

FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA EMULSIÓN ELABORADA CON PÉPTIDOS DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE POR COMBINACIÓN DE MÉTODOS DE ALTA Y BAJA ENERGÍA

C. E. Hernández-Mauro^a, M. Díaz-Ramírez^{b*}, G. Calderón-Domínguez^a, M. P. Salgado-Cruz^c, M. García-Garibay^b, J. Jiménez-Guzmán^b, J.J. Chanona Pérez^a

^a Laboratorio de Investigación II, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Av. Wilfrido Massieu Esq. Cda. Miguel Stampa s/n, C.P.07738 Delegación Gustavo A. Madero México, D.F. ^b Departamento de Ciencias de la Alimentación. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma. Av. Hidalgo Poniente 46, Col. La Estación, Lerma de Villada, Estado de México. 52006. México. ^c Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Insurgentes Sur 1582, Col. Crédito Constructor, Benito Juárez, Ciudad de México, Distrito Federal, 03940, México. *m.diaz@correo.ler.uam.mx

RESUMEN:

El aprovechamiento de las proteínas del suero lácteo se vuelve objeto de estudio debido a sus funciones tecnológicas. Aplicando una hidrólisis controlada con α -quimotripsina se pretende mejorar su capacidad emulsionante exponiendo los núcleos hidrofóbicos de las proteínas globulares formando péptidos más pequeños y favoreciendo las interacciones con las fases agua y aceite, utilizando una combinación de métodos de alta y baja energía (rotor-estator y desplazamiento de solvente respectivamente). El objetivo de este trabajo fue obtener una emulsión con hidrolizados de proteína de suero lácteo y su caracterización estructural mediante microscopía y análisis de imágenes, así como la medición del potencial Z. Los resultados mostraron un porcentaje de hidrólisis de $13.2 \pm 0.2\%$ y $16.2 \pm 0.7\%$ para tiempos de hidrólisis con α -quimotripsina de 3 y 4 hrs respectivamente. El hidrolizado de 3 horas y el uso de los dos métodos permitió obtener en promedio un tamaño de gota que osciló en un intervalo de 190 a 600 ηm y una carga de -58.23 mV. Estos resultados mostraron la factibilidad de obtener emulsiones a escala nanométrica con ambos métodos, con mejoras en su proceso de optimización para la obtención de un tamaño de gota más homogéneo.

ABSTRACT:

Whey proteins have excellent functional properties highly appreciated in the food manufacturing. A controlled hydrolysis with α -chymotrypsin could improve their emulsifying ability exposing their hydrophobic cores and favoring the interactions between the water and oil phases, using high and low energy methods to obtain the emulsion. The aim of this work was to produce an emulsion with whey protein hydrolysates using two methods (solvent displacement and rotor-stator, low and high energy respectively) and characterize it by microscopy, image analysis and z potential. The results showed a hydrolysis percent of $13.2 \pm 0.2\%$ and $16.2 \pm 0.7\%$ for hydrolysis times of 3 and 4 hrs respectively. The hydrolysate of 3 hours and the use of combined two methods yielded an average droplet size ranged from 190 to 600 ηm and a charge of -58.23 mV. These results showed the feasibility to produce emulsions in the nanoscale range using both methods; however it requires their optimization to obtain a smaller and homogenous drop size.

Palabras clave: métodos de alta y baja energía, nanoemulsiones, suero lácteo

Keywords: high and low energy methods, nanoemulsions, whey protein

Área: Lácteos

INTRODUCCIÓN

Las emulsiones son mezclas de fluidos inmiscibles donde usualmente uno de ellos se encuentra en forma de pequeñas gotas (fase dispersa) rodeadas por moléculas tensoactivas inmersas en una fase continua. En la mayoría de los alimentos, el tamaño de las gotas de las emulsiones oscila entre 1 y 100 μm (Quintanilla M. X. et al 2010; Hernández-Jaimes, 2013). Actualmente las nanoemulsiones son uno de los campos de aplicación más interesantes de la nanotecnología, ya que pueden actuar como sistemas de suministro de compuestos lipofílicos, como lo son nutraceuticos, drogas, sabores, antioxidantes y agentes antimicrobianos (Silva H., et al. 2011).

El diámetro de las gotas de la nanoemulsión se encuentran en el rango de 10 a 100 nm, este tamaño de gota mejora y controla la liberación, encapsulación y bioaccesibilidad de compuestos lipofílicos de interés en la industria de los alimentos (Adjonu et al., 2014). Las proteínas del suero de leche constituyen aproximadamente el 20% del total de la proteína en la leche (el 80% corresponde a la caseína), y son apreciadas por su capacidad de formar emulsiones debido a sus propiedades anfifílicas (Adjonu et al., 2014).

Una alternativa de uso de las proteínas de suero de leche es mediante su hidrólisis enzimática ya que con ella se mejora su actividad biológica, funcional, nutricional e inmunológica (Morais H. A., et al., 2013). Por otro lado este proceso también mejora su funcionalidad que al realizar una hidrólisis controlada se producen péptidos de menor tamaño, los cuales cuentan con menos estructuras secundarias y terciarias, quedando su núcleo hidrofóbico parcialmente expuesto y con propiedades emulsionantes diferentes a la proteína nativa (Adjonu et al., 2014).

Para la elaboración de emulsiones se aplican diferentes técnicas, las cuales se clasifican en métodos de alta y baja energía. El método de evaporación de solvente es una técnica de baja energía que consiste en la emulsificación de un componente bioactivo disuelto en un solvente orgánico lipofílico, en la fase acuosa con el tensoactivo por agitación, posteriormente se lleva a cabo la evaporación del solvente para formar nanoestructuras (Chu et al., 2007).

En éste trabajo se utilizó el aislado de proteína de suero sin hidrolizar e hidrolizado como emulsionante para la posible formación de una nanoemulsión, usando la técnica de baja energía de desplazamiento de solvente, junto al rotor-estator y la microfluidización. Los datos obtenidos hasta el momento han arrojado que la hidrólisis enzimática por tres horas del aislado de proteína de suero ayuda a formar emulsiones con tamaño de gota que oscila en un intervalo de 190 a 600 ηm , el cual es más pequeño en comparación al uso de las proteínas nativas o a la hidrólisis por cuatro horas.

Por otro lado, los resultados muestran que no hay diferencias significativas en la carga de las partículas medidas como potencial z entre la proteína testigo y los hidrolizados por tres y cuatro horas. El método de baja energía utilizado junto con la

hidrólisis controlada por tres horas permitió obtener una emulsión con tamaño de gota a nivel nanométrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la hidrólisis de las proteínas se realizó una solución de proteína de suero (Isopure Company, LLC 195 Engineers Road Hauppauge, NY 11788, United States, 89.6 % de proteína) al 10% en regulador de fosfatos (10 mM pH 7) y se ajustó el pH a 7.8, se agregó la enzima en una relación 1:40 enzima/sustrato, se agitó por tres horas y cuatro horas y al finalizar se calentó a 90°C por 3 min para inactivar a la enzima. Para determinar el porcentaje de hidrólisis por el método de OPA se siguió la metodología descrita por Nielsen *et al.* (2001). La formación de la emulsión se llevó a cabo preparando por separado la fase acuosa con regulador de fosfatos y el emulsificante al 5 % (tween 20, tween 80, proteínas de suero de leche testigo o los hidrolizados por 3 o 4 h), y la fase de aceite se preparó con el aceite de maíz marca comercial necesario para llegar al 5% v/v en la emulsión final, junto a etanol en una relación 1:9 aceite/etanol. Estas dos soluciones se mezclan con un homogenizador a 13500 rpm por un minuto, para después llevar la solución al rotavapor a 45°C por 45 min. Para la toma de las imágenes se utilizó el microscopio Nikon eclipse 50i, el cual viene integrado con un software de análisis de imagen para el tratamiento de las muestras. El análisis de la carga de la partícula se midió con el equipo ZetaPlus Brookfield.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las soluciones al 10% de aislado de suero de leche (WPI por sus siglas en inglés) con tiempos de hidrólisis de 3 y 4 horas con quimotripsina mostraron porcentajes de hidrólisis de 13.2±0.2% y de 16.2±0.5% respectivamente (Tabla I). Estos valores se encuentran de acuerdo a lo reportado por Adjonu *et al.* (2014) cuyo porcentaje de hidrólisis por tres horas fue de 10.6±1.1%; por otro lado, estos valores muestran que el porcentaje de hidrólisis se incrementa con respecto al tiempo.

Tabla I. Resultados del porcentaje de hidrólisis obtenido con quimotripsina por el método de OPA

Tiempo de hidrólisis (hr)	Porcentaje de hidrólisis
3	13.2±0.2
4	16.2±0.5

Los datos obtenidos por microscopía óptica (Tabla II) muestran que el 82.49% de las gotas de las emulsiones formadas con tween 20 tienen un diámetro menor a 0.5 μm , mientras que el 88.75% de las gotas de las emulsiones elaboradas con tween 80 tienen diámetros menores a 0.3 μm . Estos valores indican que el método de desplazamiento de solvente que se utilizó junto con éste tipo de emulsionantes permite la formación de nanoemulsiones.

Por otro lado, las imágenes obtenidas de las emulsiones formadas con las proteínas de suero testigo muestran que el 85.49 % de las gotas tienen un diámetro menor a 0.5 μm , la proporción de gotas en este rango aumenta a 85.64% con la hidrólisis por tres horas, y con la hidrólisis de 4 h se observa que el porcentaje va al 75.05 %. Una hidrólisis prolongada puede afectar las propiedades funcionales de las proteínas

negativamente, ya que al formar péptidos muy pequeños estos pueden no ser capaces de estabilizar las gotas de aceite, mientras que una hidrólisis mejor controlada y en un menor tiempo puede favorecer a la formación de péptidos con el tamaño y carga adecuados para estabilizar dichas gotas (Adjonu *et. al.*, 2014).

Tabla II. Distribución del tamaño del diámetro de gotas observadas por microscopía óptica

Emulsionante	Diámetro (μm)	Porcentaje
Tween 20	≤ 0.5	82.49
	0.5-1.0	13.6
	1.0-5.0	3.91
Tween 80	≤ 0.5	88.75
	0.5-1.2	11.25
Proteína testigo	≤ 0.5	82.49
	0.5-1.0	13.6
	1.0-5.0	3.91
Proteína hidrolizada 3 h	≤ 0.5	85.64
	0.5-1.0	7.14
	1.0-6.0	7.22
Proteína hidrolizada 4 h	≤ 0.5	75.05
	0.5-1.0	21.25
	1.0-5.5	3.70

La medición de potencial Z es importante en la caracterización de emulsiones, ya que la carga que presenten las gotas en su capa externa ayudará a predecir si la emulsión es estable durante el tiempo debido a la repulsión de cargas que se presenta entre ellas. Los resultados para el tween 20 (Tabla III) muestran que el potencial Z va de -15.38 ± 6.23 mV, este resultado es de esperarse ya que éste emulsificante no presente carga positiva o negativa por su naturaleza no iónica, al igual que el tween 80.

Para las emulsiones formadas con proteína de suero y sus hidrolizados, el cambio en el potencial Z no fue significativo, sin embargo se observa un incremento en la electronegatividad de las emulsiones formadas con los hidrolizados de proteína con respecto al testigo.

Tabla III. Potencial Z de las emulsiones con diferentes emulsionantes.

Prueba	Potencial z (mV)
Tween 20	-15.38 ± 6.23^a
Tween 80	-54.66 ± 5.29^b
WPI sin hidrolizar	-55.49 ± 6.09^b
WPI 3 h hidrólisis	-58.23 ± 5.62^b
WPI 4 h hidrólisis	-58.63 ± 3.95^b

BIBLIOGRAFÍA

Quintanilla-Carvajal, M. X. Camacho-Díaz, B. H. Meraz-Torres, L. S. Chanona-Pérez, J. J. Alamilla-Beltrán, L. Jiménez Aparicio, A. Gutiérrez López, G. F. 2010.

- Nanoencapsulation: A new trend in food engineering processing. *Food Engineering reviews*. 2: 39-50.
- Silva, H. Cerqueira, M. A. Vicente, A. (2012). Nanoemulsions for food applications: Development and characterization. *Food Bioprocess Technology*. 5: 854-867.
- Adjonu, R. Doran, G. Torley, P. Agboola, S. (2014). Formation of whey protein isolate hydrolyzate stabilised nanoemulsion. *Food hydrocolloids*. 41: 169-177.
- Monroy, V. A. (2014). Efecto de variables de proceso sobre tamaño de partícula y estabilidad de emulsiones de α -tocoferol y goma arábica/maltodextrina preparadas por microfluidización. Tesis de Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México. Pág. 32-45.
- Morais, H. A. Silvestre, M. P. C. Silva, V. D. M. Silva, M. R. Simoes, A. C. Silveira, S. N. Silveira, J. N. (2013). Correlation between the degree of hydrolysis and the peptide profile of whey protein concentrate hydrolysates: Effect of the enzyme type and reaction time. *American Journal of food technology*. 8 (1): 1-16.
- Voet, D. (2006). *Bioquímica*. 3^o edición; Editorial Médica Panamericana. España. Pág. 533-539.
- Chu, B. S. Ichikawa, S. Kanafusa, S. Nakajima, M. (2007), Preparation of protein-stabilized β -carotene nanodispersions by emulsification-evaporation method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 84: 1053-1062.
- Teo, A., Goh, K., Wen, J., Oey, I., Ko, S., Kwak, H., Lee, S., Physicochemical properties of whey protein, lactoferrin and tween 20 stabilised nanoemulsions: Effect of temperature, pH and salt. *Food Chemistry*. 197 : 297-306.
- Nielsen, P. M. Petersen, D. Dambmann, C. (2001). Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Food Chemistry and Toxicology. Journal of food science*. 66(5): 642-646.