



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA, ANIMALI, ALIMENTI, RISORSE NATURALI
E AMBIENTE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN:
SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

**“Caratteristiche di integratori proteici
derivati dal siero del latte”**

Relatore Prof. Fernando Formaggio

Laureando Morgan Lubiato

Matricola n. 1228714

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

❖	INDICE	
❖	RIASSUNTO/ABSTRACT	Pag. 1
❖	Capitolo 1: INTRODUZIONE	
➤	1.1 Premessa	Pag. 2
➤	1.2 Scopo.....	Pag. 3
❖	Capitolo 2: IL SIERO DEL LATTE	
➤	2.1 Produzione	Pag. 4
➤	2.2 Composizione	Pag. 6
▪	2.2.1 Composizione proteica	Pag. 7
❖	Capitolo 3: INTEGRATORI PROTEICI IN POLVERE DERIVATI DAL SIERO DEL LATTE	
➤	3.1 Storia ed utilizzi	Pag. 9
➤	3.2 Produzione	Pag. 10
▪	3.2.1 Processo estrattivo/isolamento	Pag. 10
▪	3.2.2 Spray-dry	Pag. 13
▪	3.2.3Whey Protein in commercio.....	Pag. 15
➤	3.3 Uso ed effetti	Pag. 19
▪	3.3.1 Studi possibile effetto cronico	Pag. 21
➤	3.4 Valutazione del contenuto proteico	Pag. 23
▪	3.4.1 Nuovi metodi valutazione contenuto proteico	Pag. 24
➤	3.5 Valutazione Biodisponibilità elementale	Pag. 25
➤	3.6 Contenuto metalli pesanti	Pag. 26
❖	Capitolo 4: INTEGRATORI PROTEICI VEGETALI	Pag. 28
❖	CONCLUSIONI.....	Pag.32
❖	BIBLIOGRAFIA	Pag. 33

RIASSUNTO

Negli ultimi decenni la domanda e l'offerta di integratori proteici derivati dal siero del latte ha visto una crescita esponenziale. Infatti, dal 2010 al 2019 produzione e consumo sono più che raddoppiati e si ipotizza una triplicazione per il 2027.

In una realtà in cui non solo gli atleti affermati, ma anche la popolazione più giovane si affaccia sempre più al mondo sportivo a livello dilettantistico e professionale, l'uso di questi integratori vede un aumento continuo.

In questo elaborato ho esaminato molti aspetti connessi con l'uso di integratori proteici derivati dal siero del latte. In particolare, ho descritto le caratteristiche e la produzione di questi supplementi, derivati da un sottoprodotto dell'industria casearia, mostrando i benefici e le criticità della loro assunzione ed anche analizzando possibili alternative (integratori proteici in polvere derivati dal mondo vegetale).

ABSTRACT

In recent decades, market demand for whey protein supplements has seen exponential growth. Indeed, from 2010 to 2019 their production and consumption expanded to more than double and is expected to triplicate in 2027.

In a world which not only athletes but also the youngest are increasingly entering into the world of sports (amateur and professional), the integration of special diets with whey protein is rapidly expanding.

In this work I report positive and negative aspects of protein supplements derived from whey a by-product of the dairy industry, and an analysis of possible alternatives (protein supplements in powder derived from the plant world).

1. INTRODUZIONE

1.1 PREMESSA

Il siero del latte è un sottoprodotto dell'industria casearia, generato in elevate quantità. Il suo sfruttamento mediante trasformazioni innovative è cresciuto notevolmente negli ultimi anni. Prima, il siero veniva smaltito senza recuperare nessuno dei componenti presenti al suo interno. Invece, grazie alle sue proprietà nutrizionali, ora è sfruttato in molti ambiti del settore agro-alimentare, dalla mangimistica in cui è utilizzato come tale, fino all'ottenimento delle proteine in polvere mediante separazione con vari processi.

Le proteine del siero vaccino sono proteine ad alto valore nutrizionale che apportano benefici alla salute del consumatore e sono sempre più utilizzate da tutte le fasce della popolazione.

Vengono chiamate comunemente "Whey protein" o WP e sono uno dei tanti prodotti derivanti dal siero. Vengono assunte principalmente da atleti come supplemento alla dieta per coprire il fabbisogno proteico giornaliero. Infatti, queste proteine ad alto valore biologico facilitano la sintesi, il recupero e l'aumento della massa muscolare.

Le WP possono avere diversi gradi purezza in base al metodo di estrazione, al contenuto di proteine e anche di altri componenti; di conseguenza, nascono diverse tecniche di preparazione che consentono di ottenere prodotti differenti per valore economico e per fascia di mercato.

Secondo i dati americani il mercato delle WP ha avuto un fatturato pari a 9.26 miliardi USD nel 2021 vedendo una crescita pari al 7.07% rispetto al 2020. Nel 2022 si ipotizza addirittura una chiusura di tale mercato a 11 miliardi USD e con ottica futura nel 2029 si pensa di raggiungere gli 18 miliardi USD (Market Research Report).

Oltre al prodotto di cui tratterò nello specifico in questo elaborato, il siero del latte si è affermato come ingrediente chiave in molte preparazioni alimentari, che sostituiscono additivi e carboidrati, fino a costituire la base per il nuovo ambito del packaging degli alimenti attraverso l'impiego del polilattato. Gli utilizzi maggiori prevedono l'emulsione delle sieroproteine con lipidi per una maggiore stabilità del prodotto finale, oppure il loro impiego nella formazione di film commestibili, rivestimenti, idrogel, nanoparticelle e microcapsule, in combinazione con polisaccaridi, glicerolo e sorbitolo.

1.2 SCOPO

Lo scopo di questo elaborato è di passare in rassegna la composizione, le caratteristiche nutrizionali e i processi industriali a cui è sottoposto il siero del latte per focalizzarsi quindi sugli integratori proteici in polvere. In particolare, si analizzeranno le differenze merceologiche di questi prodotti, sia a livello produttivo che di composizione, gli effetti negativi e positivi derivanti dal loro uso, la valutazione del contenuto proteico e di altri componenti, concludendo con un confronto con gli integratori proteici d'origine vegetale.

2. IL SIERO DEL LATTE

2.1 PRODUZIONE

Il siero è il liquido giallo/verdognolo ottenuto dalla coagulazione del latte derivato dalla separazione dalla cagliata. Si possono ottenere fino 9L di prodotto per ogni Kg di Formaggio (Smithers, 2008).

L'Italia è uno dei maggiori produttori europei e mondiali di formaggio. Per tale ragione viene importato molto latte da paesi europei ed extra-europei. Tuttavia, il latte importato viene principalmente utilizzato per la vendita diretta tal quale, in quanto i caseifici impiegano prevalentemente latte locale nel processo di produzione del formaggio.

TAB.1 Produzione di Latte e formaggi nazionale (in quintali)

Periodo	2019	2020	2021
Tipo di prodotto lattiero caseario			
Totale latte raccolto	128.147.759	132.822.276	137.677.268
Latte alimentare	24.790.648	24.488.850	24.883.147
Formaggi totale	13.272.993	13.446.944	13.742.484

(Tabella dati ISTAT 2021)

Dalla tabella 1, notiamo un dato importante che è quello della totalità di formaggi prodotti nell'anno 2021, 13.724.484 quintali, i quali equivalgono a circa 113.512.918 quintali di latte prodotto usando un coefficiente di resa di 8,26 (secondo i dati del CLAL, società di analisi del mercato lattiero-caseario).

Un dato di rilevante aspetto è quello delle importazioni di latte che sono principalmente usate per il consumo diretto.

Nella tabella 2, possiamo notare una decrescita e poi una risalita nell'importazione di tale alimento, principalmente a causa della pandemia dovuta al Covid 19.

TAB.2 Importazione Italiana latte (in quintali)

Periodo		2019	2020	2021
Tipo di prodotto lattiero caseario				
Latte intero		1.554.792	386.508	513.552
Latte parzialmente scremato		116.278	1.314	3.121
Latte scremato		557.157	248.643	254.292

(Tabella dati ISTAT 2021)

TAB.3 Produzione e uso del Siero (in quintali)

Periodo		2019	2020	2021
Tipo di prodotto lattiero caseario				
Formaggi fusi		532.228	540.712	551.810
Siero di latte utilizzato per la produzione di ricotta		8.987.402	8.530.597	8.522.687
Siero di latte utilizzato sotto forma liquida per l'alimentazione del bestiame		23.480.677	22.819.936	23.003.499
Siero di latte utilizzato sotto forma concentrata in quintali		14.096.443	14.402.563	14.368.008
Siero di latte in polvere e in pezzi		9.129.630	8.719.030	8.865.584

(Tabella dati ISTAT 2021)

Il siero ottenuto dalla coagulazione del latte è utilizzato per diverse applicazioni (tabella 3). Principalmente viene impiegato nel bestiame come feed, in secondo luogo è usato sotto forma di concentrato (ossia per la realizzazione di polveri, tra cui gli integratori proteici) ed infine per la produzione della ricotta.

2.2 COMPOSIZIONE DEL SIERO

Il siero è circa l'85-95% del volume del latte. È una miscela liquida formata da acqua per il 93% mentre per il restante 7% è rappresentato da componenti in soluzione: 5-12% di proteine, 77-80% di lattosio, 8% di Sali minerali (calcio, potassio, sodio e magnesio), 0,5% di grasso e 3% di acido lattico variabile in funzione del tipo di caseificazione (Depuydt, 2008); la composizione varia anche in base al tipo di latte e alla tecnica utilizzata per produrre il formaggio (Ryan P. e Walsh G., 2016).

Il lattosio, uno dei componenti più importanti del siero, è formato da una molecola di galattosio e una di glucosio e può essere recuperato dal siero tramite cristallizzazione (Paterson, 2009). È utilizzato come ingrediente nelle preparazioni dolciarie per promuovere la reazione di Maillard, come substrato o come ingrediente nell'industria farmaceutica e per l'umanizzazione dei lattici per l'infanzia (Paterson, 2009).

La frazione proteica invece viene impiegata nell'industria alimentare come emulsionante, gelificante/legante ad acqua e agente schiumogeno nei sistemi alimentari (Ryan P. e Walsh G., 2016). Inoltre, viene utilizzata per la produzione di polveri attraverso il metodo *spray dried* (Kosikowski 1979; Yang and Silva 1995), dopo una serie di processi che prevedono una ultrafiltrazione o diafiltrazione con l'impiego di membrane per isolare la frazione proteica che viene poi concentrata (figura 1).

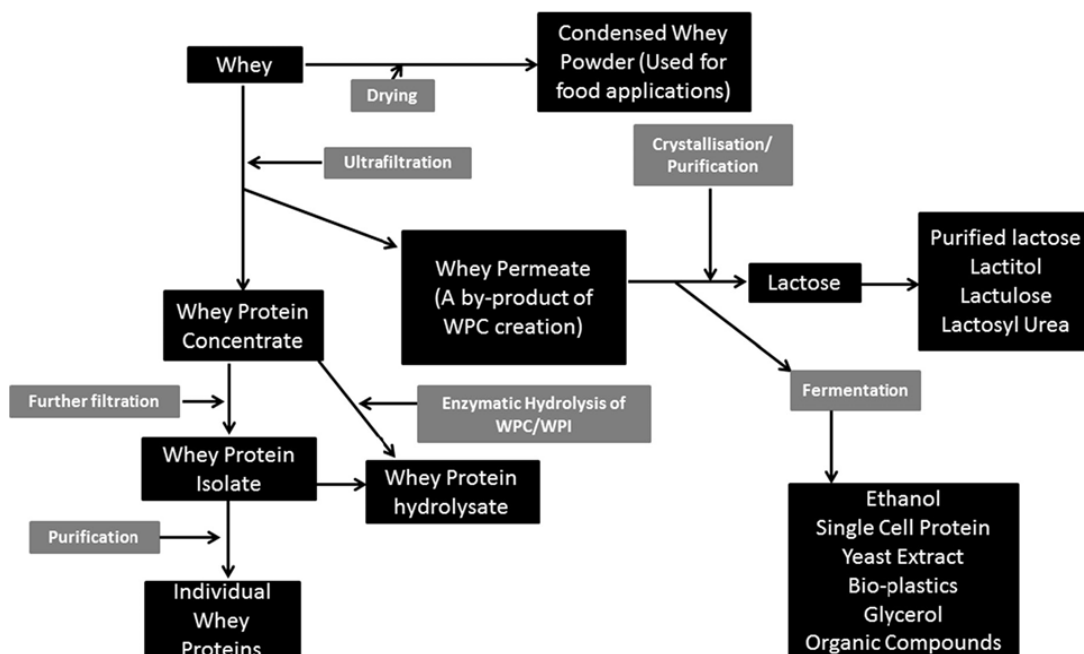


FIG. 1 Panoramica del frazionamento del siero e possibili utilizzi dei prodotti formati (Ryan P. e Walsh G., 2016)

- 2.2.1 Composizione proteica

Le proteine del siero, rappresentano il 20% di quelle totali provenienti dal latte, sono composte per circa l'85% da sei maggiori gruppi: β -lattoglobuline, α -lattoalbumina, glicomacropeptide (a seconda del metodo di fabbricazione del siero in quantità più o meno elevate), 3-proteose peptone, immunoglobuline e sieroalbumine. In figura 2 e 3 sono riportate le percentuali di tali proteine prese da fonti diverse (Krissansen 2007; Etzel 2004). Le leggere differenze sono da imputarsi ai diversi campioni utilizzati nelle due ricerche.

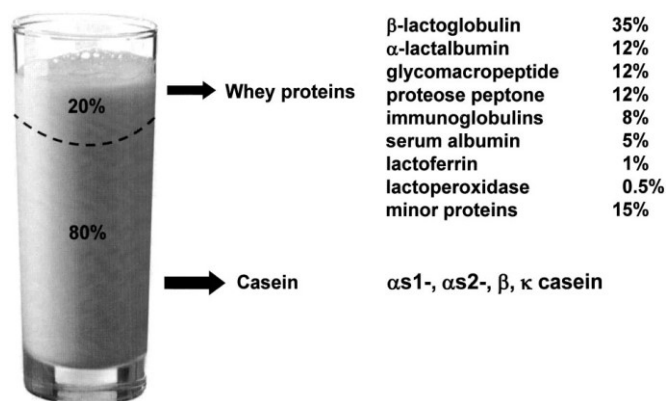


Fig.2 Contenuto proteico approssimativo nel siero (Geoffrey W. Krissansen 2007)

La β -lattoglobulina [(35%)-(48-58%)] notevolmente influenzata dall'alimentazione dell'animale] è la principale componente. È una buona fonte di amminoacidi ramificati e ha la capacità di legare le vitamine liposolubili (A e E), gli acidi grassi e i minerali come lo zinco e il calcio, rendendoli più disponibili per l'organismo (Marella, 2009; Magarò, 2012). È il maggior allergene presente all'interno del latte (Krissansen 2007).

La α -lattoalbumina (12-19%) è molto importante per la biosintesi del lattosio nelle ghiandole mammarie e per l'inibizione della crescita di cellule epiteliali dalle mammelle. È fonte di amminoacidi ramificati, ha proprietà antitumorali e antimicrobiche. È difatto un immunostimolatore che viene aggiunto nella formulazioni per neonati perché è la proteina più presente nel latte umano (Marella, 2009; Magarò, 2012). È responsabile dell'aumento della produzione di serotonina nel cervello che fa migliorare l'umore (Krissansen 2007).

Il glicomacropeptide (GMP 12-20%) è una piccola proteina con una massa molto ridotta; è responsabile durante la coagulazione dell'azione della chimosina nelle caseine. Nella sua catena è ricco di amminoacidi aromatici (Krissansen 2007).

3-Proteose Peptone (12%) è una frazione proteica che si crea nel latte dopo un trattamento termico a 95°C per 20 minuti seguito da acidificazione fino a pH 4.7. Questa frazione viene isolata solamente nel siero vaccino, in quello umano non è presente. Inibisce la crescita di batteri Gram positivi e negativi (Krissansen 2007).

Le immunoglobuline (8-12%), formate da IgM e IgA, sono responsabili passivamente della immunità del neonato ma sono anche potenti agenti per rimuovere la tossicità. Sono glicoproteine formate da due catene leggere e due pesanti (Geoffrey W. Krissansen 2007).

La sieroalbumina (5%) è una proteina globulare di grandi dimensioni formata per la maggior parte da amminoacidi essenziali. È utilizzata anche contro le infezioni per le sue proprietà antiossidanti e nelle formulazioni nutrizionali (Marella, 2009; Magarò, 2012).

Protein	Content (%)	Molecular weight (kg/mol)	Isoelectric pH
β -Lactoglobulin (β -LG)	48–58	18	5.4
α -Lactalbumin (α -La)	13–19	14	4.4
Glycomacropeptide (GMP)	12–20	8.6	<3.8
Bovine serum albumin (BSA)	6	66	5.1
Immunoglobulin (Igs)	8–12	150	5–8
Lactoferrin (LF)	2	77	7.9
Lactoperoxidase	0.5	78	9.6

Fig.3 . Componente proteica e punto isoelettrico siero (Etzel 2004).

3. INTEGRATORI PROTEICI IN POLVERE DERIVATI DAL SIERO DEL LATTE

3.1 STORIA ED UTILIZZI

Primi tra tutti ad usare il siero del latte furono i Greci nel 2000 a.c. assumendolo tal quale come bevanda liquida ad alto valore nutrizionale. Negli anni questo liquido non è mai riuscito ad incuriosire le popolazioni ai fini di un possibile utilizzo, in quanto è sempre stato visto come “elemento di scarto” del porcesso di coagulaizone del latte; si preferiva infatti smaltirlo direttamnete nel terreno oppure utilizzarlo nell'alimentazione di suini, mescolandolo a mangimi o semi di grano. Veniva anche impiegato nell'alimentazione di animali a seguito dello svezzamento. (Krissansen, 2007; Haug, 2007)

Il siero che si ottiene oggi giorno può essere di due tipologie, dolce o acido (Fig 4). Ciò che li differenzia è principalmente la modalità di separazione: quello dolce ha un pH di almeno 5.6 ed è originato dalla coagulazione attraverso l'uso di caglio, mentre la seconda tipologia ha un pH che non supera il 5.1 e si ottiene tramite coagulazione acida (Onwulata 2009).

Product	Protein	Lactose	Minerals
	g/L whey		
Sweet whey	6–10	46–52	2.5–4.7
Acid whey	6–8	44–46	4.3–7.2
	g/100 g powder		
WPC-35	35	50	7.2
WPC	65–80	4–21	3–5
WPI	88–92	<1	2–3
UF permeate	1	90	9

FIG. 4 Tipica composizione siero liquido e secco (Jelen 2003)

Oggi il siero non viene più impiegato negli allevamenti, o meglio lo è ma in piccola percentuale. Infatti, si predilige una trasformazione di quest'ultimo come ingrediente nei prodotti per l'infanzia, come *food supplements*, nelle barrette e nelle bevande proteiche per sportivi ed in integratori per anziani, creando da un sottoprodotto una enormità di varianti (Krissansen, 2007; Haug 2007).

Di particolare interesse sono gli INTEGRATORI PROTEICI IN POLVERE. Essi sono derivati dal siero attraverso un primo processo di ultrafiltrazione (Fig. 1), per rimuovere parzialmente o totalmente il lattosio, seguito da concentrazione secondo diversi metodi che generano prodotti con caratteristiche diverse (Onwulata 2009):

- WPC (whey protein concentrate), dal 35% (WPC-35) al 80% (WPC) di proteine.
- WPI (whey protein isolate), con un contenuto >90% di proteine.
- WPH (whey protein hydrolyzate), che contengono proteine già idrolizzate.

Queste classi di WP, diverse per composizione e caratteristiche, soddisfano le più svariate classi di consumatori.

3.2 PRODUZIONE

- 3.2.1 Processo estrattivo/d'isolamento

I benefici per la salute del siero di latte hanno portato allo sviluppo di processi per isolare la componente "solida" per concentrazione ed essiccazione. I primi tentativi industriali di concentrazione ed essiccazione del siero furono negli anni '20 e coinvolsero diversi metodi (Onwulata 2009):

1. Convenzionali essicatori di latte in rulli caldi, riscaldato fino all'ottenimento di un liquido notevolmente concentrato per poi essere raffreddato e solidificato mediante *Spray Drying* e asciugatura a tamburo rotante (Gillies 1974) ottenendo un prodotto polveroso. L'alto costo del processo e la natura igroscopica del lattosio nel prodotto secco ha impedito il progresso a tale metodo.
2. Il secondo metodo prevede dei rulli di essiccazione in cui il siero viene essiccato sulla superficie di un tamburo caldo e rimosso da un raschietto. È ancora utilizzato da alcuni trasformatori come parte della produzione di siero di latte in polvere; il primo importante sviluppo avvenne nel 1993 e rappresentò un salto di qualità (Gillies 1974).

3. Un altro metodo prevede l'uso di un evaporatore ad effetto multiplo, portando l'acqua a bollore attraverso una sequenza di serbatoi con pressioni successivamente inferiori. L'evaporazione nel primo serbatoio avviene intorno ai 77 °C e nel secondo a circa 45 °C (Kosikowski 1997a). L'acqua viene evaporata dal siero di latte in lunghi tubi verticali sottili all'interno della cassa di vapore (Perry 1997), lasciando concentrato siero con il 45% di solidi (Kosikowski 1979; Kosikowski 1997b).

Fino al 1970 le proteine in polvere dal siero di latte erano ottenute solamente attraverso una denaturazione a caldo. Risultando non solubili in acqua e di colore giallo/marrone non trovavano applicazioni significative.

La produzione si è evoluta attraverso l'uso di membrane filtranti che rimuovono la frazione che rende insolubili tali polveri.

Le membrane hanno pori di 150-µm di diametro. Pertanto, il permeato (ossia le parti solubili) passano mentre gli altri materiali vengono trattenuti. Il filtro può essere formato da polimeri di acetato di cellulosa, ceramica, polisolfone o ossido di zinco. La configurazione prevede che la membrana venga avvolta a spirale in un contenitore di acciaio inossidabile (Henning, 2006; Wagner 2001).

Il siero può essere filtrato secondo 5 metodiche diverse di filtrazione (figura 5) e alcune volte queste vengono anche combinate, ultrafiltrazione (UF), microfiltrazione (MF), elettrodialisi (ED), nanofiltrazione (NF) e osmosi inversa (RO) (figura 6) (Onwulata 2019).

A prescindere dal tipo di filtrazione, per la produzione di integratori proteici in polvere si fa seguire il processo *Spray Drying*. Grazie alla quale si ottengono prodotti con elevate concentrazioni di fase solida e umidità <5%.

Type	Pore size (nm)	Components retained	Molecular weight of component (kDa)
MF	20–4,000	Bacteria, casein micelles, fat globules	100–500
UF	20–200	Whey proteins	1–100
NF	<2	Lactose	0.1–1
RO	<2	Ions	<0.1

FIG. 5 Filtrazione siero del latte (Kelly 2003; Wagner 2001)

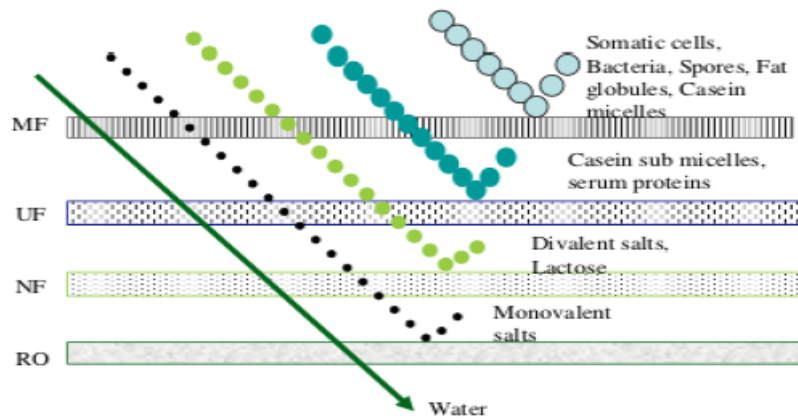


FIG. 6 Tipi di filtrazione in base alla membrana e grandezza dei pori (Cheryan, 1998; Brans et al., 2004)

La Microfiltrazione (MF) viene usata per la separazione della flora batterica, delle varie frazioni proteiche (micelle caseina) e delle micelle di grasso che possono essere ancora presenti (Kosikowski 1997b).

Esiste un metodo ED (elettrodialisi) che viene usato per la demineralizzazione del siero. Si tratta di un processo elettrochimico, che consiste, dopo la MF, nel far passare il siero all'interno di camere con pareti permeabili agli ioni, per ottenere un prodotto ad elevato valore nutrizionale ma privo di sali disciolti.

L'ultrafiltrazione (UF) nel siero iniziò nel 1971. Prevede un "cutoff" (separazione delle molecole) tra 3-10 kDa. Si opera a temperature sotto i 55°C, pressione di 300 kPa e una membrana con pori di 250nm di diametro (Wagner 2001). Il ritenuto (figura 6) (ovvero la frazione che viene trattenuta dalla membrana) è formata da proteine, grassi e sali insolubili mentre il permeato (ossia quello che passa la membrana) è composta da lattosio, sali solubili e parte dell'acqua.

Dalle prime membrane per l'UF, fatte di acetato di cellulosa sensibile a temperatura e pH (non maggiori a 37°C e pH vicino al neutro), alle più recenti membrane, dove il processo di filtrazione è ottimizzato usando il siero flussato a 50°C (Gésan-Guiziou, 2007), si è passati a filtrazioni a temperature più basse (<15 °C) per le WPC "Whey protein concentrate", in modo da evitare la formazione di spore derivate da microrganismi contaminanti (Kelly 2019).

Questo cambiamento tecnologico ha permesso migliori metodi di produzione, ha ridotto i costi delle membrane spiralate e ha reso la specifica di area di filtrazione più conveniente al fine di compensare i flussi ridotti a causa della bassa temperatura di esercizio (Kelly 2019).

La Nanofiltrazione (NF), denominata anche osmosi inversa, rimuove particelle più piccole di 0,1-1 kDa ed è inoltre utilizzabile per la desalazione e demineralizzazione del siero. La NF è una procedura selettiva per separare lattosio (Kelly 1995). Se viene effettuata tra 1.5 e 3 MPa può aumentare la frazione solida totale da un 5% fino ad arrivare a 40%, rimuovendo il 40% dei minerali (Van der Horst et al. 1995).

La Diafiltrazione (DF) è un processo che prevede l'aggiunzione di acqua al ritenuto attraverso una seconda UF, in modo da permettere la rimozione di sali e lattosio (Scotts 1986). Si è visto inoltre che pretrattamenti come aggiustamento di pH e pre-concentrazione aumentano il rendimento (Muller 1979). La quantità di acqua che viene aggiunta varia, in base alla quantità di soluto che si vuole rimuovere, da 40 fino al 200% del volume originale di ritenuto (Marella 2009).

Per effettuare l'osmosi inversa (RO) il siero deve essere prima riscaldato fino a 50-55°C e pompato attraverso la membrana per rimuovere i sali presenti al suo interno, con pressioni di esercizio tra 2.7 e 10 MPa. Attraverso RO più di due terzi dell'acqua può essere rimossa, avendo così un prodotto che può essere concentrato attraverso essiccamento in maniera più efficiente. Le applicazioni industriali su larga scala del processo di osmosi inversa sono state rese possibili dallo sviluppo di Loeb-Sourirajan con una membrana anisotropica di acetato di cellulosa (Marella 2009).

- 3.2.2 *Spray-dry*

A seguito del processo di filtrazione la metodica prediletta per ottenere un prodotto in polvere stabile è tramite l'applicazione dello *spray-dry*.

Tale metodo ha caratteristiche specifiche in base al prodotto finale che si vuole ottenere. Le variabili di processo sono date da: condizioni di atomizzazione, tipo di contatto spray/aria, essiccazione dell'aria, temperatura e parametri di alimentazione (concentrazione, temperatura e grado di aerazione della polvere) (Chegini 2013).

Lo *spray-drying* è il metodo più conveniente per produrre polveri, si tratta infatti di una operazione continua applicabile anche a materiali sensibili al calore grazie al suo breve tempo di esposizione alle alte temperature.

Nel processo vero e proprio l'aria calda entra nella camera di essiccazione e grazie all'evaporazione del contenuto umido del prodotto, la temperatura dell'aria diminuisce passando attraverso la camera ed uscendo dalla parte superiore ricca di vapore acqueo (figura 7).

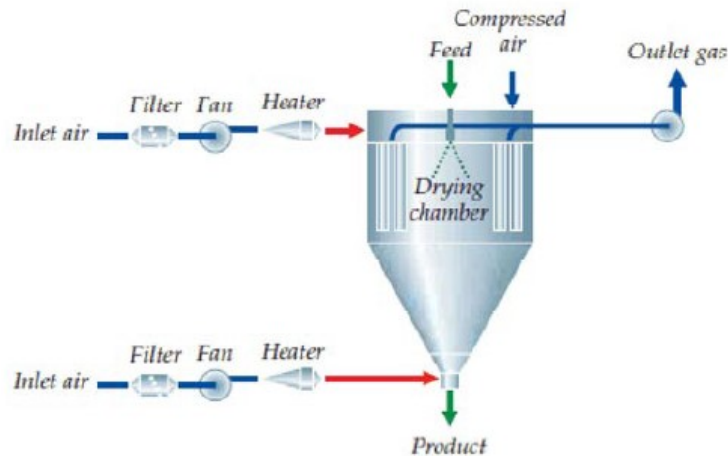


FIG.7 Tipico impianto di Spray-dry (Chegini Gholamrezaand Mojtaba Taheri)

Alla base del processo vi è una prima atomizzazione del liquido per poi andare a contatto con aria calda così da permettere l'evaporazione dell'acqua (Anandharamakrishnan 2008). Un importante aspetto è la solubilità delle proteine una volta che vengono disciolte in un liquido e introdotto all'interno dell'organismo. La solubilità è influenzata dallo stato delle proteine che può essere nativo o denaturato ed anche da fattori ambientali quali pH e temperatura. Tuttavia, la denaturazione da sola non è sufficiente a causare una perdita misurabile di solubilità, in quanto le proteine devono anche aggregarsi (Anandharamakrishnan 2008).

La maggior parte delle proteine del siero vengono denaturate nel passaggio di preriscaldamento da 70°C a 120°C in 52s (Oldfield 2005). Infatti, è stato confermato che per il processo di spray-dry l'uso di temperature dell'aria da 60 a 80°C evita l'eccessiva denaturazione delle proteine (Anandharamakrishnan 2008).

- 3.2.3 Whey Protein in commercio

Le WP occupano il 60% del mercato degli integratori ed è previsto un incremento del consumo in quanto prodotti estremamente utili per i Paesi in via di sviluppo o sottosviluppati.

Questi sono classificati secondo determinati parametri, in base al contenuto proteico al loro interno. Per la produzione delle whey protein (ossia delle classiche proteine in polvere) viene utilizzato maggiormente il processo di ultrafiltrazione (UF) come primo importante trattamento per determinare così la concentrazione della sola frazione proteica.

Le proteine in polvere possono essere commercializzate sia dolci che acide, in base al tipo di trasformazione che viene fatto e dalla materia prima di partenza.

Per la produzione di questi integratori il siero subisce un primo processo di microfiltrazione (figura 8), in modo da permettere una prima separazione della componente grassa che è rimasta al suo interno, estraendo così il “siero chiarificato”. Esso verrà poi sottoposto a UF ottenendo un ritenuto ricco di proteine che verranno quindi utilizzato per la produzione di WPC “Whey protein concentrate” e WPI “Whey protein isolate”. In questo ritenuto può avvenire anche un processo di idrolisi che genera le WPH “Whey Protein Hydrolysates”.

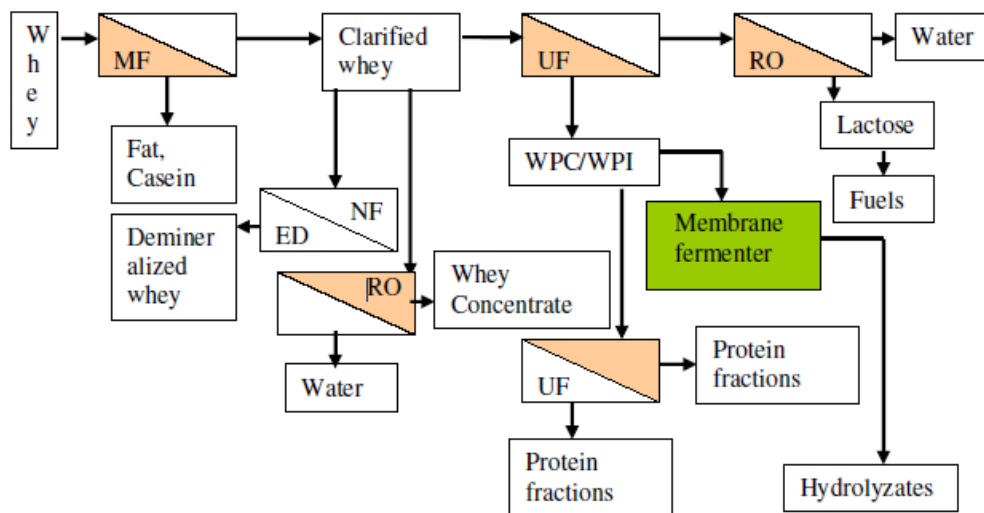


FIG.8 Produzione WPC-WPI-WPH (Marella 2009)

- WPC

Una prima filtrazione del siero, comporta la concentrazione dei componenti azotati, seguita dalla concentrazione del ritenuto mediante evaporazione convenzionale sottovuoto ed infine seguita da spray-dry si ottengono le “Whey protein concentrate”(WPC). Il tenore proteico può variare dal 35 all’80% in base alle tecniche di produzione. Attraverso una combinazione di UF e Diafiltrazione (DF) vengono rimossi minerali e lattosio dal ritenuto, quando si vuole avere un contenuto proteico >50% (Kelly 2019).

Nel processo di UF il lattosio può determinare un problema in quanto a temperature inferiori agli 85°C può interferire con la denaturazione delle proteine determinando la formazione di strutture più porose e con maggiori dimensioni (Kelly 2019). Gli aggregati più piccoli si formano a temperature comprese tra 85 e 95°C per poi diventare estremamente più dense a temperature maggiori di 100°C. A queste temperature la grandezza delle particelle è indipendente dalla concentrazione di lattosio in quanto sostituito da inulina che causa una maggiore denaturazione (Tobin 2010). Queste temperature vengono di fatto preferite nell’UF di siero destinato alla produzione di WPH perché la materia prima è già parzialmente denaturata e quindi necessita meno tempo per completare la denaturazione.

In base al contenuto di proteine le WPC si dividono in: WPC 35 (34-36%), WPC 60 (60-62%), WPC 75 (75-78%) e WPC 80 (80-82%). Le più utilizzate sono la prima e l’ultima categoria, le quali hanno molte applicazioni.

Una tipica composizione delle WPC 80 è data dall’ 80-82% proteine, 4-8% lattosio, 4-8% grassi, 3-4% ceneri, per un totale di 95.5-96.5% di sostanza secca (Marella 2009).

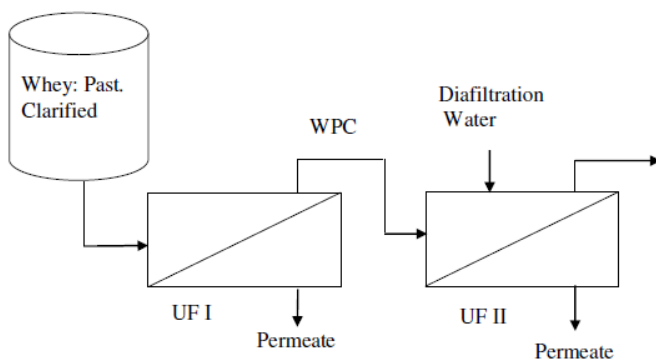


FIG.9 Processo produzione WPC-80 (Marella 2009)

- WPI

Le "Whey protein isolate" (WPI) contengono almeno 90% di proteine e idealmente sono prive di lattosio. Sono il prodotto con il più alto contenuto proteico. Per ottenere ciò, spesso vengono usate delle colonne a scambio ionico assieme all'UF per avere un risultato che si avvicina molto a quello descritto (Foegeding 2003), oppure si usa un sistema a membrane basato sulla combinazione tra UF e MF.

Nelle colonne a scambio ionico, le proteine del siero che viene pompato all'interno vengono trattenute mentre il lattosio fluisce libero attraverso la colonna e si separa così dalle proteine. In seguito, si effettua un lavaggio opportuno per staccare le proteine dalla colonna che vengono poi concentrate usando il processo di ultrafiltrazione (Marella 2009).

Le WPI a seguito dell'UF posseggono ancora una consistenza liquida, fino al processo di spray-dry dove si ottiene il prodotto in polvere.

Vedendo il processo in stadi, possiamo osservare quanto segue (figura 10): stadio 1, ultrafiltrazione fatta per ottenere un ritenuto che verrà portato nello stadio 2 (microfiltrazione); il permeato ottenuto sarà quindi rimesso nello stadio 3 in flusso di alimentazione per l'ultima ultrafiltrazione. Il ritenuto finale del terzo passaggio può essere direttamente messo in spray-dry oppure prima di questo nanofiltrato (Marella 2009).

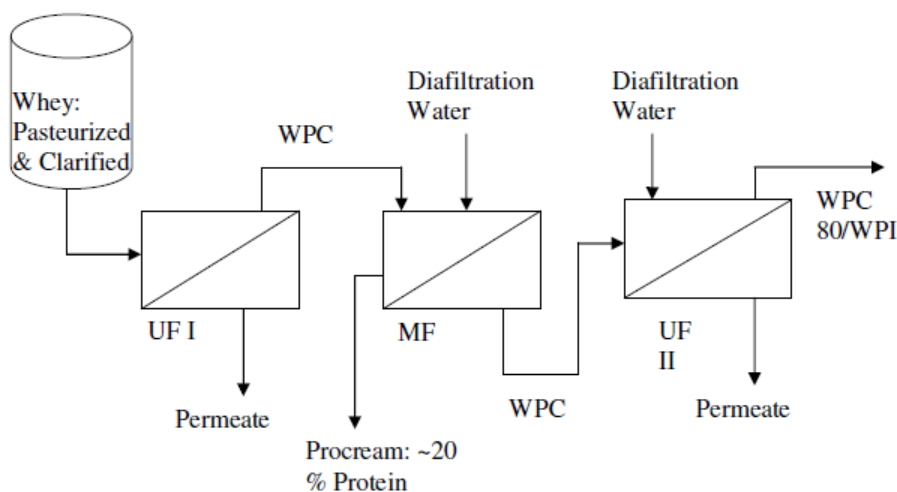


FIG.10 Processo di produzione WPI (Marella 2009)

Le WPI hanno una composizione media all'incirca di 90-92% proteine, 0,5-1% lattosio, 0,5-1,1% grassi, 2-3% ceneri e 95,5% solidi totali.

- WPH

Le “Whey protein hydrolysates” (WPH) sono integratori risultanti dall'idrolisi di siero del latte con ottenimento di peptidi di differente grandezza e amminoacidi liberi. L'idrolisi può essere effettuata secondo diverse metodiche: termicamente, per via enzimatica oppure per via alcalina o acida (Clemente 2000). Si preferisce un processo enzimatico rispetto ad un alcalino o acido in quanto negli ultimi si è riscontrato un minor valore nutrizionale del prodotto.

L'idrolisi enzimatica viene condotta a condizioni ben precise per massimizzare l'attività. In particolare, pH 6-8 e temperature tra 40-60°C, così da evitare le condizioni estreme richieste dalle solo alte temperature che potrebbero portare alla formazione di composti tossici.

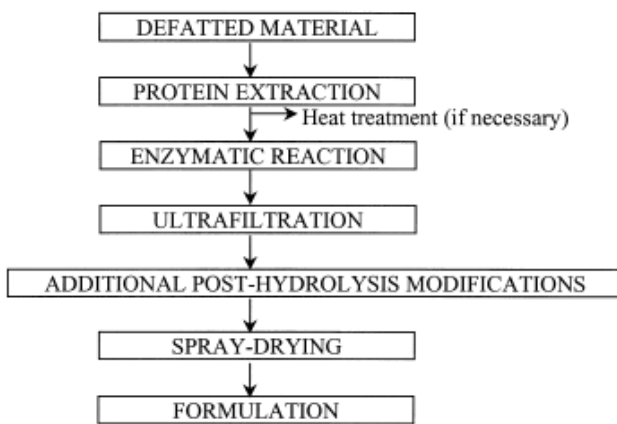


FIG.11 Processo ottenimento WPH (Clemente 2000)

In base alla materia prima di partenza si possono ottenere prodotti diversi, uno di questi è il siero di latte vaccino. Si tratta infatti di un prodotto caratterizzato dalla presenza di catene di di/tri-peptidi in quantità maggiore rispetto agli amminoacidi liberi. È un prodotto molto usato dagli sportivi a motivo del suo alto valore biologico e del rapido assorbimento.

Per quanto riguarda i valori nutrizionali sono molto simili a quelli delle WPI. L'unica differenza sta nel contenuto proteico, ma non a livello quantitativo ma qualitativo dato che nel primo sono presenti proteine mentre nel secondo peptidi.

3.3 USO ED EFFETTI

Per quanto riguarda l'impegno di WPC, WPI e WPH, sono stati eseguiti studi principalmente sul loro uso ed effetto nel gruppo della popolazione che ne fa maggiormente uso, ossia gli sportivi. Ad esempio, una ricerca recente (Ronghui 2015) ha coinvolto due gruppi da 5 persone di giocatori di pallacanestro, uno dei due usato come "controllo". Il test prevedeva l'assunzione ogni due giorni di 20 g di WPC-80. Entrambi i gruppi sono stati sottoposti giornalmente a 30 minuti di esercizio e in seguito ad esami ematologici (misurazione emoglobina, ematina, conta cellule nel sangue ecc.).

I risultati (figura 12), dopo un mese d'uso di integratori proteici in polvere, hanno evidenziato un sostanziale aumento nel sangue di emoglobina (HB), un leggero aumento di globuli rossi (RBC) ed ematocrito (HCT) (rapporto tra il plasma e gli elementi figurati dal sangue), mentre il volume corpuscolare (MCV) è leggermente diminuito.

FIG. 12 Risultati

Group	Time	HB	RBC	HCT	MCV
control group	before experiment	155±2.88	4.20±0.28	47.12±2.13	69.36±1.57
	after experiment	159±2.56	4.01±0.35	48.35±3.11	73.44±1.90
nutrition group	before experiment	156±2.59	4.22±0.37	47.85±2.18	70.18±2.10
	after experiment	167±3.50	4.57±0.31	50.22±2.64	68.55±2.34

Le whey protein sono di fatto dei supplementi alla dieta degli sportivi con spiccate azioni positive sul metabolismo e sul sistema muscolare (Ronghui 2015). Esse possono:

- 1) fornire amminoacidi essenziali, per l'organizzazione di nuove strutture;
- 2) ritardare l'invecchiamento cellulare;
- 3) fornire substrati per la produzione di anticorpi contro batteri e infezioni;
- 4) regolare l'acqua corporea e il bilancio elettrolitico;
- 5) aumentare la resistenza corporea alla fatica;
- 6) trasportare ossigeno e nutrienti alle cellule per accelerare la respirazione.

In particolare, a livello amminoacidico le WPI hanno il contenuto maggiore di leucina (14/100g) e di "Branched Chain Amino Acids" BCAA (26/100g), rispetto ad altri alimenti, come ad esempio uova (8.5 g/100 g leucina e 20 g/100 g BCAA) o soia (8 g/100 g leucina e 18 g/100 g BCAA) (Millward 2008).

Questi amminoacidi presenti nelle WP sono importanti fattori per la crescita dei tessuti muscolari (Daenzer 2001). In particolare, la leucina è un amminoacido chiave per le reazioni metaboliche (Anthony 2001). Inoltre, le WP hanno un elevato contenuto di amminoacidi solforati (cisteina e metionina), con importanti funzioni immunologiche nella conversione intracellulare in glutatione (GSH) (figura 13) (Grimble, 2006).

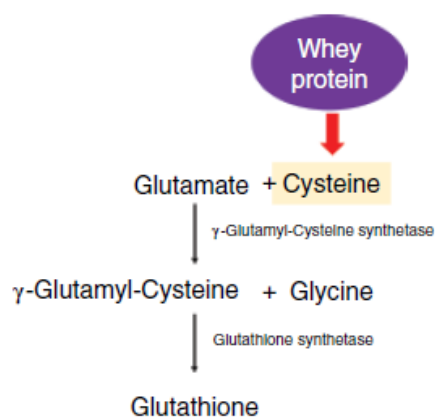


FIG.13 Contributo WP alla sintesi del glutathione (Grimble)

Pertanto, le WP sono una materia prima chiave per la categoria degli alimenti funzionali e dell'industria nutraceutica perché sono un substrato ricco di molecole bioattive (Udenigwe 2012). Di particolare interesse è anche il loro contenuto di peptidi bioattivi, molto importanti nel massimizzare l'anabolismo del muscolo scheletrico poiché hanno un valore nutrizionale maggiore rispetto agli aminoacidi liberi e alle proteine intatte (Brandelli 2015).

- 3.3.1 Studio di possibili effetti cronici

Un recentissimo studio ha valutato il possibile effetto tossico dell'assunzione di WPI in ratti da laboratorio (Vasconcelos 2022).

Tale analisi è stata fatta principalmente per vedere il possibile effetto tossico che può derivare da un'assunzione cronica di WPI. L'esperimento ha avuto una durata complessiva di 90 giorni usando una popolazione di 30 "Wistar rats" maschi con un peso complessivo di 170 ± 25 g, tenuti in gabbie di polipropilene (3 topi/gabbia), con un ciclo di 12 ore luce/buio e ad una temperatura controllata di 25 ± 2 °C. Cibo e acqua venivano forniti illimitatamente.

La popolazione di topi è stata divisa in tre diversi gruppi come riportato in figura 15.

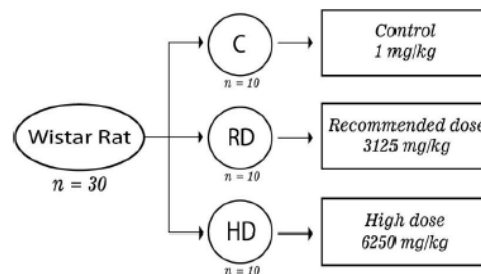


FIG.15 Suddivisione popolazione di ratti.

Le dosi di WP sono state calcolate in base agli standard della popolazione umana, prendendo in considerazione il parametro HED (Human equivalent dose) della "Food and Drug Administration"

I risultati dell'esperimento sono di seguito riassunti.

- La popolazione RD e HD ha avuto un incremento di peso dalla prima settimana fino alla quindicesima, mentre nella C non si è vista una significativa differenza.
- I parametri biochimici non hanno visto alcuna differenza (figura 16), ad eccezione del glucosio che ha visto un aumento significativo nel gruppo HD.

Parameter / groups	Control	Recommended dose	High dose
GLUC (mg/dL)	170.3 ± 40.33	180.1 ± 42.78	280.1 ± 42.78*
DBILI (mg/dL)	0.1010 ± 0.01120	0.1000 ± 0.01188	0.1063 ± 0.01188
TBILI (mg/dL)	0.0940 ± 0.02252	0.0770 ± 0.02389	0.0625 ± 0.02389
TP (U/L)	4.087 ± 0.6747	4.365 ± 0.7157	4.799 ± 0.7157
ALB (g/dL)	3.350 ± 0.5057	3.431 ± 0.5364	3.774 ± 0.5364
CREA (mg/dL)	0.3890 ± 0.07804	0.4210 ± 0.08278	0.4725 ± 0.08278
UREA (mg/dL)	15.10 ± 4.490	16.90 ± 4.762	24.50 ± 4.762

Values expressed as mean ± SEM (n = 8-10). *Significant difference when compared with the control (p < 0.05). One-way analysis of statistical variance test. Abbreviations: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), glucose (GLUC), total bilirubin (TBILI), direct bilirubin (DBILI), total proteins (TP), albumin (ALB), creatinine (CREA).

FIG. 16 Risultati parametri biochimici.

- I parametri ematologici non sono cambiati (Fig. 17) in nessun gruppo trattato con WP a confronto con il gruppo C.

Parameter / groups	Control	Recommended dose	High dose
WBC ($10^9/l$)	6,119 ± 0,9122	7,247 ± 1,001	7,783 ± 0,9784
LYM ($10^9/l$)	5,750 ± 1,035	6,866 ± 1,135	7,181 ± 1,110
MID ($10^9/l$)	0,4878 ± 0,5390	0,7250 ± 0,5911	1,437 ± 0,5781
GRA ($10^9/l$)	1,064 ± 0,5079	1,152 ± 0,5079	1,269 ± 0,5079
LY (%)	73,86 ± 3,630	77,00 ± 3,981	73,41 ± 3,893
GR (%)	18,66 ± 3,090	16,06 ± 3,389	19,74 ± 3,314
RBC ($10^{12}/l$)	8,056 ± 0,2678	7,909 ± 0,2938	8,169 ± 0,2873
HGB (g/dl)	13,36 ± 0,2594	13,31 ± 0,2845	13,70 ± 0,2782
HCT (%)	38,57 ± 1,371	38,13 ± 1,504	39,39 ± 1,471
HCT/HGB (%)	2,885 ± 0,06829	2,866 ± 0,07490	2,871 ± 0,07325
MCV (fl)	48,22 ± 0,6909	48,20 ± 0,7578	46,86 ± 0,7411
MCH (pg)	16,67 ± 0,3831	16,84 ± 0,4202	16,81 ± 0,4109
MCHc (g/dl)	34,73 ± 0,5359	34,94 ± 0,5878	35,81 ± 0,5748
RDWc (%)	14,79 ± 0,1713	14,51 ± 0,1879	14,50 ± 0,1838
PLT ($10^9/l$)	696,2 ± 134,5	860,2 ± 147,5	887,6 ± 144,2
PCT (%)	0,3967 ± 0,05606	0,4790 ± 0,06149	0,5186 ± 0,06013
MPV (fl)	5,700 ± 0,1901	5,770 ± 0,2085	5,871 ± 0,2038
PDWc (%)	33,54 ± 0,6500	33,66 ± 0,7129	33,70 ± 0,6971

Values expressed as mean ± SEM (n = 8-10). No significant difference was found (comparison with control). One-way analysis of statistical variance test ($p < 0.05$). *Abbreviations:* white blood cells (WBC), lymphocytes (LYM), monocytes, eosinophils, basophils, and immature cells (MID), granulocytes (GRA), percentage of lymphocytes (%LY), percentage of MID (%MI), percentage of granulocytes (%GR), erythrocyte count (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), the concentration of mean corpuscular hemoglobin (MCHc), red blood cell distribution width (RDWc), platelets (PLT), procalcitonin (PCT), mean platelet volume (MPV), and platelet distribution width (PDWc).

FIG. 17 risultati parametri ematologici

- I reni del gruppo C hanno visto una significativa crescita a confronto con quelli RC e HS che invece non hanno subito variazioni. Non sono stati osservati cambiamenti morfologici nel tessuto cerebrale e cardiaco degli animali, anche se un soggetto del gruppo HD ha avuto una piccola emorragia focale. Questi risultati non erano statisticamente significativi. In relazione al peso assoluto degli organi (g), del rene destro, del fegato e del cuore gli animali appartenenti a gruppi integrati con WPI erano più alti rispetto ai gruppi di controllo. Il peso assoluto del cuore e del rene destro erano significativamente più alti nel gruppo RD.

Lo studio ha permesso quindi di valutare attraverso due differenti dosi di integrazione la possibile tossicità delle WP. Le principali conclusioni hanno rivelato che WPI non promuovono la tossicità né cambiamenti significativi per quanto riguarda i parametri biochimici, ematologici, morfologici e comportamentali.

Tuttavia, indipendentemente dalla dose utilizzata, WPI ha promosso l'aumento di peso, ha aumentato il peso assoluto del fegato, del rene destro e del cuore e, in una dose più elevata, ha aumentato i livelli di glucosio.

Lo studio ha portato risultati rilevanti che contribuiscono alla letteratura attuale e nuove intuizioni sulla supplementazione WPI. Si è inoltre sottolineato la necessità di ulteriori ricerche che dovrebbero concentrarsi sui cambiamenti metabolici associati a un maggiore apporto di WP, proponendo un dosaggio sicuro del consumo per migliorare la salute dell'individuo, riducendo i danni, in particolare sul fegato e sui reni.

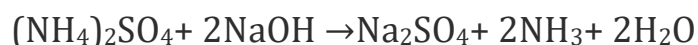
3.4 VALUTAZIONE DEL CONTENUTO PROTEICO

Negli integratori proteici il “contenuto proteico” è l'aspetto più importante. Esso viene valutato attraverso il metodo Kjeldahl, che misura il contenuto di azoto.

Il processo è molto valido per questi prodotti in quanto l'azoto è derivato quasi totalmente dalla frazione proteica (Saxton 2021).

Il metodo Kjeldahl è un processo che si basa su tre fasi (Di Marzo 2021):

- 1) Digestione con acido solforico concentrato ad una temperatura di circa 400°C, per trasformare tutta la sostanza organica in anidride carbonica e acqua (che evaporano) e solfato di ammonio ((NH₄)₂SO₄) la cui quantità dipende da quanto azoto, e quindi quanta proteina, è presente nel campione.
- 2) Distillazione per raccogliere azoto: si aggiunge una base forte (idrossido di sodio) che neutralizza l'acido solforico in eccesso e trasforma lo ione ammonio in ammoniaca (volatile) che sarà condensata;



- 3) Titolazione per quantificare l'azoto ammoniacale.

La frazione proteica deve pure essere valutata a livello qualitativo in quanto sono sempre più presenti casi di falsificazione sull'origine delle proteine. L'autenticazione degli ingredienti limita le frodi e aiuta i produttori a garantire ai compratori una maggiore sicurezza.

Elettroforesi, cromatografia a scambio ionico, gel-permeazione (esclusione dimensionale), e cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) si sono dimostrate efficaci nella caratterizzazione del singolo tipo di proteina nei prodotti a base di siero di latte (Kilara 2008).

Una delle tecniche attualmente più utilizzate è la spettroscopia nel medio infrarosso (FTIR-ATR MIR, da 4000 fino 400 cm^{-1}). Vengono investigate le bande tra 3000 e 2800 cm^{-1} e tra 1800 e 900 cm^{-1} , riuscendo ad identificare le principali molecole presenti all'interno della matrice proteica. (Andrade 2019).

- 3.4.1 Nuovi metodi valutazione contenuto proteico

Nella ricerca delle proteine, la spettroscopia infrarossa (NIR e medio-IR) è stata applicata per la determinazione qualitativa o quantitativa degli ingredienti proteici (Baer 1983; Marchi 2009) e per studiare la struttura secondaria delle proteine (Curley 1998, Van der Ven 2002), riportando la combinazione della spettroscopia nel medio infrarosso e l'analisi dei dati multivariati nella caratterizzazione di WPI.

Gli spettri del medio-IR (van der Ven 2002) danno informazioni sulle strutture secondarie delle proteine (α -elica e β -sheet), ma non consentono di differenziare WPC, WPI e WPH (figura 18) (Coates 2000; Kong 2007).

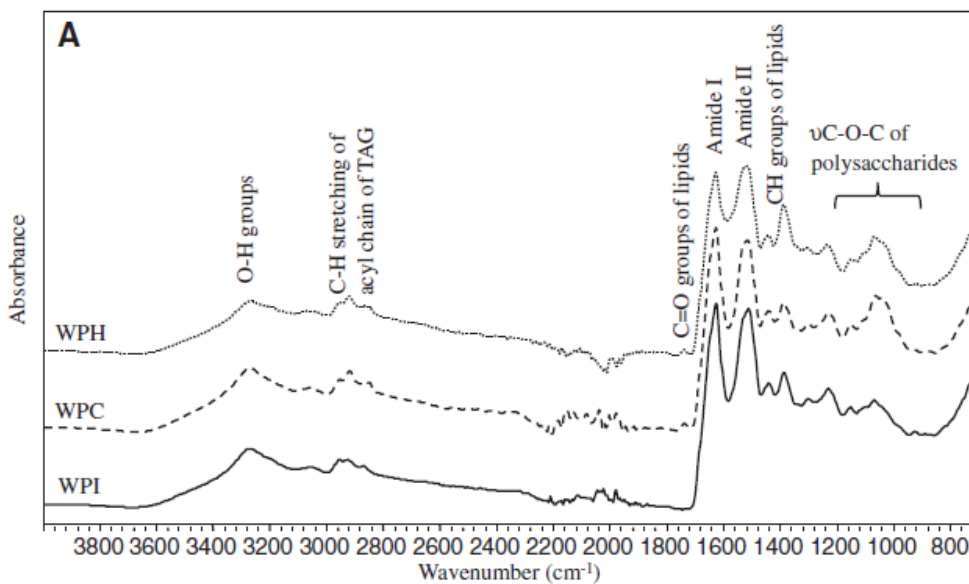


FIG.18 IR di WPC, WPI e WPH (Ting Wang, Siow Ying Tan, William Mutilangi, Didem P. Aykas, and Luis E. Rodriguez-Saona)

3.5 VALUTAZIONE BIODISPONIBILITÀ ELEMENTALE

Si è valutato recentemente il contenuto elementale delle WP, prendendo 25 campioni diversi di proteine in polvere e analizzandoli con spettrometria di massa accoppiata a plasma (Guefai 2022). Si è così riusciti a rispondere alla domanda della possibile tossicità derivata da questi componenti qualora assunti in dosi eccessive.

I risultati dell'esperimento hanno dimostrato una presenza di Na, K, Ca e Mg come elementi predominanti, vi è poi la presenza di altri ma in quantitativi molto piccoli, per un totale di all'incirca 25 elementi. L'analisi ANOVA indica che la concentrazione dei quattro elementi sopra menzionati è la chiave per la classificazione osservata.

Si tratta del primo studio della componente elementale delle WP. In generale, la frazione biodisponibile elementare media nello stomaco o nella parte gastrica è rispettivamente del 45% e del 64%. Diciannove elementi mostrano valori di biodisponibilità gastrica superiori al 60 %, che vanno dal 37 % di Al fino al 76 % di Co.

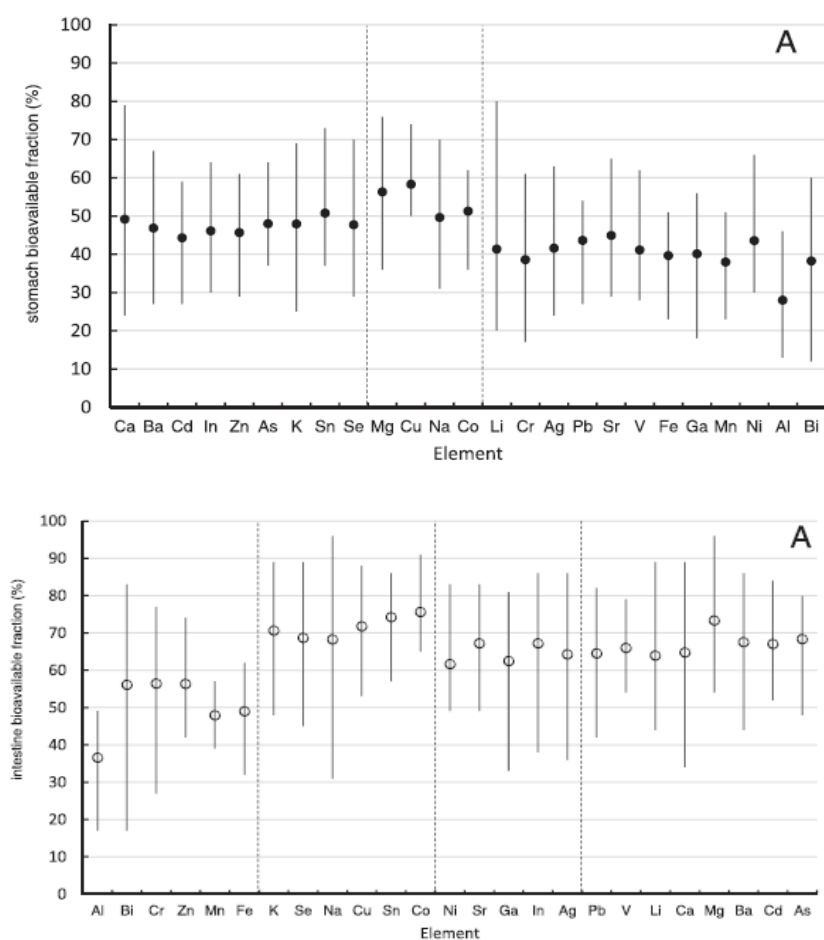


FIG. 19 Biodisponibilità elementale delle WP in stomaco e intestino

Gli autori dell'articolo citano un'importante aspetto per quanto riguarda la dichiarazione nell'etichetta: "società di integratori sportivi dovrebbero fornire informazioni affidabili sulla loro etichettatura in modo da non indurre in errore il consumatore. In questo senso, o per omissione di sostanze presenti o per alterazioni o errori nella loro analisi, il consumatore potrebbe essere truffato (Guefai 2022)". Inoltre, sottolineano anche l'importanza di ricerche future in questo ambito in quanto le potenziali mutazioni nel consumo di sostanze da parte degli atleti potrebbero alterarne la salute e le prestazioni, nonché incorrere in strategie non consentite dalla WADA (World Anti-Doping Agency). Ecco perché, in ogni caso, il consumo di integratori dovrebbe essere prescritto e controllato da un professionista sanitario competente in materia, che giustifica la necessità del loro uso e ne valuta la sicurezza, l'efficacia e la legalità (Guefai 2022).

3.6 CONTENUTO METALLI PESANTI

Il contenuto di metalli pesanti all'interno di integratori proteici in polvere è stato valutato attraverso un'analisi su 15 diverse WP effettuata dal "The Consumer Reports", vedono di fatto una media di tre porzioni di proteine in polvere al giorno che eccedeva sul limite massimo proposti dall' U.S. Pharmacia (Bandara 2020).

Un altro studio ha evidenziato che il 40% di 133 WP analizzate presenta elevati livelli di metalli pesanti al suo intero.

Per Arsenico (As), Cadmio (Cd), Mercurio (Hg) e Piombo (Pb), è stato stabilito un quoziente di rischio (HQs hazard quotients) (Bandara 2020). Lo scenario peggiore citato dagli autori è quello dato dall'indice di rischio (HI) che è la somma degli HQs di tutti i metalli pesanti.

Le dosi giornaliere (Daily Intake DI) per questi metalli, sono state riportate dal WHO per un'uomo adulto di 25-30 anni e sono:

- [As] 9.9 µg/day
- [Cd] 2.3 µg/kg (in un uomo adulto di 70 kg sono ~23 µg/day)
- [Pb] ~83 µg/day
- [Hg] 1.1 µg/day

I metalli pesanti delle WP derivano principalmente dalla catena di lavorazione oppure da fattori che determinano cronicità nella materia prima. Ad esempio, in un campione di latte si è trovato As in elevate quantità perché l'acqua potabile o la paglia ingerita dalle vacche erano contaminate (Gosh 2013). La figura 20 riporta l'analisi eseguita su 15 campioni (10 proteine in polvere e 5 "weight gainer", cioè prodotti che fanno aumentare di peso) attraverso la spettroscopia di massa.

Sample ID	Supplement Type	Amount of Protein Powder Per Serving	Heavy Metal Concentration Per Serving (µg)			
			Arsenic	Cadmium	Lead	Mercury
1	Whey protein	35 g	1.10	1.23	0.83	0.10
2		44 g	1.40	0.87	1.80	0.37
3		26 g	1.30	0.53	0.80	0.30
4		48 g	2.33	1.30	1.63	ND
5		79 g	1.80	0.83	0.83	ND
6		27 g	0.63	ND	0.40	ND
7		32 g	0.40	ND	0.13	0.30
8		32 g	0.83	0.57	0.33	0.07
9		39 g	0.50	ND	ND	ND
10		39 g	0.77	ND	ND	ND
11		20 g	0.20	ND	ND	ND
12	Weight gainer	500 mL	5.63	1.70	ND	ND
13		70 g	4.07	1.87	4.50	0.23
14		330 mL	4.77	ND	2.27	ND
15		70 g	3.73	0.67	4.07	ND

FIG.20 Contenuto metalli pesanti nei campioni(Bandara 2020)

Sono poi stati calcolati da questi i livelli di "chronic daily intake" (CDI) dati dalla concentrazione di ogni metallo trovato per il daily intake dell'integratore proteico (nell'esperimento sono stati assunti da un minimo di 1 ad un massimo di 3). I valori ottenuti sono stati poi ripresi per l'identificazione del quoziente di rischio per ogni metallo HQ ed infine dalla somma sei HQs si è ottenuto l'indice di rischio HI, ottenendo valori confrontabili (figura 21).

Sample ID	Supplement Type	Consumer Daily Intake (µg/day)							
		Arsenic		Cadmium		Lead		Mercury	
		1 serving/day	3 servings/day	1 serving/day	3 servings/day	1 serving/day	3 servings/day	1 serving/day	3 servings/day
1	Whey protein	1.10	3.30	1.23	3.70	0.83	2.50	0.10	0.30
2		1.40	4.20	0.87	2.60	1.80	5.40	0.37	1.10
3		1.30	3.90	0.53	1.60	0.80	2.40	0.30	0.90
4		2.33	7.00	1.30	3.90	1.63	4.90	0.00	0.00
5		1.80	5.40	0.83	2.50	0.83	2.50	0.00	0.00
6		0.63	1.90	0.00	0.00	0.40	1.20	0.00	0.00
7		0.40	1.20	0.00	0.00	0.13	0.40	0.30	0.90
8		0.83	2.50	0.57	1.70	0.33	1.00	0.07	0.20
9		0.50	1.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10		0.77	2.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
11		0.20	0.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
12	Weight gainer	5.63	16.90	1.70	5.10	0.00	0.00	0.00	0.00
13		4.07	12.20	1.87	5.60	4.50	13.50	0.23	0.70
14		4.77	14.30	0.00	0.00	2.27	6.80	0.00	0.00
15		3.73	11.20	0.67	2.00	4.07	12.20	0.00	0.00

FIG.21 Potenziale rischio ingestione campioni (Bandara 2020)

I dati di questo studio suggeriscono che l'esposizione dei metalli pesanti attraverso l'ingestione di integratori proteici in polvere non comporta un aumento del rischio di cronicità per la salute umana. Gli autori non si aspettavano alcun rischio cronico dall'ingestione di integratori in polvere; la ricerca però sottolinea l'importanza che debbano essere condotte ricerche nel contesto delle pertinenti esposizioni di fondo e delle norme sanitarie stabilite, anziché della sola presenza di sostanze pericolose (Bandara 2020).

4. INTEGRATORI PROTEICI VEGETALI

Negli ultimi anni, stanno prendendo sempre più piede gli integratori proteici di origine vegetale, specialmente tra atleti che seguono una alimentazione di tipo vegano o vegetariano. Si tratta di regimi nutrizionali che per gli sportivi richiedono sicuramente l'impegno, oltre all'alimentazione, di un supplemento che può essere un integratore in polvere o di altre tipologie.

Di norma un atleta che segue una dieta vegetariana o vegana aumenta sostanzialmente il numero di pasti nell'arco della giornata per apportare tutte le Kcal necessarie, sia per il proprio metabolismo basale che per ripristinare le energie consumate dallo sforzo a cui è sottoposto. Questo regime non è da escludere né da discriminare, in quanto atleti dal calibro mondiale come Carl Lewis, Venus Williams, Patrik Baboumian ma anche l'italianissimo rugbista Mirco Bergamasco, hanno dimostrato come si possa ugualmente riuscire a raggiungere importanti successi con una dieta vegana.

Uno studio molto recente ha messo a confronto le proteine in polvere derivate dal siero del latte e quelle di origine vegetale (Teixera 2022).

L'integratore vegetale viene categorizzato come un "novel plant-based protein matrix" (BP). All'interno dello stesso troviamo principalmente scarti derivati dall'industria vegetale del riso, soia e pisello. Nell'esperimento sono stati usati questi integratori fortificati con BACC (branched-chain amino acids).

Lo studio è stato fatto principalmente per valutare se l'effetto della composizione corporea e delle prestazioni fisiche dipendenti dall'assunzione di integratori proteici derivati dal siero del latte (quindi da una matrice ricca di amminoacidi essenziali) sia una caratteristica unica di tale prodotto oppure no.

Tale ricerca ha impegnato 8 settimane. Hanno partecipato 40 giocatori di calcetto (20 che integravano WP e 20 che integravano BP). Sono stati studiati molti parametri (figura 22). I soggetti hanno mantenuto le regolari diete e hanno registrato accuratamente ogni cosa assunta per tutto il periodo.

I risultati hanno potuto affermare che non vi è nessuna differenza nelle variabili valutate sia nei soggetti che hanno assunto le WP sia per quelli che hanno assunto le BP.

	PB (n = 20)			WP (n = 20)		
	Baseline	Post 4 weeks	Post 8 weeks	Baseline	Post 4 weeks	Post 8 weeks
Body composition						
Body mass (kg)	70.8 ± 9.2	70.5 ± 9.3	69.9 ± 9.0	71.6 ± 10.2	70.6 ± 7.7	69.7 ± 7.7
TBW (L)	43.1 ± 4.4	43.0 ± 4.3	42.9 ± 4.4	43.7 ± 4.3	43.1 ± 3.7	42.8 ± 4.0
Muscle thickness rectus femoris (mm)	26.7 ± 3.6	27.2 ± 2.7	28.0 ± 3.2	26.4 ± 3.4	27.0 ± 2.9	27.9 ± 2.7
Bone mineral content (kg)	2.93 ± 0.39	2.96 ± 0.38	2.97 ± 0.43	3.06 ± 0.45	3.06 ± 0.46	3.07 ± 0.42
Lean body mass (kg)	57.7 ± 5.8	57.9 ± 5.4	58.5 ± 6.3	58.0 ± 5.9	58.2 ± 5.3	58.9 ± 5.5
Lean soft tissue (kg)	54.6 ± 5.5	55.0 ± 5.1	55.3 ± 5.9	54.8 ± 5.5	55.1 ± 4.97	55.7 ± 5.1
Fat mass (kg)	13.1 ± 5.0	12.1 ± 5.0	11.4 ± 4.1 [#]	13.6 ± 5.4	11.5 ± 3.5	10.9 ± 3.2 [#]
Fat mass (%)	18.1 ± 4.9	17.6 ± 4.8	16.1 ± 4.2	18.5 ± 4.8	17.7 ± 3.7	15.4 ± 3.2
Visceral fat area (cm)	61.9 ± 21.5	59.6 ± 20.0	57.1 ± 21.3	57.1 ± 18.3	53.1 ± 11.9	51.2 ± 10.4
Muscle strength						
Handgrip dominant hand (N)	471.2 ± 91.2	483.4 ± 93.8	486.4 ± 89.3	461.3 ± 75.9	470.5 ± 74.0	475.4 ± 73.7
Back squat 1 RM (kg)	76.6 ± 14.3	78.4 ± 13.8	85.5 ± 15.6	80.2 ± 14.7	81.0 ± 13.8	85.9 ± 13.1
Bench press 1 RM (kg)	54.6 ± 13.0	55.3 ± 16.2	56.9 ± 9.1	56.8 ± 8.6	57.4 ± 9.4	59.1 ± 9.7
Counter movement jump (cm)	33.5 ± 4.2	34.7 ± 4.5	38.0 ± 4.7	33.5 ± 3.9	36.9 ± 4.0	38.7 ± 3.4
Anaerobic and aerobic performance						
Anaerobic peak power (W/kg)	12.9 ± 4.50	–	11.4 ± 3.2	12.4 ± 4.8	–	11.5 ± 4.2
Anaerobic average power (W/kg)	8.5 ± 1.0	–	8.4 ± 0.7	8.3 ± 0.9	–	8.1 ± 0.9
Anaerobic power drop (%)	62.7 ± 15.4	–	58.5 ± 11.1	64.0 ± 16.9	–	62.8 ± 14.0
VO _{2max} (mL/kg/min)	49.7 ± 7.1	–	50.6 ± 7.6	51.2 ± 7.0	–	51.1 ± 3.3
VO _{2max} (mL/min)	3,545.8 ± 436.8	–	3,544.8 ± 380.9	3,719.1 ± 410.8	–	3,582.7 ± 294.8
MAS (km/h)	16.0 ± 1.6	–	16.3 ± 1.9	15.0 ± 1.9	–	16.2 ± 1.2
Hematological and biochemical markers						
C Reactive protein (mg/L)	10.0 ± 5.0	–	9.4 ± 1.2	8.9 ± 2.2	–	8.3 ± 0.7
Hematocrit (%)	44.2 ± 3.3	–	43.6 ± 2.6	44.4 ± 2.4	–	44.3 ± 2.4
Creatine Kinase (U/L)	254.4 ± 126.3	–	201.0 ± 68.9	272.5 ± 114.1	–	195.5 ± 55.6
Alanine aminotransferase (U/L)	22.8 ± 15.4	–	19.0 ± 6.1	21.0 ± 9.6	–	20.2 ± 6.9
Aspartate aminotransferase (U/L)	25.3 ± 16.9	–	20.5 ± 6.9	19.3 ± 7.4	–	19.7 ± 5.9
Glucose (mg/dL)	77.8 ± 13.1	–	70.1 ± 11.6	76.6 ± 13.6	–	67.6 ± 12.4
Creatinine (mg/dL)	1.4 ± 0.2	–	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.3	–	1.5 ± 0.2
Estimated glomerular filtration rate (mL/min)	82.1 ± 17.3	–	80.8 ± 12.6	83.4 ± 20.2	–	79.6 ± 20.1
Salivary cortisol (µg/dL)	1.2 ± 0.6	–	1.2 ± 0.4	0.9 ± 0.6	–	0.7 ± 0.5

FIG 22. Parametri esaminati per 40 atleti dopo 8 settimane di assunzione di WP o BP.

Si è infatti potuto concludere che le proteine del siero del latte non posseggono alcuna proprietà anabolizzante e che l'unico aspetto che le differenzia dalle BP è la qualità delle proteine, essendo a tutti gli effetti le WP ricche di amminoacidi essenziali. Di fatto gli autori sottolineano che per diete dove si consumano proteine per valori $>1.6\text{g/kg}$ di peso corporeo, le proteine addizionate con integratori (WP o BP) non danno benefici sulla corporatura o sulle performance di giocatori di calcetto (Teixera 2022).

Secondo altre fonti, che hanno indagato maschi iperlipidemici, ossia soggetti a rischio di malattie cardiovascolari, risultano efficaci integratori WP o integratori proteici a base di soia (DeNysschen 2009).

Lo studio è stato fatto in questi soggetti in quanto diete ed esercizio fisico sono fattori per ridurre l'insorgenza di tali malattie.

È stato valutato l'effetto di una combinazione di allenamento di resistenza con l'integrazione di proteine in polvere a base vegetale (soia) rispetto a quella animale (siero), su un periodo di 12 settimane.

Tale ricerca ha visto l'impiego di 29 uomini in sovrappeso, sottoponendoli a 12 settimane di allenamento a un regime alimentare preciso:

- A. Gruppo Placebo (=9), impiegavano l'alimentazione normale senza integrazione proteica e l'allenamento;
- B. Gruppo Soy (=9), oltre al regime alimentare giornalmente consumavano 25.8 g di "Soy protein" più lo sforzo fisico;
- C. Gruppo Whey (=10) come il gruppo B solo che l'integrazione avveniva con 26.6 g di "whey protein".

Tutti e 3 i gruppi hanno avuto significativi guadagni di forza senza evidenziare differenza tra di loro. In media sono aumentati del 47% tutti i principali gruppi muscolari e del 2,6% la massa libera di grasso. La percentuale di grasso corporeo e rapporto vita-fianchi è diminuita significativamente in tutti e 3 i gruppi, una media di 8% e 2%, rispettivamente, con nessuna differenza tra i gruppi. Il colesterolo sierico totale è diminuito significativamente, ancora una volta senza che vi siano prevalenze.

I risultati mettono in forte evidenza che l'allenamento di resistenza è utile per ridurre il rischio cardiovascolare; suggeriscono che l'integrazione proteica non è necessaria per cambiamenti di forza o composizione corporea su uomini in sovrappeso che consumano una dieta con un adeguato apporto di aminoacidi, per soddisfare le esigenze di stimolazione della sintesi proteica muscolare durante l'esercizio di resistenza. Tale pratica è infatti più consigliata a sportivi che necessitano di quantitativi proteici e aminoacidici maggiori. Gli integratori proteici a base di soia sembrano essere efficaci quanto le proteine a base animale per sostenere i guadagni di forza. I risultati suggeriscono inoltre che l'integrazione di proteine di soia durante l'allenamento di resistenza richiede ulteriori studi in campioni più grandi per periodi di tempo più lunghi, poiché il lavoro precedente ha dimostrato che il consumo regolare di integratori a base di soia migliora i profili lipidici e l'insulino-glucagone e abbassa lo stress ossidativo.

Si può affermare che gli integratori proteici di origine vegetale possono sostituire le WP. Tuttavia, vi sono pareri contrastanti nella comunità scientifica. Nella letteratura disponibile, peraltro scarsa, non c'è prova che una fonte proteica sia preferibile ad un'altra nei programmi atletici. Tuttavia, le proteine animali, specialmente quelle dei latticini, sembrano supportare una migliore sintesi proteica muscolare rispetto alle proteine vegetali. Ciò potrebbe potenzialmente aumentare la spesa energetica, ma non si può trarre alcuna conclusione sicura viste le scarse prove.

Alcuni studi, ma non tutti, dimostrano il maggiore effetto saziante delle proteine del siero rispetto ad altre fonti proteiche (Gilbert 2011). Ma non si possono ancora trarre conclusioni definitive in quanto questi studi sono fatti su nicchie della popolazione.

CONCLUSIONI

Con questo elaborato ho voluto descrivere le tecniche di produzione, gli effetti e le possibili negatività degli integratori derivati dalle proteine del siero del latte (WP), confrontandoli anche con i nuovi integratori di origine vegetale, che al giorno d'oggi stanno sempre di più prendendo piede.

In un mondo dove si cerca di riutilizzare tutti i sottoprodotti derivati dalle produzioni primarie, come in tale caso il siero, si riesce ad ottenere un ciclo sostenibile arrivando a prodotti che conferiscono benefici. Infatti, tali prodotti sono ricchi di proteine che facilitano lo sviluppo del sistema muscolare, fornendo amminoacidi essenziali. Inoltre, sono state riscontrate proprietà antitumorali, immunologiche e di rallentamento dell'invecchiamento.

Le WP dimostrano quanto sia importante sfruttare quello che deriva dalla conclusione di una filiera, nel caso quella lattiero-casearia, e trasformarlo in una fonte di reddito e sostenibilità.

Gli integratori proteici sono una realtà estremamente attuale, ma è opportuno che chiunque ne faccia uso sia consapevole dei benefici e dei possibili aspetti negativi. Per questo però sono necessari maggiori studi per valutare possibili effetti derivanti da assunzioni continuative.

BIBLIOGRAFIA

- Anandharamakrishnan, C., C.D. Rielly and A.G.F. Stapley, (2008). *Loss of solubility of α -lactalbumin and β -lactoglobulin during the spray-drying of whey proteins*. LWT, 41: 270-277.
- Andrad J. e, Cristina Guimarães Pereira, José Carlos de Almeida Junior, Carolina Carvalho Ramos Viana, Leandra Natália de Oliveira Neves, Paulo Henrique Fonseca da Silva, Maria José Valenzuela Bell, Virgílio de Carvalho dos Anjos (2019), "*FTIR-ATR determination of protein content to evaluate whey protein concentrate adulteration*", LWT, Volume 99, Pages 166-172, ISSN 0023-6438, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.079>.
- Bear RJ, Frank JF, Loewenstein M, Birth GS. (1983). *Compositional analysis of whey powders using near infrared diffuse reflectance spectroscopy*. J Food Sci 48:959–61.
- Brandelli, A., Daroit, D.J., and Correa, A.P.F. (2015). *Whey as a source of peptides with remarkable biological activities*. Food Research International 73: 149–161.
- Chegini G., and Taheri M. (2013) "*Whey powder: process technology and physical properties: a review*." Middle-East journal of scientific Research 13, no. 10: 1377-1387.
- Cheryan M.; (1998). *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. 2a ed. Ed. Technomic Publishing Company, Lancaster.
- CLAL: https://www.clal.it/?section=quadro_europa&country=IT
- Clemente A. (2000), *Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition*, Trends in Food Science & Technology, Volume 11, Issue 7, , Pages 254-262, ISSN 0924-2244,
- Coates John. (2000) "*Interpretation of infrared spectra, a practical approach*."
- Curley D, Kumosinski T, Unrah J, Farrell H. (1998), *Changes in the secondary structure of bovine casein by Fourier transform infrared spectroscopy: effects of calcium and temperature*. J Dairy Sci 81:3154–62
- Daenzer, M., Petzke, K.J., Bequette, B.J. et al. (2001). *Whole-body nitrogen and splanchnic amino acid metabolism differ in rats fed mixed diets containing casein or its corresponding amino acid mixture*. The Journal of Nutrition 131 (7): 1965–1972.
- DeNysschen Carol A, Harold W Burton, Peter J Horvath, John J Leddy & Richard W Browne (2009) *Resistance training with soy vs whey protein supplements in hyperlipidemic males*, Journal of the International Society of Sports Nutrition, 6:1, 8, DOI: 10.1186/1550-2783-6-8

- Depuydt N.; (2008). "L'utilizzo dei derivati del siero nell'industria alimentare": http://www.sardegna.ricerche.it/documenti/13_143_20081215105700.pdf
- Di Marzo Larissa, Joice Pranata, and David M. Barbano (2021). "Measurement of casein in milk by Kjeldahl and sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis" American Dairy Science Association, J. Dairy Sci. 104:7448–7456 <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18794>
- Etzel, M.R. (2004). *Manufacture and use of dairy protein fractions*. J. Nutr. 134(4):996S–1002S.
- Foegeding E. A., Luck J. P.; (2003). *Whey protein products*. Encyclopedia of Dairy Sciences, Roginski H., Fuquay J. W., Fox P. F., 1a ed. Ed. Academic Press, New York.
- Gésan-Guiziou, G. (2007). "An overview of membrane applications in the dairy industry".
- Ghosh, A., Majumder, S., Awal, M.A. et al. (2013) "Arsenic Exposure to Dairy Cows in Bangladesh. Arch Environ Contam Toxicol 64, 151–159 <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9810-3>
- Gillies, M.T. (1974). *Whey Processing and Utilization*, pp. 24–31. Park Ridge, NJ: Noyes Data Corp.
- Grimble, R.F. (2006). *The effects of sulfur amino acid intake on immune function in humans. The Journal of Nutrition* 136 (6): 1660S–1665S.
- Guefai, Fatima Zohra Alejandro Martínez-Rodríguez, Guillermo Grindlay, Juan Mora, Luis Gras, (2022) "Elemental bioavailability in whey protein supplements", Journal of Food Composition and Analysis, Volume 112, , 104696, ISSN 0889-1575,
- Haug, A., Høstmark, A.T. & Harstad, O.M. (2007) Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids Health Dis* 6, 25 . <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-25>
- Henning, D.R., Baer, R.J., Hassan, A.N., and Dave, R. (2006). *Major advances in concentrated and dry milk products, cheese, and milk fat-based spreads*. J. Dairy Sci. 89:1179–1188. Wagner, J. 2001. *Membrane Filtration Handbook: Practical Hints and Tips*, 2nd ed., 129 pp. Minnetonka, MN: Osmonics.
- J.-A. Gilbert, N.T. Bendtsen, A. Tremblay, A. Astrup, (2011) "Effect of proteins from different sources on body composition", *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, Volume 21, Supplement 2, Pages B16-B31, ISSN 0939-4753, <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2010.12.008> .

- J.C Anthony, Anthony, T.G., Kimball, S.R. et al. (2001). *Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. The Journal of Nutrition* 131 (3): 856S–860S.
- Jelen Paul, and Olli Tossavainen. (2003) “*Low Lactose and Lactose-Free Milk and Dairy Products - Prospects, Technologies and Applications.*” *Australian Journal of Dairy Technology*, vol. 58, no. 2,
- Kelly J. and Kelly, P. (1995). *Desalinisation of acid casein whey by nanofiltration.* *Int. Dairy J.* 5:291–303.
- Kelly P. (2019)“*Manufacture of whey protein products: concentrates, isolate, whey protein fractions and microparticulated.*” In *Whey proteins*, pp. 97-122. Academic Press,
- Kelly, P.M. (2003). *Membrane separation.* In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, edited by H. Roginski., J.W. Fuquay, and P.F. Fox, Vol. 3, pp. 1777–1786. New York: Academic Press.
- Kilara, Arun. (2015): “*Whey and whey products.*” *Dairy processing and quality assurance* 349-366.
- Kong, Jilie, and Shaoning Yu. (2007) “*Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures.*” *Acta biochimica et biophysica Sinica* 39, no. 8: 549-559.
- Kosikowski, F.V. (1979). *Whey utilization and whey products.* *J. Dairy Sci.* 62:1149–1160.
- Kosikowski, F.V., and Mistry, V.V. (1997a). *Whey and whey foods.* In *Cheese and Fermented Milk Foods*, Vol. 1, pp. 422–453. Westport, CT: F.V. Kosikowski, LLC.
- Kosikowski, F.V., and Mistry, V.V. (1997b). *Ultrafiltration, microfiltration and nanofiltration.* In *Cheese and Fermented Milk Foods*, Vol. 1, pp. 500–519. Westport, CT: F.V. Kosikowski.
- Krissansen G. W.; (2007). *Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications.* *Journal of the American College of Nutrition*, 26, 713S-23S.
- Marchi MD, Bonfatti V, Cecchinato A, Martino GD, Carnier P. (2009). *Prediction of protein composition of individual cow milk using mid-infrared spectroscopy.* *Ital J Anim Sci* 8:399–401.
- Marella C.; (2009). *Whey Protein fraction using membrane separation technology.* M.sc thesis, South Dakota State University, Brookings.
- Market Reserch Report: <https://www.fortunebusinessinsights.com/whey-protein-market-106555>

- Muller, L.L., and Harper, W.J. (1979). *Effects on membrane processing of pretreatments of whey*. *J. Agric. Food Chem.* 27:662–664.
- Oldfield, D.J., Singh, H., and Taylor, M.W. (2005). *Kinetics of heat-induced whey protein denaturation and aggregation in skim milks with adjusted whey protein concentration*. *J. Dairy Res.* 72(3):369–378.
- Onwulata C. I. and Huth P. J. (2009) “*Whey Processing, Functionality and Health Benefits*”. John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 978-0-813-80903-8
- Paterson A. H. J.; (2009). *Production and Uses of Lactose*. In: McSweeney P., Fox F. P., *Advanced Dairy Chemistry: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*, 3a ed. Ed. Springer, New York.
- Perry, R.H., and Green, D.W. (1997). *Evaporators*. In *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, 7th ed., pp. 11-107–11-110. New York: McGraw-Hill.
- Ronghui S. (2015) *The Research on the Anti-Fatigue Effect of Whey Protein Powder in Basketball Training*. *Open Biomed Eng J.*; 9:330-4. doi: 10.2174/1874120701509010330. PMID: 26998184; PMCID: PMC4787274.
- Ryan P., Walsh G.; (2016). The biotechnological potential of whey. *Environmental Science and Bio/Technology*, 15, 479–498.
- Saxton, Rose, and Owen M. McDougal. (2021). "Whey Protein Powder Analysis by Mid-Infrared Spectroscopy" *Foods* 10, no. 5: 1033. <https://doi.org/10.3390/foods10051033>
- Scott, R. (1986). *Membrane filtration of milk and whey*. In *Cheesemaking Practice*, 2nd ed., pp. 302–311. New York: Elsevier Applied Science.
- Smithers G. W.; (2008). Whey and whey proteins from ‘gutter-to-gold’. *International Dairy Journal*, 18, 695-704.
- Suren B. Bandara, Kevin M. Towle, Andrew D. Monnot, (2020) “*A human health risk assessment of heavy metal ingestion among consumers of protein powder supplements*”, *Toxicology Reports*, Volume 7, Pages 1255-1262, ISSN 2214-7500, <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.08.001>.
- Teixeira, Filipe J. Matias, Catarina N. Faleiro, João Giro, Rita Pires, Joana Figueiredo, Helena Carvalhinho, Raquel Monteiro, Cristina P. Reis, Joana F. Valamatos, Maria J. Teixeira, Vítor Schoenfeld, Brad J. (2022) “*A Novel Plant-Based Protein Has Similar Effects Compared to Whey Protein on Body Composition, Strength, Power, and Aerobic*

Performance in Professional and Semi-Professional Futsal Players", Heitor O. Santos, Federal University of Uberlandia, Brazil <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.934438>

- Tobin, J. T., Fitzsimons, S. M., Kelly, A. L., Kelly, P. M., Auty, M. A. E., & Fenelon, M. A. (2010). *Microparticulation of mixtures of whey protein and inulin*. International Journal of Dairy Technology, 63, 3240.
- Udenigwe, Chibuike C., and Rotimi E. Aluko. (2012) "*Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits.*" *Journal of food science* 77, no. 1: R11-R24.
- Van Der Horst, H.C., Timmer, J.M.K., Robbertsen, T., and Leenders, J. (1995). *Use of nanofiltration for concentration and demineralization in the dairy industry: Model for mass transport*. J. Membr. Sci. 104:205–218.
- vander Ven C, Muresan S, Gruppen H, Bont DB, Merck KB, Voragen AGJ. (2002). *FTIR spectra of whey and casein hydrolysates in relation to their functional properties*. J Agric Food Chem 50:6943–50.
- Vasconcelos, Quezia D. Jones S., Ana Paula N. Nunes Alves, Ana Cristina H. de Souza, Maria Elisabete A. de Moraes, and Gislei F. Aragão. (2022) "*Impact of Chronic Use of Whey Protein Isolate in Two Doses Using an Experimental Model.*"
- Wang, Ting, Siow Ying Tan, William Mutilangi, Didem P. Aykas, and Luis E. Rodriguez-Saona. (2015) "*Authentication of Whey Protein Powders by Portable Mid-Infrared Spectrometers Combined with Pattern Recognition Analysis.*" *Journal of food science* 80, no. 10 C2111-C2116.