

Estabilidad de emulsiones preparadas con proteínas de sueros de soja

Wagner, J. R. ^{(1)*}, Sobral, P. A. ⁽²⁾

⁽¹⁾ Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Pcia. de Buenos Aires, Argentina - ⁽²⁾ Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas (UNLP-CONICET), La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Contacto: jwagner@unq.edu.ar

Recibido: 30/04/2010 - Aprobado: 06/09/2011

Resumen

Por precipitación con acetona en frío, se obtuvieron muestras de proteínas aisladas de dos sueros de soja, el suero SS proveniente de la obtención de aislados de soja y el suero de tofu ST. A partir del SS y del mismo suero previamente liofilizado y calentado (SSLC) se obtuvieron las proteínas denominadas PSS y PSSLC, respectivamente; a partir de ST se preparó la muestra PST. El objetivo del trabajo fue analizar la estabilidad de emulsiones o/w preparadas con las proteínas de sueros de soja en forma comparativa con un aislado de soja nativo (ASN). Las emulsiones se prepararon por homogeneización de dispersiones proteicas (0,1–1,0 % p/v en buffer fosfato 10 mM pH 7) y aceite de girasol ($\Phi_{\text{máscico}}=0,33$), empleando un Ultraturrax T-25. La estabilidad fue evaluada por medida del aceite separado, distribución de tamaño de partículas (por difracción láser) y los grados de cremado y coalescencia evaluados a través de perfiles de BackScattering. Se observó que en todas las concentraciones ensayadas las emulsiones preparadas con proteínas aisladas (por precipitación con acetona en frío) de suero de tofu tratado térmicamente (PST) tenían una estabilidad comparable a la de emulsiones preparadas con ASN. Se halló una estabilidad menor en emulsiones con proteínas nativas de suero de soja (PSS) obtenido en laboratorio no tratado térmicamente. Las proteínas obtenidas de este suero liofilizado y calentado (PSSLC) exhibieron una mejor capacidad emulsionante. Los resultados mostraron que las proteínas de sueros de soja presentan buenas propiedades emulsionantes y estabilizantes dependientes del grado de desnaturalización y glicosilación alcanzado.

Palabras clave: Emulsificación, cremado, proteínas de soja, tofu, glicosilación, floculación, tamaño de partícula.

Abstract

Soy whey proteins were obtained by precipitation with cold acetone from two whey, the whey resulting from soy isolate preparation (SS) and the tofu whey (ST). From the SS as such and of the same whey previously lyophilized and heated (SSLC), the samples called PSS and PSSLC were obtained, respectively; from ST it was prepared the PST sample. The objective of this work was to analyze the stability of emulsions prepared with whey soy proteins using native soybean isolated (ASN) as control. Emulsions were prepared by homogenization of aqueous dispersion of samples (protein range 0.1–1.0 % w/v in 10 mM phosphate buffer) and sunflower oil ($\Phi_w=0.33$) using an Ultraturrax T-25. The stability was evaluated by oiling off, particle size distribution (laser diffraction) and creaming-coalescence degree by analysis of Backscattering profiles. At all protein concentration assayed it was observed that emulsions prepared with isolated proteins (precipitated with cold acetone) from a thermal treated tofu whey (PST) exhibited a similar stability as ASN emulsions. Smaller stability was found when native soy whey proteins (PSS) were used (proteins obtained from not thermally soybean whey). An increase of emulsion stability was observed with protein obtained from heated lyophilized soy whey. These results showed that whey soy proteins could be used as good emulsifying and stabilizing agents, depending on denaturation and glycosilation degree reached during thermal treatments.

Keywords: Emulsifying, creaming, soy proteins, tofu, glycosilation, flocculation, particle size.

Introducción

Dos de los productos de soja con mayor contenido de proteínas son los aislados y el tofu. En los procesos para su obtención se busca un alto rendimiento en proteínas y la eliminación o inactivación de componentes indeseables. Los aislados se preparan a partir de un extracto alcalino de harina de soja, por precipitación ácida (pH 4,5) de las proteínas de reserva (7S y 11S) y separación del suero de soja, SS (Sorgentini y Wagner, 1999). En la obtención del tofu a partir de leche de soja, las proteínas de reserva se coagulan con sales de calcio y/o magnesio y calentamiento (10-30 min a 70-85 °C) y se crea también un suero (suero de tofu, ST). SS y ST contienen mayoritariamente hidratos de carbono y los factores antitripticos de Kunitz (FAK, 20 kDa) y de Bowman-Birk (FABB, 7 kDa) (Pearson, 1983; Cheftel, 1989). Se

generan cantidades elevadas de estos sueros a nivel industrial, lo que representa, por un lado, un problema ambiental si son descartados en forma directa y, por otro, una pérdida de componentes aprovechables por sus propiedades nutricionales o funcionales. Las proteínas de suero de soja cuando están inactivadas poseen un alto valor biológico. En el caso del ST, los factores antitripticos se encuentran casi totalmente inactivados debido a los tratamientos térmicos aplicados en la elaboración de la leche de soja y en la coagulación proteica (Sobral y Wagner, 2009).

El objetivo del trabajo fue estudiar la capacidad emulsionante de las proteínas aisladas obtenidas a partir de ST, SS, de este último secado e inactivado, en forma comparativa con el aislado nativo de soja obtenido en el laboratorio.

Materiales y Métodos

Obtención del aislado y de los sueros

El suero de soja (SS) y el aislado de soja nativo (ASN) fueron obtenidos, según los procedimientos descritos por Sorgentini y Wagner (1999), a partir de un extracto acuoso (pH=8,0) de harina de soja desgrasada no tratada térmicamente (Prosam™ R; Brasil). Por precipitación isoeléctrica (pH=4,5) de este extracto se separaron las globulinas de reserva y se obtuvo el SS. El precipitado resuspendido en agua (40 mg/ml, pH=8,0) y el suero fueron liofilizados, de donde resultaron las muestras ASN y SSL, respectivamente. El suero de tofu (ST) fue cedido por una industria local (Soyana S.H.). El suero de soja liofilizado calentado (SSLC) fue obtenido tratando térmicamente el SSL en condiciones anhidras a 5 °C/min hasta 150 °C para inactivar el FAK y desnaturalizar la lectina, L (Sobral y Wagner, 2007). A partir del SS y ST, se precipitaron las proteínas con acetona (0 °C, suero: acetona 1: 1 v/v), se separaron por centrifugación (10500g, 20 min, 4 °C) y se secaron por liofilización (PSS y PST, respectivamente). PSS contiene las proteínas FAK y L nativas en tanto que en PST están desnaturalizadas (Sobral y Wagner, 2009). De soluciones acuosas de SSLC (1: 10 p/v) se aislaron las proteínas con acetona en frío (PSSLC). En todas las muestras se determinó el contenido de proteína (Kjeldahl, Nx6,25) para preparar las emulsiones con contenidos comparables de proteína en la fase acuosa. Se estimó el grado de glicosilación (GG: g HC/100 g proteína) con el contenido de hidratos de carbono (HC) determinado por el método colorimétrico de fenol-sulfúrico.

Preparación, caracterización y estudio de emulsiones

Las emulsiones o/w se prepararon homogeneizando 10 g de dispersión (1, 5 y 10 mg de proteína/ml buffer fosfato 10 mM pH 7) con 5 g de aceite refinado de girasol a 20.000 rpm (Ultraturax T-25, rotor S25N-10G, 1 min, 20 ± 2 °C). Los diámetros de partícula $D_{1,0}$ (diámetro medio, $\sum_i n_i d_i / \sum_i n_i$) y $D_{4,3}$ (diámetro de De Brouckere, $\sum_i n_i d_i^4 / \sum_i n_i d_i^3$), ambos expresados en μm , se determinaron con un equipo Malvern Mastersizer 2000E inmediatamente después de preparadas las emulsiones. El valor $D_{1,0}$ da cuenta de la efectividad del proceso de homogeneización, en tanto que el $D_{4,3}$ permite evaluar la existencia de partículas de gran tamaño. La cinética de separación gravitacional (cremado) de las emulsiones se estudió con un analizador óptico vertical (Quick Scan, Beckman), registrando los perfiles de backscattering (BS%) y transmitancia (T%) en función de la altura del tubo de medida (cada minuto durante 1 hora) y midiendo los valores promedio de BS% y T% en la base del tubo (8-10 mm). La constante cinética de separación gravitacional (K , min^{-1}) se calculó como: $K = [10^3 / (BS_{0 \text{ prom}} \times t_{1/2})]$ donde $BS_{0 \text{ prom}}$ es el valor promedio inicial de BS% y $t_{1/2}$ el tiempo (min) para el cual $BS_{\text{prom}} = 0,5 \times BS_{0 \text{ prom}}$. El porcentaje de fase crema (FC%) se determinó a las 24 h a un $BS_{\text{prom}} = 30\%$ como $(A_c/A_0) \times 100$, donde A_c = Altura crema y A_0 = Altura inicial de la emulsión, ambos en mm. El aceite separado (AS%) de las emulsiones se determinó según Palanuwech et al. (2003), con leves modificaciones (Palazolo y Wagner, 2007).

Análisis estadístico

Todas las emulsiones ensayadas fueron realizadas por duplicado y las determinaciones de tamaño de partícula y estabilidad se realizaron al menos por triplicado. Los valores medios obtenidos son expresados con su desviación estándar. Los resultados se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias entre medias mediante el Test de Fisher a un nivel de significación $\alpha = 0.05$. (Statgraphics Plus versión 2.1, Statistical Graphics Corp., Princeton, USA).

Resultados y Discusión

En la Figura 1 se muestran las cinéticas de cremado de las emulsiones. A la menor concentración de muestra, la emulsión ASN (muestra referencia) tiene una estabilidad mayor, con valores de K más bajos (Tabla 1), en tanto que las demás emulsiones siguen un orden de estabilidad $\text{PST} > \text{PSS} > \text{PSSLC}$. A concentraciones medias, la estabilidad sigue el orden $\text{ASN} > \text{PSS} \approx \text{PST} \approx \text{PSSLC}$. Al aumentar la concentración, todas las muestras dan valores de K significativamente similares. El $D_{1,0}$ fue similar (entre 0,63-0,66 μm) para todas las muestras, que exhibieron un comportamiento bimodal y valores altos de $D_{4,3}$: 42,86; 40,26; 39,64 y 37,11 μm para PSSLC, ASN, PSS y PST, respectivamente. La clarificación en la zona inferior del tubo, cuantificada como T% a los 60 minutos (Tabla 1) da cuenta de la floculación de gotas pequeñas y el aumento de su velocidad de migración. Las emulsiones con PSS muestran la mayor tendencia a la floculación; a 10 mg/ml presentan la mayor clarificación, lo que explica la falsa señal de BS a partir de los 10 minutos (Figura 1).

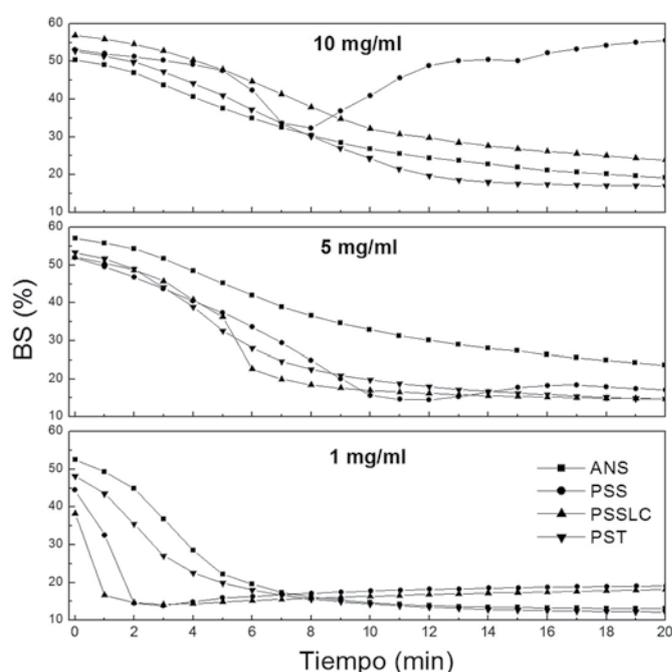


Figura 1. Separación gravitacional (cremado) de emulsiones o/w con 1, 5 y 10 mg de proteína/ml de fase acuosa. Se graficaron los valores medios de Backscattering (BS%) en la zona baja de la emulsión (8-10 mm) en función del tiempo de almacenamiento estacionario.

| Muestra | Concentración de proteína en la fase acuosa (mg/ml) | Constante cinética de separación gravitacional (K , min^{-1}) | Transmitancia (T%) |
|---------|---|--|--------------------|
| ASN | 1 | 4,4 ± 0,9 | 0,60 ± 0,38 |
| | 5 | 1,3 ± 0,5 | 0,15 ± 0,12 |
| | 10 | 1,7 ± 0,7 | 0,31 ± 0,7 |
| PSS | 1 | 14,3 ± 0,8 | 9,02 ± 0,40 |
| | 5 | 2,6 ± 0,6 | 10,22 ± 0,83 |
| | 10 | 1,7 ± 0,5 | 63,52 ± 1,24 |
| PST | 1 | 5,7 ± 0,3 | 2,28 ± 1,40 |
| | 5 | 2,9 ± 0,1 | 0,70 ± 0,32 |
| | 10 | 2,1 ± 0,1 | 2,21 ± 0,71 |
| PSSLC | 1 | 29,5 ± 1,4 | 8,86 ± 1,45 |
| | 5 | 3,3 ± 0,1 | 0,26 ± 0,15 |
| | 10 | 1,3 ± 0,1 | 0,05 ± 0,03 |

Tabla 1. Constante cinética de separación gravitacional (K) y valores de Transmitancia (T%) en la zona inferior de emulsiones con 1 hora de almacenamiento. Las emulsiones se prepararon con 1, 5 y 10 mg de proteína/ml de fase acuosa.

En las emulsiones PSSLC, T% disminuye significativamente con el incremento de la concentración, resultado opuesto a lo observado en PSS. T% en PST es menor en todas las concentraciones que en PSS. En la emulsión control y en PST el efecto de la concentración sobre T% no es significativo. Los resultados indican que las emulsiones PSSLC a 5 y 10 mg/ml (comparable con ASN a las mismas concentraciones) exhiben la menor clarificación, lo que indicaría una menor tendencia a la floculación o a la formación de floculos hidratados. Éstos últimos formarían una estructura tipo red, con mayor capacidad de retención de agua, propiedad en la que contribuirían las proteínas desnaturalizadas con un mayor grado de glicosilación. El GG fue: 12,21; 22,44; 21,16 y 46,63 % para ASN, PSS, PST y PSSLC, respectivamente. En las muestras PSS y PST, si bien tienen un valor GG similar, la presencia de proteínas desnaturalizadas en PST explica su diferente tendencia a la floculación.

La cantidad de aceite separado (AS%) fue bajo en todas las emulsiones (<5%), disminuyendo con el incremento de la cantidad de muestra (Tabla 2). A 10 mg/ml, la emulsión con el valor más bajo de AS% fue ASN; en el resto de las emulsiones el valor AS% fue significativamente similar. Dado que el $\Phi_{\text{másico}}$ es el mismo en todas las emulsiones, el volumen que ocupan las gotas de aceite en las fases crema de todas las emulsiones es también el mismo. Por lo tanto, el volumen relativo que ocupa la fase crema a las 24 h (FC%) depende directamente de la cantidad de agua que se retiene entre gotas de aceite, o sea, del grado de hidratación de dicha fase. La fase crema de ASN resultó la menos hidratada a 5 y 10 mg/ml (Tabla 2). Las cremas de PST tuvieron un grado de hidratación intermedio, en tanto que las de PSSLC incrementaron significativamente su grado de hidratación con el aumento de la concentración utilizada, lo cual puede ser relacionado con la existencia de floculos hidratados.

J.N. A method to determine free fat in emulsions. En: *Food Hydrocolloids*. 2003, 17(1):55-62.

- PALAZOLO, G.G.; WAGNER J.R. Effect of freezing on stability of soy protein and sodium caseinate oil-in-water emulsions. En: LUPANO, C.E. *Functional properties of food components*. Kerala: Research Signpost, 2007. pp. 33-56.
- PEARSON, A.M. Soy proteins. En: *Developments in food protein-2*. HUDSON, B.J.F. London: Elsevier Applied Science, 1983. pp. 67-108.
- SOBRAL, P.A.; WAGNER, J.R. Thermal properties of soybean whey and its protein. En: LUPANO, C.E. *Functional properties of food components*. Kerala: Research Signpost, 2007. pp. 57-76.
- SOBRAL, P.A.; WAGNER, J.R. Relación entre la composición y la actividad antitriptica de sueros de soja y el comportamiento térmico de sus proteínas Aisladas. En: *Información Tecnológica*. 2009, 20(5):65-73.
- SORGENTINI, D.A.; WAGNER, J.R. Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins. En: *Journal of Food Biochemistry*. 1999, 23(5):489-507.

| Muestra | Concentración de proteína en la fase acuosa (mg/ml) | | |
|---------|---|-------------|-------------|
| | 1 | 5 | 10 |
| | AS% | | |
| ASN | 2,20 ± 0,59 | 0,53 ± 0,28 | 0,12 ± 0,05 |
| PSS | 4,77 ± 0,25 | 1,08 ± 0,17 | 0,65 ± 0,03 |
| PST | 1,07 ± 0,33 | 0,52 ± 0,37 | 0,49 ± 0,25 |
| PSSLC | 2,35 ± 0,52 | 1,19 ± 0,32 | 0,59 ± 0,11 |
| | FC% | | |
| ASN | 60,2 ± 3,5 | 51,0 ± 3,0 | 48,5 ± 2,0 |
| PSS | 54,6 ± 2,9 | 65,7 ± 1,5 | 61,7 ± 2,8 |
| PST | 56,1 ± 2,7 | 54,8 ± 1,9 | 61,9 ± 1,3 |
| PSSLC | 52,1 ± 1,8 | 65,1 ± 2,6 | 63,7 ± 1,0 |

Tabla 2. Porcentajes de Aceite separado (AS%) en emulsiones iniciales y de Fase crema (FC%) en emulsiones luego de 24 h de almacenamiento.

Conclusiones

Los resultados muestran que las proteínas aisladas de sueros de soja tienen buenas propiedades emulsionantes y estabilizantes según sea el grado de desnaturalización y glicosilación alcanzado. Las dispersiones con 10 mg/ml de proteínas desnaturalizadas de suero de soja y de tofu tienen capacidad de formar y estabilizar emulsiones o/w de manera similar al aislado nativo de soja, con la característica diferencial de formar cremas más hidratadas.

Referencias

- CHEFTEL, J.-C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. *Proteínas alimentarias*. Zaragoza: Acribia, 1989. pp.257-275.
- PALANUWECH, J.; POTINENI, R.; ROBERTS, R.F.; COUPLAND,