

Estudio de las propiedades emulsionantes de concentrados de proteínas de suero caprino y bovino

Ayunta, Carolina¹; Quinzio, Claudia¹; Puppo, Cecilia² e Iturriaga, Laura¹

(1) Centro de Investigación en Biofísica Aplicada y Alimentos (CIBAAL) CONICET-Universidad Nacional de Santiago del Estero.

anabelayunta@gmail.com; cmquinzio@hotmail.com; laura.iturriaga@gmail.com

(2) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) CONICET-Universidad Nacional de La Plata.

mcpuppo@gmail.com

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad emulsificante de un concentrado de proteínas de suero de leche de cabra (CPSc) obtenido en el laboratorio y compararlo con un concentrado de proteínas de suero bovino (CPSb) de origen comercial. Para ello se prepararon emulsiones con aceite de girasol (natura®) a partir de soluciones de proteína, a pH 7. Se evaluó, el efecto de la concentración de CPS (1%, 2% y 3% (p/v)) y de la fracción volumétrica de la fase oleosa (ϕ) (0,2, 0,4 y 0,6) en el índice de actividad emulsionante (IAE), índice de la estabilidad de la emulsión (IEE), índice de cremado (IC) y potencial zeta, de las emulsiones.

Los resultados obtenidos muestran que el CPSc tiene buenas propiedades emulsionantes con respecto a su control bovino, y se podría utilizar como un ingrediente alternativo al CPSb, especialmente para aquellos alimentos que requieren proteínas de suero de leche para mejorar las propiedades emulsionantes y nutricionales.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the emulsifying capacity of caprine whey protein concentrate (CPSc) obtained in the laboratory and to compare it with a commercial bovine whey protein concentrate (CPSb). Emulsions with sunflower oil (natura®) were prepared from protein solutions, at pH 7. The effect of the CPS concentration (1%, 2% and 3% (w/v)) and of the volumetric fraction of the oil phase (ϕ) (0.2, 0.4 and 0.6), in the emulsifying activity index (EAI), emulsion stability index (ESI), creaming index (CI) and zeta potential, of emulsions.

The results show that CPSc has good emulsifying properties with respect to its bovine control, and could be used as an alternative ingredient to CPSb, especially in foods that require whey proteins to improve emulsifying and nutritional properties.

Palabras Claves: concentrado de proteínas de suero de leche-propiedades emulsionantes-estabilidad.

Keywords: whey proteins concentrate- emulsifying properties-stability.

1. INTRODUCCIÓN

El suero de leche es un subproducto obtenido durante la coagulación de la leche en la fabricación de queso o de la producción de caseína. Las proteínas del suero son muy valiosas porque contienen aminoácidos esenciales, como lisina, triptófano, metionina y cistina (Zayas, 1997), y se digieren con facilidad (Hoffman & Falvo, 2004). Sin embargo, el suero de leche posee un contenido acuoso muy elevado, lo que dificulta su aprovechamiento. Es por esto, que se deben aplicar tecnologías para recuperar las proteínas y obtener aislados de proteínas de suero (APS) o concentrados de proteínas de suero (CPS) en polvo. Los APS poseen un contenido de proteínas $\geq 90\%$, mientras que en los CPS varían entre 35 y 80% de proteínas. Tanto los CPS como los APS, son muy deseables como ingredientes nutritivos por sus beneficios para la salud humana, como así también, por las propiedades funcionales. Los APS poseen mejores propiedades funcionales que los CPS, sin embargo, el elevado costo para su obtención hace que los CPS sean los más empleados en la industria alimenticia. Son productos GRAS (General Recognized as Safe) y pueden ser usados como agentes emulsificantes, espesantes, gelificantes y espumantes. Los CPS son un ingrediente potencial y versátil en el desarrollo de nuevos productos alimenticios. Pueden funcionar como un modificador de la textura, agente espesante, portador/vehículo, agente gelificante, componente de superficie activa, y agente espumante entre otras bioactividades y funcionalidades asociadas (Janser Soares de Castro, et al., 2017). Las propiedades funcionales reflejan las propiedades fisicoquímicas intrínsecas de las proteínas, es decir, composición de aminoácidos y disposición de residuos de aminoácidos, conformación, tamaño molecular, forma, "flexibilidad", hidrofobicidad molecular, grupos químicos sustituyentes (fosfato esterificado, carbohidrato) y grupos sulfhidrilos.

Las emulsiones son sistemas coloidales en los que una fase líquida se encuentra finamente dividida dentro de una fase continua (Mc Clements, 1999). Estos sistemas son termodinámicamente inestables debido a su alta energía interfacial. Es por ello que a efectos de mejorar la estabilidad se emplean agentes emulsificantes que reducen la tensión interfacial e incrementan la estabilidad cinética. Estas sustancias presentan características anfífilas que les permiten adsorberse en la interfase (e.g.: aceite-agua) y pueden ser de bajo o alto peso molecular. Entre las de alto peso molecular se encuentran las proteínas.

Las emulsiones de aceite en agua (O/W) forman parte de muchos alimentos procesados, como así también de productos farmacéuticos, cosméticos, productos de cuidado personal y agroquímicos. Las proteínas alimentarias que se encuentran en forma natural o

añadida a un alimento, juegan un papel muy importante en la formación y estabilización de emulsiones. En particular, las proteínas del suero poseen una buena capacidad y estabilidad emulsionante porque son proteínas globulares con dominios en su estructura lo suficientemente flexibles que forman películas rápidamente y disminuyen la tensión superficial. Además de la ausencia del equilibrio apropiado de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos (Yamauchi et al., 1980).

En la actualidad, existen numerosos estudios sobre las propiedades de los CPS de origen bovino, no así de los CPS de origen caprino. La leche de cabra es un recurso regional que se destina principalmente para la elaboración de quesos, y el suero obtenido se descarta o se utiliza para consumo animal. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad emulsificante de un concentrado de proteínas de suero de leche de cabra (CPS_c) obtenido en el laboratorio y compararlo con un concentrado de proteínas de suero bovino (CPS_b) de origen comercial.

2. MATERIALES

Para la elaboración del concentrado de proteínas del suero de leche de cabra (CPS_c), se utilizó suero dulce (pH > 5,6) suministrado por una fábrica local de quesos de cabra (La Carola SRL, El Polear, Banda, Argentina). El CPS_b comercial (PS-63) utilizado como muestra control fue suministrado por Arla Foods (Videbaek, Dinamarca).

3. MÉTODOS

3.1 Preparación del CPS_c

El CPS_c se obtuvo a escala laboratorio utilizando un proceso de ultrafiltración (UF). Se realizó un pretratamiento al suero centrifugándolo a $1300 \times g$ durante 10 min a 4 °C con el objetivo principal de reducir el contenido de lípidos. Después de la centrifugación, el suero desnatado se ultrafiltró utilizando una membrana con un peso molecular de corte de 10 kDa y 200 cm² de área de filtración (Vivaflow 200, Sartorius, Göttingen, Alemania). Considerando el tiempo total del proceso y aumento de la viscosidad del concentrado, el proceso UF del suero quedó definido con un factor de concentración volumétrica (VCF) igual a 7. El VCF se define como la relación del volumen inicial de la solución de suero al volumen de solución concentrada (Cheryan, 1986). Para incrementar el contenido de proteínas del concentrado final, se realizó una diafiltración (DF) en cinco etapas discontinuas. La DF consiste en diluir con agua el concentrado y recircularlo en el proceso para incrementar la concentración proteínas

y reducir la concentración de sustancias de bajo peso. El concentrado resultante después de los procesos UF y DF se liofilizó utilizando un liofilizador Lyph-Lock™ (Labconco Corporation, Kansas City, EE. UU.). La composición química del CPSc fue informada en nuestro trabajo previo (Ayunta et al., 2019).

3.2 Preparación de las emulsiones

Las emulsiones de aceite en agua (O/W) se prepararon mezclando diferentes proporciones de aceite de girasol natura® con soluciones de CPS (1%, 2% y 3% (p/v)) para obtener emulsiones con fracciones volumétricas (ϕ) de 0,2, 0,4 y 0,6 como se muestra en la Tabla 1. Las soluciones de proteínas fueron disueltas a pH 7 en un buffer fosfato de potasio 10 mM y se dejaron reposar 24 h en la heladera para completar su hidratación. La emulsificación se llevó a cabo a 20.000 rpm durante 5 min utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik, Staufen, Germany) a 25 °C. Una vez obtenida las emulsiones fueron caracterizadas por los métodos que se detallan a continuación.

Tabla 1. Composición de las emulsiones (o/w) elaboradas con soluciones de concentrado de proteínas de suero/ aceite.

Emulsión	CPS (%p/v)	Fracción volumétrica (ϕ)	ml de solución de CPS	ml de aceite
1%-0,2	1	0,2	16	4
2%-0,2	2	0,2	16	4
3%-0,2	3	0,2	16	4
1%-0,4	1	0,4	12	8
2%-0,4	2	0,4	12	8
3%-0,4	3	0,4	12	8
1%-0,6	1	0,6	8	12
2%-0,6	2	0,6	8	12
3%-0,6	3	0,6	8	12

3.3 Propiedades emulsionantes

El índice de actividad emulsificante (IAE) se determinó por el método de Pearce y Kinsella (1978), se pesó 0,1 g de emulsión recién preparada y se agregó 19,9 ml de una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,1% (p/v) preparada en el buffer fosfato pH 7, y se midió la absorbancia a $\lambda=500$ nm usando un espectrofotómetro UV-visible Jasco V630.

Para la determinación del índice de estabilidad de la emulsión (IEE), las emulsiones preparadas se mantuvieron refrigeradas durante 24 h y luego se tomaron alícuotas siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. El índice de actividad emulsionante (IAE, m^2/g) y el índice de estabilidad de la emulsión (IEE, %) de las emulsiones preparadas con CPS se calcularon usando las Ec. (1) y Ec. (2):

$$IAE (m^2/g) = \frac{(4,406 \cdot A \cdot D)}{(L \cdot \phi \cdot C)} \quad (1)$$

$$IEE (h) = \frac{T_x \Delta t}{\Delta T} \quad (2)$$

Donde C es concentración de la solución (g/m^3), A es la absorbancia a 500 nm, D es factor de dilución (adimensional), L el camino óptico (m) y ϕ es la fracción volumétrica de la fase dispersa. T es la turbidez a tiempo 0, ΔT es el cambio en la turbidez durante el periodo de almacenamiento y Δt es el intervalo de tiempo.

3.4 Índice de cremado

Para evaluar la estabilidad de las emulsiones en el tiempo, se colocaron las emulsiones en probetas graduadas de 10 ml con tapas para evitar la evaporación. Se agregó azida de sodio (0,1% p/v) para evitar el crecimiento microbiano. Las muestras se almacenaron en una estufa a 30 °C durante 28 días. Las emulsiones se separaron en una capa superior de crema y una capa inferior de suero (Hs). Se midió la altura de la fase suero (Hs) y la altura total de la emulsión (Ht) durante el tiempo de almacenamiento. El índice de cremado (IC) fue calculado según (Keowmaneechai & McClements, 2002) con la siguiente ecuación:

$$IC (\%) = \frac{Hs}{Ht} \times 100$$

3.5 Potencial Zeta

Para la medición del potencial zeta se tomaron alícuotas de 25 μ l de emulsión fresca y se diluyó con buffer fosfato de potasio a pH 7 hasta 25 ml. El potencial zeta de las emulsiones fue medido en el analizador de partículas Horiba SZ-100. Los resultados de cada medición son el promedio del potencial zeta de 30 partículas. Las mediciones se realizaron por triplicado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Propiedades emulsionantes

El IAE indica el grado en que las proteínas pueden cubrir la superficie de una gota de aceite dentro de una emulsión diluida, mientras que el IEE da una estimación de la estabilidad de la emulsión en función del tiempo (Pearce y Kinsella, 1978). Los valores de IAE (m^2/g) de las emulsiones O/W elaboradas con CPS caprino y bovino a diferentes

fracciones volumétricas (0,2, 0,4 y 0,6%) en función de la concentración de CPS (1, 2 y 3%) se muestran en la Figura 1.

El IAE fue similar para ambos CPS, a excepción de la $\phi=0,2$ en las concentraciones de 1 y 2% de CPS caprino, que mostraron mayor IAE.

El IAE disminuyó con el aumento de la concentración de proteínas en ambos CPS, esto indicaría que a bajas concentraciones de proteínas los CPS presentan buena capacidad emulsionante, principalmente el CPSc. Resultados similares han sido obtenidos por Singh et al. (2003) en emulsiones estabilizadas con caseinato de sodio. La estabilidad de las emulsiones de caseinato al 0,5% fue mejor que la preparada con una solución de caseinato al 3%, estos resultados fueron atribuidos a la presencia de una cantidad excesiva de moléculas de proteínas no adsorbidas, que promovieron la floculación de las partículas de la emulsión a través de los mecanismos de formación de puentes y depleción.

Por otra parte, Sanmartín et al. (2013) informaron un valor de IAE mayor (19,30 m²/g) para emulsiones de CPSc con 2% de proteínas y fracción volumétrica de 0,75, esta diferencia, podría deberse que realizaron la homogenización en dos etapas, utilizando en primera instancia un homogeneizador de vástago y posteriormente un homogeneizador de alta presión. Este procedimiento les permitió obtener gotitas de aceite más pequeñas y la formación de emulsiones más estables. Sin embargo, cabe destacar que las comparaciones son difíciles ya que existen numerosos factores que afectan a la formación de una emulsión, tales como el tiempo e intensidad de la emulsificación, tipo de homogeneizador empleado, concentración proteica, pH, volumen y tipo de aceite (Tornberg y Hermansson, 1977; Pearce y Kinsella, 1978).

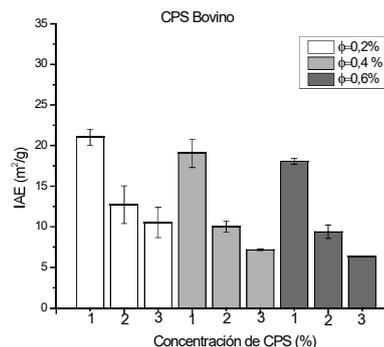
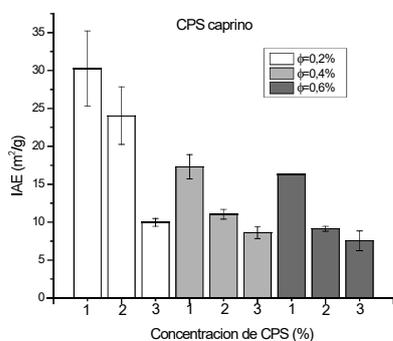


Figura 1: Efectos de la concentración del concentrado de proteínas de suero (%) y la fracción volumétrica de la fase oleosa en el índice de actividad emulsionante (IAE). A) CPSc y B) CPSb.

El IEE es un parámetro eficaz para la evaluación de la estabilidad relativa de las emulsiones estabilizadas con biopolímeros como proteínas después de un cierto tiempo de almacenamiento.

En la Figura 2 se muestra el IEE (%) de las emulsiones en función de la concentración de CPS para las diferentes fracciones volumétricas. Las emulsiones elaboradas con CPSb fueron más estables e independientes de la concentración de proteínas y del volumen de fase dispersa, respecto de las emulsiones preparadas con CPSc. Por el contrario las emulsiones con CPSc mostraron dependencia de la concentración de proteínas, principalmente a la menor fracción volumétrica. La estabilidad de las emulsiones está positivamente correlacionada con la solubilidad, lo que demuestra el papel trascendental de las proteínas solubles en la emulsificación (Patel y Kilara, 1990). Sin embargo no son necesarios valores de solubilidad del 100% (Damodaran, 2005), ya que esta propiedad aunque es un requisito, no es el único parámetro que determina o contribuye a la estabilidad de una emulsión. (De Wit y De Boer, 1975). Los CPS mostraron elevada solubilidad entre 85 y 95% a pH 7, para CPSb y CPSc, respectivamente (Ayunta et al., 2019), con lo cual se hubieran esperado estabilidades similares. Las diferencias podrían deberse a otros factores como el proceso de obtención de los CPS, ya que el CPSc fue liofilizado, mientras que el CPSb es obtenido por secado spray.



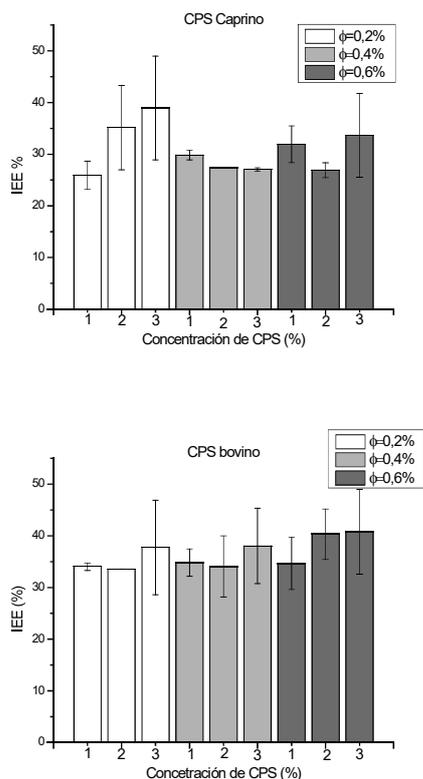


Figura 2: Efectos de la concentración del concentrado de proteínas de suero (%) y la fracción volumétrica de la fase oleosa en el índice de estabilidad de la emulsión (IEE). A) CPSc y B) CPSb.

4.2 Índice de cremado

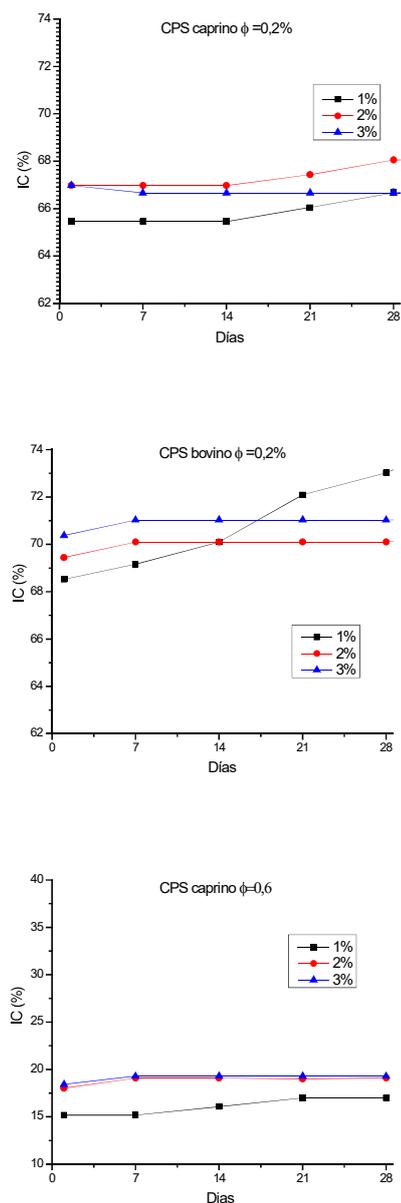
El índice de cremado (IC) provee información indirecta sobre el grado de agregación de las gotas de una emulsión, cuanto mayor es la agregación, más rápido será el cremado (Sun y Gunasekaran, 2009).

El IC (%) versus el tiempo de almacenamiento se muestran en la Figura 3 en función de la concentración de CPS y de la fracción volumétrica de la fase oleosa. En la figura se observa que el IC disminuye con el aumento de la fracción volumétrica de la fase oleosa, en ambos CPS, esto podría deberse al aumento en la fracción de empaquetamiento de las gotitas de aceite (Dickinson & Golding, 1997), lo que incrementó la viscosidad de la emulsión y redujo la tasa de cremado. El IC fue menor en las emulsiones elaboradas con CPSc en todas las fracciones volumétricas e independientes de la concentración principalmente en las concentraciones de 2 y 3 %. No obstante, el aumento de la concentración de CPSb, aumento la cobertura de la superficie de las gotas de aceite, lo que redujo el IC.

Un incremento en la concentración de CPSc aumentó ligeramente el IC en todas las fracciones volumétricas,

a excepción de las emulsiones con CPSb y fracción volumétrica de 0,6.

Todas las emulsiones, presentaron cremado a partir del día 1 y precipitados de proteína agregada a partir del día 7, lo cual podría deberse a una insolubilización de las proteínas en la fase acuosa. Se observó coalescencia en las emulsiones con 1 % (p/v) de CPSb para fracciones volumétricas de 0,6.



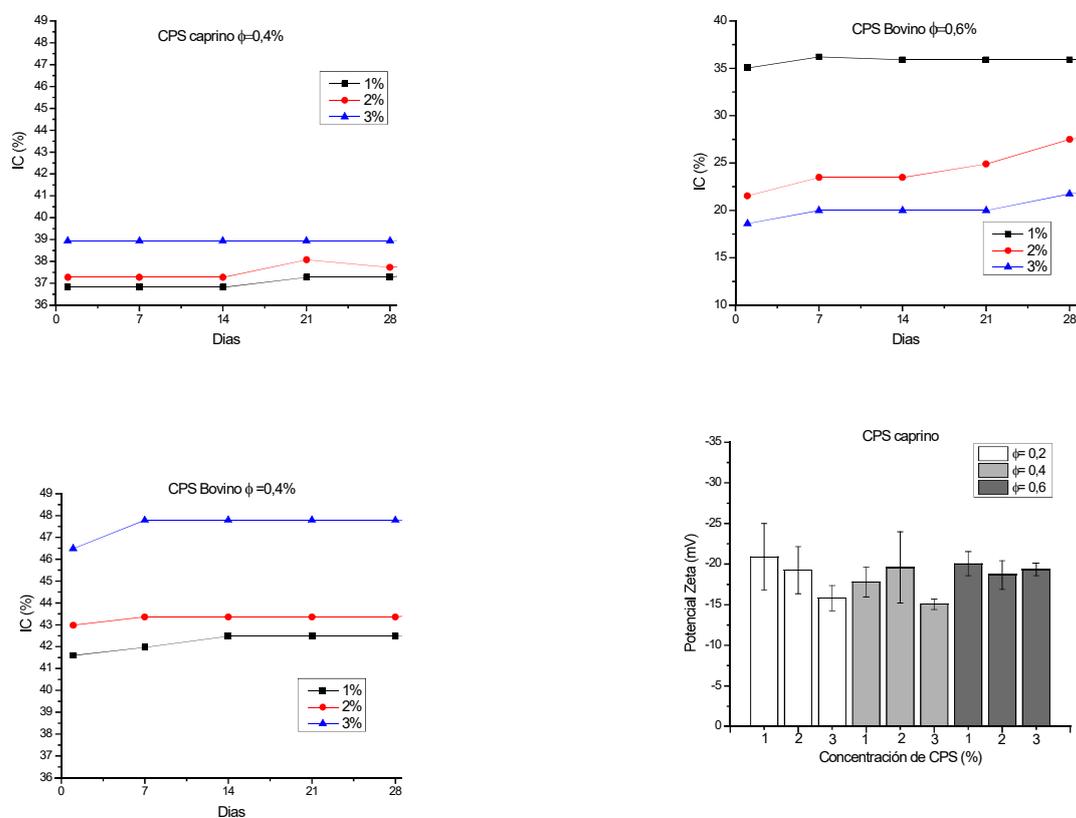


Figura 3: Efectos de la concentración del concentrado de proteínas de suero sobre el índice de cremado (IC) en las emulsiones o/w.

A) emulsiones con $\phi=0,2$; B) emulsiones con $\phi=0,4$; y C) emulsiones con $\phi=0,6$.

4.3 Potencial Zeta

El potencial zeta no es una medida directa de las cargas superficiales, pero refleja la carga neta de las gotas dentro del plano de corte (Sun & Gunasekaran, 2009).

En la Figura 4 se observa que la carga superficial de las gotas en las emulsiones elaboradas con CPSc no se vio afectado por la fracción volumétrica ni por la concentración de proteínas, sin embargo, en las emulsiones con CPSb se observó un aumento de la carga neta con el incremento de la fracción volumétrica y de la concentración de CPS, en especial en $\phi=0,2$. La adsorción de más CPS en las gotas de aceite contribuye a valores más negativos de potencial zeta (Sun & Gunasekaran, 2009).

El aumento de la concentración de CPSb mejoró la adsorción de las proteínas en las gotas de aceite debido a la disponibilidad de más CPS para formar la película interfacial, lo que contribuyó a cargas más negativas alrededor de las gotas.

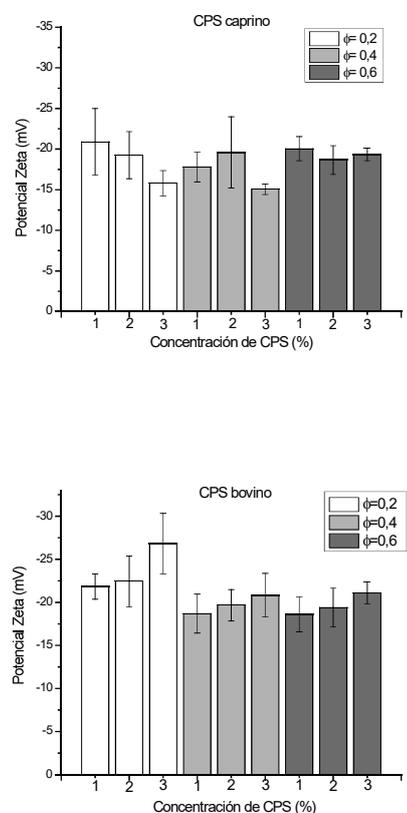


Figura 4: Valores de potencial zeta (mV) en las emulsiones O/W, en función de la concentración de concentrado de proteínas de suero y de la fracción volumétrica de la fase oleosa. A) CPSc y B) CPSb. Las barras de error muestran las desviaciones estándar de los valores medios del potencial.

5. CONCLUSION

En este trabajo fue posible recuperar las proteínas del suero de leche de cabra y elaborar un CPSc empleando una tecnología sencilla y relativamente de bajo costo. Las propiedades emulsificantes similares al CPSb, indican que el CPSc podría ser un buen sustituto al CPSb y que se podría emplear en diferentes tipos

alimentos.

Los resultados muestran que el CPSc tiene buenas propiedades emulsionantes, aun a baja concentración (1% p/v), con respecto a su control bovino. Las emulsiones preparadas con CPSc presentaron mayor IAE, menor IC y valores de índice de estabilidad y potencial zeta similares a los presentados por el CPSb.

6. REFERENCIAS

Ayunta, C. A., Quinzio, C. M., Puppo, M. C., y Iturriaga, L. B. Physicochemical properties of caprine and commercial bovine whey protein concentrate, *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13, 2729–2739, 2019.

Cheryan, M., *Ultrafiltration Handbook* Technomic Publishing Co, Lancaster, 1986.

Damodaran, S. Protein stabilization of emulsions and foams, *Journal of Food Science*, 70(3), 54-66, 2005.

De Wit, J.N. y De Boer, R., Ultrafiltration of cheese whey and some functional properties of the resulting whey protein concentrate. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 29(2/3), 198-211, 1975.

Dickinson, E., y Golding, M. . Rheology of sodium caseinate stabilized oil-in-water emulsions, *Journal of Colloid and Interface Science*, 191, 166–176, 1997.

Hoffman, J. R., & Falvo, M. J. Protein—which is best? *Journal of Sports Science & Medicine*, 3(3), 118, 2004.

Janser Soares de Castro, R., Fontenele Domingues, M., Ohara, A., Kiyomi Okuro, P., Gonçalves dos Santos, J., Peres Brexó, R., & Harumi Sato, H. Whey protein as a key component in food systems: physicochemical properties, production technologies and applications (review). *Food Structure*, 2017. DOI: 10.1016/j.foostr.2017.05.004.

Keowmaneechai, E., y McClements, D. J. Influence of EDTA and citrate on physicochemical properties of whey protein-stabilized oil-in water emulsions containing CaCl₂, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7145–7153, 2002.

McClements, D. J. *Food emulsions: Principles,*

practice and techniques. Washington: CRC Press, 1999.

Patel, M. T. & Kilara, A., Studies on whey protein concentrates. 2. Foaming and emulsifying properties and their relationships with physicochemical properties, *Journal of Dairy Science*, 73(10), 2731-2740, 1990.

Pearce, K.N., Kinsella, J.E., Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 716–723, 1978.

Sanmartín, B., Díaz, O., Rodríguez-Turiénzo, L., Cobos, A., Functional properties of caprine whey protein concentrates obtained from clarified cheese whey. *Small Ruminant Reserch*, 110, 52-56, 2013.

Singh H, Tamehana M, Hemar Y, Munro PA. Interfacial compositions, microstructure and properties of oil-in-water emulsions formed with mixtures of milk proteins and k-carrageenan: 1. Sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 17:539–48, 2003.

Sun, C. y Gunasekaran, S., Effects of protein concentration and oil-phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum, *Food Hydrocolloids*, 23 165–174, 2009.

Tornberg, E. & Hermansson, A.M., Functional characterization of protein stabilized emulsions: Effect of processing, *Journal of Food Science*, 42(2), 468-472, 1977.

Yamauchi, K., Schimizu, M., y Kamiya, T., Emulsifying properties of whey proteins, *Journal of Food Science*, 45:1237, 1980.

Zayas, J. F., *Functionality of Proteins in Food*, Springer-Verlag, Berlin, 1997.