

Determinación de la capacidad emulsionante de proteína extraída de almendra de *Prunus serotina* var. capuli para su aprovechamiento y valorización en la industria alimentaria

J.C. Exena-Cantú¹, A.A. Lu-Martinez¹, M. Bautista-Villarreal¹, J.G. Báez-Gonzalez¹, C.T. Gallardo¹, K. G. García-Alanís¹, R. Duran-Lugo².

¹ Departamento de alimentos, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León jose.carlos07@live.com.mx

² Tecnológico de estudios superiores de Chimalhuacán (Teschi), Estados de México.

RESUMEN: Para satisfacer la demanda de nuevos emulsionantes para la industria de alimentos y la necesidad de aprovechar los recursos naturales ya disponibles y poco utilizados, se estudió la capacidad emulsionante de la proteína extraída de la almendra de *Prunus serotina* var. capuli (*PsPC*) y se comparó con un concentrado de suero de leche (WPC) como control. Se realizó un barrido de fracción másica (0.002, 0.02, 0.1, 0.2 and 0.4 ϕ) en ambas emulsiones y a lo largo de 18 días de estudio. Se midió tamaño de partícula $D_{[3,2]}$ (μm), índice de cremado, adsorción de la proteína en la interfase (T), índice de estabilidad (IEE), índice de actividad emulsionante (IAE) y evaluación óptica a microscopio. La emulsión de *PsPC* con mejor capacidad emulsionante fue la de fracción másica de $\phi=0.2$, coincidiendo con el resultado en la emulsión control (WPC). Ambas con un $\phi=0.2$, presentaron mejor estabilidad de tamaño de partícula durante los días de estudio. En conclusión, *PsPC* puede ser implementada como emulsionante en la industria de alimentos debido a su capacidad emulsionante a una fracción másica de $\phi=0.2$, además de tratarse de una materia prima económicamente sostenible debido a su poco aprovechamiento.

Palabras clave: Emulsiones, *Prunus serotina* var. capuli, proteína.

ABSTRACT: To satisfy the demand of new emulsifiers in food industry and the need to take advantage of natural resources already available but less used, it was studied the emulsifying capacity of a protein concentrate extracted from the almond *Prunus serotina* var. capuli (*PsPC*) and compared with a whey protein concentrate (WPC) as control. A mass fraction sweep was made (0.002, 0.02, 0.1, 0.2 and 0.4 ϕ) in both emulsions along 18 days of study. It was measure droplet size $D_{[3, 2]}$ (μm), cream index, interfacial properties (T), emulsifying stability index (ESI), emulsifying activity index (EAI), and optical microscopy. The *PsPC* emulsion with better emulsifying capacity was the one with $\phi=0.2$, coinciding with emulsion control (WPC) result. Both emulsions ($\phi=0.2$), showed a better stability in droplet size along the days of study. In conclusion, *PsPC* can be implemented as emulsifier in food industry due its emulsifying capacity at a mass fraction of $\phi=0.2$, besides being an economically sustainable raw material due to its low utilization.

Keywords: Emulsions, *Prunus serotina* var. capuli y proteins.

Área: Aprovechamiento y valorización de subproductos

INTRODUCCIÓN

Hoy en día se busca aprovechar los recursos naturales existentes en el país, para cubrir, entre otros, la demanda y calidad de aditivos con capacidad emulsionante, cada vez son más investigadas las fuentes de origen natural ya sea animal o vegetal. A partir de subproductos o productos de poco interés comercial se pueden obtener biomoléculas con propiedades funcionales de interés en la industria alimentaria, que brindan ventajas económicas, ambientales e innovadoras (Martin, 2014).

En la industria alimentaria se busca siempre la calidad de los productos desarrollados en cuanto a calidad sanitaria, sensorial y fisicoquímica, entre otras. Existen muchos productos alimenticios que tienen tanto carácter oleoso como acuoso por lo que requieren métodos y tecnologías cada vez más eficientes para mantenerlos homogéneos y para mejorar la estabilidad de dichos alimentos por largos periodos de tiempo, como son en los casos de los helados, aderezos, mayonesas, salsas, refrescos. Los principales emulsionantes utilizados son de naturaleza proteica como el caseinato de sodio, lipídica

como la lecitina y de sales de muchos ácidos grasos como el monoesterato y monopalmitato de polioxietileno entre otros, el Tweens 80 (monooleato de polioxietileno sorbitano 80) reporta afectar la microbiota de la piel y sistema digestivo, desencadenando así problemas de salud, además de disminuir la acción de diversos antimicrobianos lipofílicos (Nielsen, 2016).

Una base importante en la industria alimentaria son las emulsiones de aceite en agua (O/W). Las emulsiones estabilizadas por las proteínas dependen en gran medida de sus estructuras moleculares, así como de las condiciones ambientales (por ejemplo, fuerza iónica y pH) y las condiciones de procesamiento y almacenamiento (por ejemplo, calentamiento, enfriamiento y agitación mecánica) que experimentan los alimentos durante la vida útil (Zhu, 2018).

En el presente trabajo se obtuvo un concentrado proteico de la semilla de *Prunus serotina* var. capuli (*PsPC*), se evaluó sus propiedades funcionales, específicamente la capacidad emulsionante y se determinó la estabilidad física de las emulsiones desarrolladas para incrementar su valor como subproducto y aprovechamiento de la semilla en la industria de los alimentos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales

Las almendras (*Prunus serotina* var. capuli) del fruto se consiguieron a granel sin ningún proceso previo, en el mercado de Xochimilco de la Ciudad de México y la proteína de suero de leche utilizada fue de “MBI PRO-MX” (CDMX, México), el aceite utilizado fue de canola de la marca comercial “Canoil” (Monterrey, Nuevo León). El lauril-sulfato, sacarosa, carbonato de sodio, tartrato de sodio, reactivo de Folin-Ciocalteu y (BSA) Albumina de suero bovino fueron comprados en Sigma Life Science (St. Louis, MO, USA). El Hidróxido de sodio, Ácido Clorhídrico y el sulfato de cobre fueron de Desarrollo de Especialidades Químicas (DEQ, Monterrey, Nuevo León).

Extracción de la proteína *PsPC*

Las almendras se extrajeron del hueso del Capulín, fueron desgrasadas por una prensa manual en frío (con molienda y prensado simultáneo) y se terminó de desgrasar por maceración con hexano, posteriormente se pulverizó y tamizó para obtener la harina. La preparación del *PsPC* se llevó a cabo mediante múltiples series pequeñas donde se utilizaron 10g de harina disuelta en agua destilada (1:20 p/v), y se ajustó a pH 11 para agitación en Vortex (Vortex mixer, Labnet) por una hora, después se centrifugó (Hermle, Labnet, Inc., Edison, NJ, USA) a 13,000 g por 30 min. El sobrenadante recuperado se ajustó a pH 3.0 y se dejó reposar por un período de 30 min, finalmente paso a centrifugación (Hermle, Labnet Z326, Labnet International, Inc., Wehingen, Germany) a 13,000 g por 30 min y se recolectó el precipitado.

Contenido de proteína

Se realizó la determinación del contenido de proteína por método de Kjeldahl al concentrado proteico *PsPC*, siguiendo las metodologías de la AOAC (1990).

Preparación de las emulsiones

Se elaboraron emulsiones con fracción másica específica (Tab.1), para ello se utilizó 1% de *PsPC*/WPC (con hidratación previa durante toda la noche), 0.05% de azida de sodio y la cantidad de aceite y agua correspondiente (Tab.1). La homogeneización fue por 5 min (2 min a 1000rpm y 3 min a 3000rpm, OMNI International, GLH, Kennesaw, GA, USA). Los lotes de emulsiones preparadas fueron de un contenido neto de 50g, y hechas por triplicado.

Aceite (%)	Fracción másica (ϕ)	Proteína (%)	El contenido restante fue de agua.
0.2	0.002	1	
2	0.02	1	
10	0.1	1	
20	0.2	1	
40	0.4	1	

Medición de tamaño de partícula y micrografía

La capacidad emulsionante de PsPC fue comparada con WPC. El tamaño de partícula de las emulsiones se midió por difracción láser (Mastersizer 3000, Malvern Instruments Ltd). Los resultados se dieron como el diámetro medio ponderado en área $D_{[3,2]}$. Las mediciones se realizaron por quintuplicado por 18 días cada 3 días. Las micrografías fueron tomadas con un microscopio Leica ICC50 con ayuda del programa Leica Application Suite LAS EZ, versión 2.0.0 (Leica microsystems, Wetzlar, Alemania).

Índice de cremado

Se determinó por la medición de la altura de la capa opaca (X_1) y la altura total (X_2). Al terminar los días de almacenamiento, el índice de cremado se calculó con la ecuación:

$$\text{Índice de cremado} = 100 \cdot (X_1/X_2)$$

Adsorción de la proteína en la interfase

Para determinar la adsorción de la proteína en la interfase se diluyeron partes de alícuota de 2mL de las emulsiones con 2mL de 50% (p/v) de solución de sacarosa. Después del vórtice (Vortex mixer, Labnet), se tomaron 2mL y se mezclaron con 7mL de solución de sacarosa al 5% (p / v). Las muestras se centrifugaron a 3500g durante 30 min (Hermle, Labnet Z326, Labnet International, Inc., Wehingen, Germany). Después de la centrifugación, se observaron dos fases: la crema de la parte superior y la fase acuosa estaba en la parte inferior del tubo centrífugo. Los tubos se congelaron a - 4°C durante 24h. Las fases de crema fueron removidas. La proteína adsorbida en la fase cremosa se obtuvo agregando 20 ml de SDS al 1.0% (p / v). Las concentraciones de proteínas adsorbidas (Cad, en mg / mL de emulsión) se determinaron por el método descrito por Markwell, Haas, Bieber y Tolbert (1978). Concentraciones de proteína interfacial (T, en mg / m²) se calcularon como:

$$T = \frac{C_{ad}}{S_v}, \text{ donde, } S_v \text{ es emulsión gotitas área interfacial específica (m}^2\text{/mL emulsión).}$$

Índice de estabilidad (IEE) y actividad emulsionante (IAE)

El índice de actividad emulsionante (IAE) y el índice de estabilidad emulsionante (IEE) de las emulsiones PsPC y WPC se determinaron según Pearce y Kinsella (1978) y Cameron, Weber, Idziak, Neufeld y Cooper (1991) con algunas modificaciones. Se tomó una alícuota de 20µL de emulsión recién preparada y se diluyó con 5 mL de solución de SDS al 0.1%. Después se midió la absorbancia de las diluciones a 50nm con un espectrofotómetro (Thermo scientific, genesys 10S UV-Vis, EE.UU). El IAE y IEE se calcularon usando las siguientes formulas:

$$IAE \left(\frac{m^2}{g} \right) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times \text{dilution factor}}{c \times 1 \times (1 - \phi) \times 10,000} \quad IEE(\text{min}) = \frac{A_0}{A_0 - A_{10}} \times t$$

Donde, c es la concentración de proteína inicial, el factor de dilución es 250, t es 10 min, ϕ es la fracción másica de aceite y A_0 y A_{10} son las absorbancias de la emulsión diluida a 0 y 10 min respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El *PsPC* obtenido contiene $70.48 \pm 0.52\%$ de proteína en base seca según los datos obtenidos mediante el análisis proximal. Se determinó que *WPC* contiene $80.61 \pm 2.33\%$ de proteína. Los datos obtenidos de tamaño de partícula para el control *WPC* fueron menores en el primer día en comparación con las emulsiones de *PsPC* como se observa en el gráfico 1, en este caso el mejor comportamiento de *PsPC* fue en la emulsión $\phi=0.2$ estando muy cercano de los valores obtenidos del control *WPC* teniendo $D_{[3,2]}$ de 7.79 ± 0.52 y 4.68 ± 0.63 respectivamente para el día 1 y para el día 18, 6.33 ± 0.94 para *PsPC* y 5.05 ± 0.22 para *WPC* ambos representando emulsiones estables en las mismas condiciones, estos datos se asemejan a los reportados por Martin (2014) en donde compara la capacidad emulsionante de 2 proteínas vegetales y *WPI*, siendo *WPI* (aislado proteico de suero de leche), *SPI* (aislado proteico de soya) y *RPI* (aislado proteico de rubisco) con $D_{[3,2]}$ de $0.55 \mu\text{m}$, $3 \mu\text{m}$ y $0.90 \mu\text{m}$ respectivamente, donde cabe destacar la diferencia en el proceso de homogeneización de las emulsiones ya que dicho autor utilizó casi 10,000 rpm en un equipo de alta velocidad de alto corte de cizalla siendo este casi el triple de velocidad que el utilizado en el presente ensayo, sin embargo, esta comparación nos permite respaldar el buen rendimiento de *PsPC* en emulsiones con $\phi=0.2$. Los valores obtenidos de la adsorción de proteína en la interfase para *PsPC* y *WPC* se encuentran en un rango de $T= 0.01$ a 0.02 mg/m^2 siendo estos muy bajos en comparación por lo reportado en un estudio por Zhu (2018) en donde el valor de $T= 2.22 \pm 0.13 \text{ mg/m}^2$ para una emulsión preparada con aislado proteico de almendra (*Prunus dulcis* L.), generalmente un alto valor T hace referencia a una mayor estabilidad de la emulsión. Los bajos valores de T para las emulsiones con *PsPC* podrían optimizarse ajustando el pH de la emulsión a un valor específico que permita una mayor solubilidad de las proteínas lo cual influye directamente en la adsorción de proteína interfacial (Zhu, 2018). El índice de estabilidad emulsionante se vio afectado en función del aumento de la fracción másica, encontrándose esto; en el valor para la ϕ más baja ($\phi=0.002$) con 117.5 ± 2.17 min y para la ϕ más alta ($\phi=0.4$) de 29.34 ± 1.48 min en el caso de las emulsiones preparadas con *PsPC*, valores ligeramente altos en comparación con el control *WPC* con un rango de 95.83 ± 7.95 a 19.87 ± 1.08 min respectivamente, esto nos indica que a mayor concentración de aceite menor será el índice de estabilidad emulsionante, esto anterior entra en concordancia según los datos reportados por Guo (2010) con un rango de índice de estabilidad emulsionante de 35-100 min. Para el índice de actividad emulsionante se observó la relación, a mayor cantidad de aceite mayor índice de actividad emulsionante. Los valores para *PsPC* se encontraron en un rango de 0.011 - $0.033 \text{ m}^2/\text{g}$, similares a los obtenidos por el control *WPC*, en comparación con Guo (2010) que reporta un IAE de $8.3 \text{ m}^2/\text{g}$, los valores de este estudio son menores.

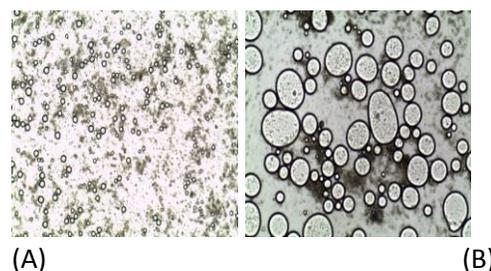


Figura 2. Micrografía de las emulsiones realizadas con *PsPC* a una fracción másica de 0.2 (ϕ). Las imágenes fueron tomadas a un aumento de 10X. (A, micrografía tomada el día 1 y B, micrografía tomada el día 18).

CONCLUSIONES

Las emulsiones preparadas con PsPC fueron estables en una fracción másica de 0.2 (ϕ) durante 18 días y mediante los resultados obtenidos de este trabajo se demostró que puede ser implementada como emulsionante en la industria de alimentos debido a su capacidad emulsionante, además de tratarse de una materia prima económicamente sostenible debido a su poco aprovechamiento.

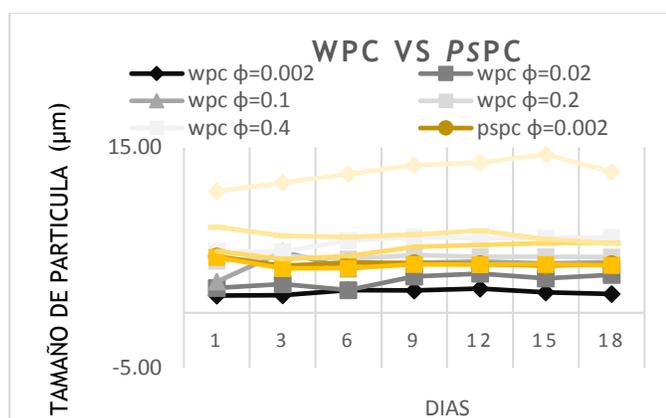


Figura 1. Distribución del tamaño de partícula (μm) de ambas emulsiones en función del tiempo (días).

BIBLIOGRAFÍA

- Cameron, D. R., Weber, M. E., Idziak, E. S., Neufeld, R. J., & Cooper, D. G. (1991). Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: correction of the formula for emulsifying activity index. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 39, 655e659.
- Guo, Q., & Mu, T. H. (2011). Emulsifying properties of sweet potato protein: Effect of protein concentration and oil volume fraction. *Food Hydrocolloids*, 25(1), 98–106. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.05.011
- Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L., & Tolbert, N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*, 87, 206e210.
- Martin A.H., Nieuwland, M., y de Jong, GAH (2014). Caracterización de geles de fijación térmica de RuBisCO en comparación con los de otras proteínas. *Diario de química agrícola y de alimentos*, 62 (44), 10783-10791. doi: 10.1021 / jf502905g
- Nielsen, CK, Kjems, J., Mygind, T., Snabe, T. y Meyer, RL (2016). Efectos de Tween 80 sobre el crecimiento y la formación de biopelículas en medios de laboratorio. *Fronteras en microbiología*, 7, 1878. doi: 10.3389 / fmicb.2016.01878
- Páez -Reyes L. M., J. Sánchez-Olarte, M. Velasco -Torres, J. F. Álvarez -Gaxiola y A. Argumedo-Macías (2013). Propuesta de estrategia para el mejoramiento del cultivo de capulín en los municipios de Domingo Arenas, Calpan y san Nicolás de los Ranchos. Ra Ximhai. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*. (9):109-119.
- Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 716e723.
- Zhu, Z., Zhao, C., Yi, J., Cui, L., Liu, N., Cao, Y. y Decker, EA (2018), ultrasonido que mejora la estabilidad física de las emulsiones de aceite en agua estabilizadas Por las proteínas de almendra. *J. Sci. Food Agric.*, 98: 4323-4330. doi: 10.1002 / jsfa.8958.