a biorefinery. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 14(5), 1010-1027. doi: <https://doi.org/10.1002/bbb.2100>
- Seo, J., Lee, B. C., & Zuckermann, R. N. (2011). 2.204 - Peptoids: Synthesis, Characterization, and Nanostructures. In P. Ducheyne (Ed.), *Comprehensive Biomaterials* (pp. 53-76). Oxford: Elsevier.
- Sharma, N., Basant, B., & Vyas, J. (2022). Determination of storage stability of Aloe vera based whey beverage prepared from camel and goat milk *Ther Pharma Innovation Journal*, 11(7), 1927-1929.
- Shenana, M., El-Alfy, M., El-Nagar, G., & El-Barbary, A. (2020). Physico-Chemical and Functional Properties of Functional Yoghurt Made With Different Types of Whey Protein Concentrates (Wpc).
- Shokri, S., & Ehsani, A. (2017). Efficacy of whey protein coating incorporated with lactoperoxidase and  $\alpha$ -tocopherol in shelf life extension of Pike-Perch fillets during refrigeration. *LWT - Food Science and Technology*, 85, 225-231. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.026>
- Si, S., Guo, Y., Xu, B., Qin, Y., & Song, S. (2021). Protective Effects of Collagen Peptides on the Dexamethasone-Induced Immunosuppression in Mice. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(2), 1493-1499. doi: 10.1007/s10989-021-10187-y
- SIAP. (2019). Producción Ganadera. SIAP from <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pecuaria>
- Sibilla, S., Godfrey, M., Brewer, S., Budh-Raja, A., & Genovese, L. (2015). An overview of the beneficial effects of hydrolysed collagen as a nutraceutical on skin properties: Scientific Background and Clinical Studies *The Open Nutraceuticals Journal*, 8, 29-42. doi: 10.2174/1876396001508010029
- Silva, F., Duarte, A. M., Mendes, S., Pinto, F. R., Barroso, S., Ganhão, R., & Gil, M. M. (2020). CATA vs. FCP for a rapid descriptive analysis in sensory characterization of fish. *Journal of Sensory Studies*, 35(6), e12605. doi: <https://doi.org/10.1111/joss.12605>
- Silveira, M. R., Coutinho, N. M., Esmerino, E. A., Moraes, J., Fernandes, L. M., Pimentel, T. C., . . . Cruz, A. G. (2019). Guava-flavored whey beverage processed by cold plasma technology: Bioactive compounds, fatty acid profile and volatile compounds. *Food Chemistry*, 279, 120-127. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.128>

- Singh, A., Duche, R. T., Wandhare, A. G., Sian, J. K., Singh, B. P., Sihag, M. K., . . . Panwar, H. (2023). Milk-Derived Antimicrobial Peptides: Overview, Applications, and Future Perspectives. *15*(1), 44-62. doi: 10.1007/s12602-022-10004-y
- Singh, N., Kaur, P., & Katyal, M. (2023). 2.14 - Challenges and Strategies for Utilization of Pulse Proteins. In P. Ferranti (Ed.), *Sustainable Food Science - A Comprehensive Approach* (pp. 184-191). Oxford: Elsevier.
- Singh, S., Khemariya, P., & Rai, A. (2014). Process optimization for the manufacture of lemon based beverage from hydrolyzed whey. *Journal of food science and technology*, *51*(4), 691-699.
- Singh, S., Khemariya, P., & Rai, A. (2014). Process optimization for the manufacture of lemon based beverage from hydrolyzed whey. *J Food Sci Technol*, *51*(4), 691-699. doi: 10.1007/s13197-011-0563-1
- Škrovánková, S., Mišurcová, L., & Machů, L. (2012). Chapter Three - Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants. In J. Henry (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 67, pp. 75-139): Academic Press.
- Skrzypczak, K., Gustaw, W., Fornal, E., Kononiuk, A., Michalak-Majewska, M., Radzki, W., & Waško, A. (2020). Functional and Technological Potential of Whey Protein Isolate in Production of Milk Beverages Fermented by New Strains of *Lactobacillus helveticus*. *Applied Sciences*, *10*(20). doi: 10.3390/app10207089
- Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. *International Dairy Journal*, *18*(7), 695-704. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.008>
- Taga, Y., Hayashida, O., Ashour, A., Amen, Y., Kusubata, M., Ogawa-Goto, K., . . . Hattori, S. (2018). Characterization of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of X-Hyp-Gly-Type Tripeptides: Importance of Collagen-Specific Prolyl Hydroxylation. *J Agric Food Chem*, *66*(33), 8737-8743. doi: 10.1021/acs.jafc.8b03648
- Taga, Y., Iwasaki, Y., Tometsuka, C., Funato, N., Shigemura, Y., Kusubata, M., & Mizuno, K. (2022). Identification of a highly stable bioactive 3-hydroxyproline-containing tripeptide in human blood after collagen hydrolysate ingestion. *npj Science of Food*, *6*(1), 29. doi: 10.1038/s41538-022-00144-4
- Tallapragada, P., & Rayavarapu, B. (2019). 5 - Recent Trends and Developments in Milk-Based Beverages. In A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Milk-Based Beverages* (pp. 139-172): Woodhead Publishing.
- Thaiss Christoph, A., Levy, M., Grosheva, I., Zheng, D., Soffer, E., Blacher, E., . . . Elinav, E. (2018). Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. *Science*, *359*(6382), 1376-1383. doi: 10.1126/science.aar3318
- Thapa, P., & Farber, D. L. (2019). The Role of the Thymus in the Immune Response. *Thorac Surg Clin*, *29*(2), 123-131. doi: 10.1016/j.thorsurg.2018.12.001
- Thomopoulos, R., Baudrit, C., Boukhelifa, N., Boutrou, R., Buche, P., Guichard, E., . . . Tonda, A. (2019). Multi-Criteria Reverse Engineering for Food: Genesis and Ongoing Advances. *Food Engineering Reviews*, *11*(1), 44-60. doi: 10.1007/s12393-018-9186-x
- 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. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.025>

- Tunick, M. H. (2008). Whey protein production and utilization: a brief history. *Whey processing, functionality and health benefits*, 1-13.
- Urtasun, N., Baieli, M. F., Hirsch, D. B., Martínez-Ceron, M. C., Cascone, O., & Wolman, F. J. (2017). Lactoperoxidase purification from whey by using dye affinity chromatography. *Food and Bioproducts Processing*, 103, 58-65. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.02.011>
- Valdez Castillo, M., Laxman Pachapur, V., Brar, S. K., Naghdi, M., Arriaga, S., & Ávalos Ramirez, A. (2020). Yeast-driven whey biorefining to produce value-added aroma, flavor, and antioxidant compounds: technologies, challenges, and alternatives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(7), 930-950. doi: 10.1080/07388551.2020.1792407
- Vidal, A. R., Cansian, R. L., Mello, R. D., Demiate, I. M., Kempka, A. P., Dornelles, R. C., . . . Campagnol, P. C. (2022). Production of Collagens and Protein Hydrolysates with Antimicrobial and Antioxidant Activity from Sheep Slaughter By-Products. *Antioxidants*, 11(6). doi:10.3390/antiox11061173
- Wainaina, S., Awasthi, M. K., Sarsaiya, S., Chen, H., Singh, E., Kumar, A., . . . Taherzadeh, M. J. (2020). Resource recovery and circular economy from organic solid waste using aerobic and anaerobic digestion technologies. *Bioresource Technology*, 301, 122778. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122778>
- Wang, B., Timilsena, Y. P., Blanch, E., & Adhikari, B. (2017). Characteristics of bovine lactoferrin powders produced through spray and freeze drying processes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 985-994. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.087>
- Wang, Q., Chen, G. Q., & Kentish, S. E. (2020). Isolation of lactoferrin and immunoglobulins from dairy whey by an electro dialysis with filtration membrane process. *Separation and Purification Technology*, 233, 115987. doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.115987>
- Weisgarber, K. D., Candow, D. G., & Farthing, J. P. (2015). Whey protein and high-volume resistance training in postmenopausal women. *The journal of nutrition, health & aging*, 19(5), 511-517. doi: 10.1007/s12603-015-0454-7
- Xiong, L., Li, C., Boeren, S., Vervoort, J., & Hettinga, K. (2020). Effect of heat treatment on bacteriostatic activity and protein profile of bovine whey proteins. *Food Research International*, 127, 108688. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108688>
- Xue, B., Zhang, Z., Roncari, C. F., Guo, F., & Johnson, A. K. (2012). Aldosterone acting through the central nervous system sensitizes angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*, 60(4), 1023-1030. doi: 10.1161/hypertensionaha.112.196576
- Yadav, J. S. S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 33(6, Part 1), 756-774. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>
- Yazaki, M., Ito, Y., Yamada, M., Goulas, S., Teramoto, S., Nakaya, M. A., . . . Yamaguchi, K. (2017). Oral Ingestion of Collagen Hydrolysate Leads to the Transportation of Highly Concentrated Gly-Pro-Hyp and Its Hydrolyzed Form of

- Pro-Hyp into the Bloodstream and Skin. *J Agric Food Chem*, 65(11), 2315-2322. doi: 10.1021/acs.jafc.6b05679
- Yin, Y., Qin, J., Dai, Y., Zeng, F., Pei, H., & Wang, J. (2015). The CD4+/CD8+ Ratio in Pulmonary Tuberculosis: Systematic and Meta-Analysis Article. *Iran J Public Health*, 44(2), 185-193.
- Yu, Z., Wu, S., Zhao, W., Mi, G., Ding, L., Li, J., & Liu, J. (2020). Identification of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from collagen hydrolysates and its molecular inhibitory mechanism. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(9), 3145-3152. doi: <https://doi.org/10.1111/ijfs.14578>
- Zaman, Q. U., Sahar, A., Sameen, A., Ahmad, M. H., Muhammad, N., Huma, N., . . . Al-Farga, A. (2023). Development and Storage Stability of Whey Sugarcane Based Functional Beverage. *International Journal of Food Properties*, 26(1), 752-763. doi: 10.1080/10942912.2023.2183170
- Zhang, J.-B., Zhao, Y.-Q., Wang, Y.-M., Chi, C.-F., & Wang, B. (2019). Eight Collagen Peptides from Hydrolysate Fraction of Spanish Mackerel Skins: Isolation, Identification, and In Vitro Antioxidant Activity Evaluation. *Marine Drugs*, 17(4). doi:10.3390/md17040224
- Zhang, Y., Chen, Z., Liu, X., Shi, J., Chen, H., & Gong, Y. (2021). SEM, FTIR and DSC Investigation of Collagen Hydrolysate Treated Degraded Leather. *Journal of Cultural Heritage*, 48, 205-210. doi: <https://doi.org/10.1016/j.culher.2020.11.007>
- Zhao, W.-H., Luo, Q.-B., Pan, X., Chi, C.-F., Sun, K.-L., & Wang, B. (2018). Preparation, identification, and activity evaluation of ten antioxidant peptides from protein hydrolysate of swim bladders of miiuy croaker (*Miichthys miiuy*). *Journal of Functional Foods*, 47, 503-511. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.06.014>
- Zhu, X., & Zhu, J. (2020). CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21). doi:10.3390/ijms21218011

## 8 ANEXOS

### Anexo 1



Instituto de Ciencias Agropecuarias  
Área Académica de Ingeniería Agroindustria e Ingeniería en Alimentos  
Doctorado en Ciencias Agropecuarias



FECHA: \_\_\_\_\_ SEXO: \_\_\_\_\_ EDAD: \_\_\_\_\_

ESCOLARIDAD: \_\_\_\_\_ LUGAR DE PROCEDENCIA: \_\_\_\_\_

Los alimentos funcionales son aquellos que ofrecen la posibilidad de mejorar la salud y/o prevenir ciertas enfermedades. Entre ellas se encuentran los productos enriquecidos con omega 3, con fibra, bebidas o productos derivados de la leche.

Frente a usted se presenta la muestra **578** marque con una cruz las características que la describan

1.- Observe la muestra ¿Qué color identifica?

- |   |   |  |
|---|---|--|
| <input type="checkbox"/> Color café con leche | <input type="checkbox"/> Claro          | <input type="checkbox"/> Intenso           |
| <input type="checkbox"/> Oscuro               | <input type="checkbox"/> Color café     | <input type="checkbox"/> Color arena       |
| <input type="checkbox"/> Opaco                | <input type="checkbox"/> Pálido         | <input type="checkbox"/> Brillante         |
| <input type="checkbox"/> Luminoso             | <input type="checkbox"/> Poco brillante | <input type="checkbox"/> Color café oscuro |
| <input type="checkbox"/> Grumoso              | <input type="checkbox"/> Sedimento      | <input type="checkbox"/> Olor café claro   |
| <input type="checkbox"/> Otros: _____         |   |  |

2.- Al oler la muestra ¿Qué olores presenta?

- |                                       |                                    |                                       |
|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Ácido        | <input type="checkbox"/> Leche     | <input type="checkbox"/> Dulce        |
| <input type="checkbox"/> Lactosuero   | <input type="checkbox"/> Chocolate | <input type="checkbox"/> Agradable    |
| <input type="checkbox"/> Desagradable | <input type="checkbox"/> Agrio     | <input type="checkbox"/> Queso fresco |
| <input type="checkbox"/> Otros: _____ |                                    |                                       |

3.-¿Qué sabores percibe en la muestra?

- |   |                                 |   |
|---|---------------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> Salado         | <input type="checkbox"/> Amargo | <input type="checkbox"/> Dulce                          |
| <input type="checkbox"/> Queso fresco   | <input type="checkbox"/> Yogur  | <input type="checkbox"/> Chocolate                      |
| <input type="checkbox"/> Ácido          | <input type="checkbox"/> Leche  | <input type="checkbox"/> Fermentado                     |
| <input type="checkbox"/> Lácteo         | <input type="checkbox"/> Café   | <input type="checkbox"/> Lactosuero                     |
| <input type="checkbox"/> Leche en polvo | <input type="checkbox"/> Agrio  | <input type="checkbox"/> Astringente (sequedad en boca) |
| <input type="checkbox"/> Otros: _____   |                                 |   |

4.- Al ingerir el producto ¿le deja un sabor específico en la garganta (Resabio)?

- Dulce     Amargo     Ácido     Agrio     Otro \_\_\_\_\_

5.- ¿Qué tanto le gusta el producto?

- Me gusta mucho  
 Me gusta  
 No me gusta ni me disgusta  
 Me disgusta  
 Me disgusta mucho

¡Gracias por su participación!

## Anexo 2

Escolaridad		Visual		Olor		Sabor		Resabio		Preferencia	
Ordinal	Discreta	Ordinal	Discreta	Ordinal	Discreta	Ordinal	Discreta	Ordinal	Discreta	Ordinal	Discreta
Primaria	6	Café claro	1	Desagradable	1	Salado	1	Agrio	1	Me disgusta mucho	1
Secundaria	9	Arena	2	Agrio	2	Agrio	2	Amargo	2	Me disgusta	2
Preparatoria	12	Pálido	3	Acido	3	Amargo	3	Acido	3	No me gusta ni me disgusta	3
Licenciatura	16	Opaco	4	Lactosuero	4	Astringente	4	Dulce	4	Me gusta	4
Posgrado	18	Poco brillante	5	Queso fresco	5	Café	5			Me gusta mucho	5
		Sedimento	6	Leche	6	Acido	6				
		Grumoso	7	Chocolate	7	Fermentado	7				
		Luminoso	8	Dulce	8	Lactosuero	8				
		Café con leche	9	Agradable	9	Lácteo	9				
		Café	10			Leche en polvo	10				
		Brillante	11			Leche	11				
		Café oscuro	12			Queso fresco	12				
		Intenso	13			Yogur	13				
		Oscuro	14			Chocolate	14				
						Dulce	15				

Review

# Agro-Food Waste as an Ingredient in Functional Beverage Processing: Sources, Functionality, Market and Regulation

Xóchitl Alejandra Pérez-Marroquín <sup>1</sup>, Ana Guadalupe Estrada-Fernández <sup>2</sup>, Adelfo García-Ceja <sup>3</sup>, Gabriel Aguirre-Álvarez <sup>1</sup>  and Arely León-López <sup>3,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Universidad Km. 1 Rancho Universitario, Tulancingo C.P. 43600, Hidalgo, Mexico; xochitl\_perez@uaeh.edu.mx (X.A.P.-M.); aguirre@uaeh.edu.mx (G.A.-Á.)
- <sup>2</sup> Instituto Tecnológico Superior del Oriente del Estado de Hidalgo, Carretera Apan-Tepeapulco Km 3.5, Colonia Las Peñitas, Apan C.P. 43900, Hidalgo, Mexico; aestrada@itesa.edu.mx
- <sup>3</sup> Instituto Tecnológico Superior de Venustiano Carranza, Av. Tecnológico S/N, Col. el Huasteco, Ciudad Lázaro Cárdenas, Venustiano Carranza C.P. 73049, Puebla, Mexico; adelfo.ceja@vcarranza.tecnm.mx
- \* Correspondence: arely.leon@itsvc.edu.mx; Tel: +52-7757847540

**Abstract:** Waste generated from the agro-food industry represents a concerning environmental, social and economic issue. The Food and Agriculture Organization of the United Nations defines food waste as all food that decreases in quantity or quality to the extent that it is thrown out by food service providers and consumers. The FAO reports that 17% of worldwide food production may be wasted. Food waste may include fresh products, food close to the expiration date discarded by retailers and food products from household kitchens and eating establishments. However, food waste offers different possibilities to extract functional ingredients from different sources, such as dairy, cereals, fruits, vegetables, fibers, oils, dye and bioactive compounds. The optimization of agro-food waste as an ingredient will help in the development and innovation of food products to generate functional food and beverages to prevent and treat several diseases in consumers.

**Keywords:** food waste; agro-food industry; functional beverages; regulation



Citation: Pérez-Marroquín, X.A.; Estrada-Fernández, A.G.; García-Ceja, A.; Aguirre-Álvarez, G.; León-López, A. Agro-Food Waste as an Ingredient in Functional Beverage Processing: Sources, Functionality, Market and Regulation. *Foods* 2023, 12, 1583. <https://doi.org/10.3390/foods12081583>

Academic Editors: Manuela Vieira da Silva, Edgar Pinto, Ana Pinto de Moura and Manuela Vaz Velho

Received: 7 March 2023  
Revised: 1 April 2023  
Accepted: 6 April 2023  
Published: 8 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

At present, waste from the agro-food industry is now both an environmental problem and a major social and economic issue. The Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) refers to food waste as all food that is compromised in quantity or quality by food providers and consumers. Food waste comes in many forms: (a) fresh products that are removed from the supply chain during sorting operations and do not have the optimal size, color and/or other characteristics of the base product; (b) food that is close to its expiry date and is discarded by retailers and consumers; and (c) all food from household kitchens and food service operations [1–4]. Food waste can also be food that has lost quantity, quality and/or safety at any stage of the food processing chain, including during post-production processes such as handling, storage, transport and processing, preservation and packaging [1,3]. Food waste mainly includes vegetable waste such as peels, stems, seeds, shells, bran, pulp and residues. Animal sources include waste from animal husbandry, dairy processing, seafood and the slaughter process [5,6]. The FAO reports that 17.0% of global food production is generated as waste and 14.0% of food production is lost during the production chain. A total of 26.0% of food waste comes from the beverage industry, 21.0% from the dairy industry, 14.5% from fruit/vegetable production and processing, 12.5% from grain processing, 8.0% from meat processing and preservation, 3.5% from the animal and vegetable oil industries and 0.5% from fish production and processing (Figure 1) [7–9]. Food waste is usually disposed of in landfills or used to make compost, but the waste is a potential

# AMIDIQ

Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.



## XLIV

ENCUENTRO NACIONAL DE LA

## AMIDIQ

Investigación e industria: inclusión, retos y oportunidades para la Ingeniería Química en México

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.

otorga el presente

## RECONOCIMIENTO

a:

**Xochitl Alejandra Pérez Marroquín, Arelly León López, Rafael Germán Campos Montiel, Rosa Hayde Alfaro Rodríguez, Constantino López Macias, Gabriel Aguirre Álvarez.**

**Por la presentación del trabajo:**

**Elaboración y caracterización de una bebida funcional a partir de lactosuero hidrolizado adicionada con colágeno hidrolizado y cocoa**

En el área de INGENIERÍA DE ALIMENTOS en modalidad ORAL

ID: 300

XLIV Encuentro Nacional de la AMIDIQ

# UDLAP

  
Dr. Ramón Rosas Hernández  
Presidente del Comité Organizador

  
Dr. Jorge Ramón Robledo Ortiz  
Presidente Nacional de la AMIDIQ

  
Dr. Tomás Viveros García  
Presidente del Comité Técnico

Huatuleo, Oaxaca, México 30 de mayo al 2 de junio de 2023

# AMIDIQ

Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A. C.

Otorga el presente

### RECONOCIMIENTO

a:

**Xochitl Alejandra Pérez Marroquín, Arely León López, Rubén Alvarado Jiménez, Rosa Hayde Alfaro Rodríguez, Constantino López Macias,  
Gabriel Aguirre Álvarez**

Por la presentación del trabajo

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y BIODISPONIBILIDAD DE UNA BEBIDA A BASE DE HIDROLIZADOS PROTEICOS**

En el área de **INGENIERÍA DE ALIMENTOS** en modalidad **CARTEL**

ID.26

Presentado en el XLV Encuentro Nacional de la AMIDIQ

La Inteligencia Artificial en la Ingeniería Química: Pasado, Presente y Futuro,  
realizado en Ixtapa - Zihuatanejo, Guerrero, México del 07 al 10 de mayo de 2024

Dr. Eduardo Salvador Pérez Cisneros  
Presidente  
Comité Organizador UAM

Dra. Nelly Ramírez Corona  
Presidenta  
Consejo Directivo de la AMIDIQ

Dr. Jesús Alberto Ochoa Tapia  
Presidente  
Comité Técnico