

Análisis comparativo de propiedades funcionales de concentrados proteicos obtenidos por ultrafiltración

Laura Rodríguez Furlán, Ana Noelia Rinaldoni, Antonio Pérez Padilla y Mercedes Campderrós

Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas (INTEQUI-CONICET)
Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia (UNSL)
Chacabuco y Pedernera- 5700 San Luis- Argentina

Resumen

El crecimiento de la población mundial plantea problemas tanto cuantitativos como cualitativos relacionados con los aportes alimenticios, especialmente proteicos. Por esta razón, el estudio del mejor aprovechamiento de fuentes proteicas existentes y de las tecnologías aplicadas en su procesamiento que permitan obtenerlos con elevada calidad, constituye una materia importante. En este trabajo, los concentrados proteicos se obtuvieron por ultrafiltración y se secaron por liofilización. Las propiedades funcionales y fisicoquímicas de proteínas provenientes de diferentes fuentes: animal, como la proteína de leche, y de plasma bovino y vegetal como las proteínas de leche de soja se evaluaron comparativamente con el propósito de emplearlas en diferentes formulaciones alimenticias. Las proteínas provenientes del plasma bovino se trataron durante el procesamiento por medio de agentes protectores lo que permitió reducir los factores causantes de desnaturalización de las proteínas plasmáticas durante los procedimientos empleados.

1. Marco Teórico y Objetivos

En las últimas décadas ha surgido un gran interés en el uso de concentrados proteicos, esto se debe al aumento exponencial de la población que genera un déficit creciente a escala mundial de productos ricos en proteínas. Con el fin de satisfacer esta demanda se han realizado numerosas investigaciones tendientes a encontrar nuevas fuentes proteicas y tecnologías que permitan obtener una mayor disponibilidad y calidad de proteínas, a partir de las diferentes fuentes proteicas existentes en la actualidad (Martínez y Añón, 1996; Fernández y col., 2007; Liu y col., 2008; Marco y Rosell, 2008; Ee y col., 2009). Los diversos tratamientos a que son sometidas las proteínas producen modificaciones en su conformación nativa, estos cambios alteran las propiedades nutricionales, físicas y funcionales. Dado que las suspensiones biológicas en que se encuentran las macromoléculas proteicas difieren en tamaño molecular, la tecnología de membranas ha generado un considerable interés como una alternativa para obtener concentrados proteicos, ya que, entre otras ventajas, no requiere cambio de fase, permite trabajar a temperatura ambiente, contribuyendo a la calidad del producto obtenido.

En este trabajo, se analizan las propiedades funcionales de proteínas provenientes de diferentes fuentes: animal, como la proteína de leche, y de plasma bovino y vegetal como las proteínas de soja con el propósito de emplearlas en diferentes formulaciones alimenticias. Los concentrados proteicos se obtienen por ultrafiltración y luego son secados por liofilización, tal que el alimento se conserva por reducción de actividad del agua, y las características organolépticas y valor nutritivo resultan menos afectados. Las proteínas provenientes del plasma bovino se trataron durante el procesamiento por medio de agentes protectores (Rodríguez Furlán y col., 2008). La utilización de estos compuestos permitió reducir los factores causantes de desnaturalización de las proteínas plasmáticas durante los procedimientos empleados. Los concentrados se evaluaron

comparativamente y el concentrado de plasma presentó óptimas propiedades para ser utilizado en formulaciones alimenticias, logrando transformar un desecho de la industria cárnica en un producto de alto valor agregado.

2. Metodología

- Materias Primas: Las características se encuentran en la Tabla 1.

TABLA 1: Características de las fuentes proteicas empleadas.

Fuente proteica	Características	
Leche bovina parcialmente descremada	MILKAUT S.L. Argentina (1,5 % grasa ; 3,9 % proteína; 0,73 % ceniza)	Son las proteínas animales de mayor cantidad que consume el hombre, se emplean para reemplazar la leche materna, sus derivados entran en la composición de numerosos alimentos
Leche de soja	Alimento de soja comercial (1% de grasas, 3,2 % proteínas y 0,6 % cenizas).	Proteínas de alta calidad con capacidad de reducir los triglicéridos y colesterol, sus ácidos grasos son poliinsaturados, alto valor nutricional las hacen atractivas para la formulación de alimentos funcionales
Plasma bovino	Yerubá S.A. Argentina, Secado por spray (85 % de proteínas; 10 % de cenizas, 1 % compuestos de bajo PM).	Tradicionalmente considerado como un residuo de la industria cárnica, está siendo revalorizado dado que está básicamente compuesto por proteínas de elevada calidad nutricional

- Equipo de ultrafiltración: El equipo empleado se muestra en el Fig. 1. Consta de un cassette de Pellicon (Millipore, USA) con membranas de polisulfona, corte de peso molecular de 10 kDa. Las soluciones se impulsaron con una bomba de velocidad variable (Procon®). Se empleó un cartucho de microfiltración para proteger la membrana de UF del ensuciamiento provocado por partículas de mayor tamaño. La concentración de proteínas por UF se realizó eliminando continuamente el flujo de permeado, el proceso se detuvo cuando se logró la concentración deseada de sólidos en el concentrado. Después de cada filtración la membrana se limpió en línea (CIP) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La permeabilidad hidráulica de la membrana siempre fue recuperada, con lo cual se comprobó que el procedimiento de limpieza fue realizado correctamente.

- Etapa de liofilización: Los concentrados proteicos obtenidos por UF fueron congelados a – 40 °C y liofilizados empleando un liofilizador (Rificor S.A., Argentina) a un bar de presión durante 48 horas. Durante este proceso las moléculas de proteínas pueden sufrir la pérdida de su conformación es decir desnaturalizarse, debido a la eliminación del agua. Para evitar o minimizar este fenómeno, el concentrado de plasma bovino fue liofilizado utilizando azúcares como agentes protectores (Rodríguez Furlán y col. 2008).

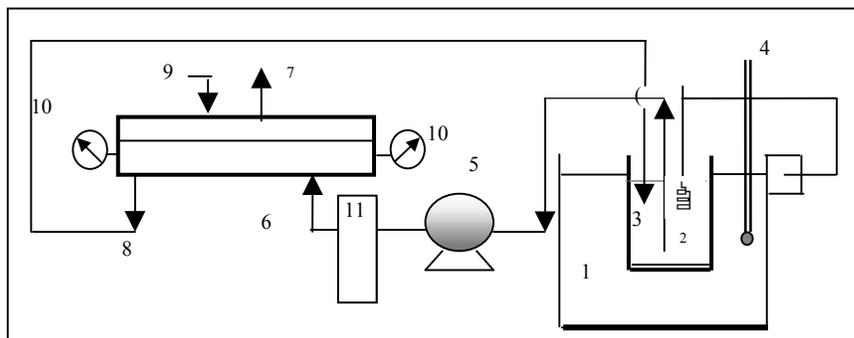


FIGURA 1: Esquema del equipo de UF. 1) Baño termostático; 2) Serpentín; 3) Tanque de alimentación; 4) Termómetro; 5) Bomba peristáltica; 6) Entrada de la solución de alimentación; 7) Flujo de permeado; 8) Flujo de concentrado; 9) Celda de UF; 10) Sensores de presión.

- Caracterización de los concentrados proteicos liofilizados: Las técnicas empleadas se describen a continuación, todas las experiencias fueron realizadas por triplicado.

- *Determinación de proteínas totales:* fue determinado por el método de Kjeldhal (P Selecta). Los factores de conversión utilizados para la expresión de los resultados fueron de: 6,38 para leche; 6,24 para plasma bovino y 5,8 para leche de soja (AOAC 978.04-968.01).
- *Solubilidad de los concentrados proteicos (S):* se determinó a 20 °C, las muestras proteicas se disolvieron en buffer fosfato en un rango de pH entre 3 y 9. Las suspensiones se agitaron durante 10 min evitando la formación de espuma y centrifugadas en una ultracentrífuga refrigerada (Beckam J2-HS) a 20.000 rpm por 30 min a 5 °C. El contenido de proteína del sobrenadante se determinó a través de espectroscopia de absorción (Espectofotómetro Shimadzu UV-150 Doble haz) a 280 nm y expresado como (Marco y Rosell, 2008):

$$S (\%) = (P_f / P_i) \times 100 \quad (1)$$

Donde: P_f = cantidad de proteína del sobrenadante; P_i = cantidad de proteína en la muestra

- *Capacidad de retención de agua (CRA) (a temperatura ambiente y pH 7,4 – 7,8):* 1 gr de concentrado proteico se le adicionó agua destilada. Se mezcló con un agitador de alta velocidad durante 5 min. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 min y luego se centrifugaron a 20.000 rpm durante 30 min a 5 °C. El sobrenadante se decantó y el sedimento se pesó y secó en estufa hasta peso constante. La capacidad de retención de agua (g de agua por g de producto) fue calculada como (Yu y col., 2007):

$$CRA = (w_1 - w_0) / (w_0 - w) \quad (2)$$

Donde: w = peso del tubo (g); w_0 = peso del tubo más la muestra seca (g); w_1 = peso del tubo más el sedimento (g)

- *Capacidad de ligamiento de grasas (CLG) (a temperatura ambiente y pH 7,4 – 7,8):* 1 gr de concentrado proteico y luego se adicionó aceite vegetal (V_1), se mezcló a alta velocidad durante 30 min. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 min y luego se

centrifugaron a 20.000 rpm durante 30 min a 5 °C. El volumen del sobrenadante fue registrado como V_2 . La capacidad de ligamiento de grasas (ml de aceite por gramo de proteína) se calculó a partir de (Yu y col., 2007):

$$CLG = (V_1 - V_2) / (w_0 - w) \quad (3)$$

- *Capacidad emulsionante (CE) (temperatura ambiente, pH 7,4–7,8)*: 1g de concentrado proteico se mezcló con agua destilada agitando durante 2 min utilizando un agitador de alta velocidad. Luego se adicionaron lentamente 500 ml de aceite vegetal con agitación constante, la cual se detuvo cada 2 min para evaluar la estabilidad de la emulsión. Cuando se observó una ruptura de la emulsión, se registró el volumen de aceite adicionado y se utilizó para calcular CE como el volumen (ml) de la emulsión de aceite por gramo de concentrado proteico (Yu y col., 2007).
- *Estabilidad de las emulsiones (EE) (a temperatura ambiente y pH 7,4 – 7,8)*: un 1 g de concentrado proteico se mezcló con agua destilada durante 2 min a de alta velocidad. Luego se adicionó aceite. A cada preparación se le agregó azida sódica al 0,05 % (p/v). Las emulsiones obtenidas se almacenaron en heladera. Diariamente se examinaron las emulsiones para observar indicio de ruptura de la emulsión durante 16 días. La EE se calculó utilizando la siguiente ecuación (Ee y col., 2009):

$$EE = (E_i / ER_i) \quad (4)$$

Donde: E_i = altura de la emulsión en el día i ; ER_i = altura de la ruptura de emulsión en el día i

- *Capacidad espumante y estabilizante (CE) (a temperatura ambiente y pH 7,4 – 7,8)*: 1 g de concentrado proteico se mezcló con agua destilada durante 3 min a de alta velocidad (V_1). El volumen final de la solución más la espuma generada se reporta como (V_F). La CE fue calculada utilizando la siguiente ecuación (Yu y col., 2007; Marco y Rosell, 2008):

$$CE = V_F / V_i \quad (5)$$

La estabilidad espumante (EES) fue determinada por la diferencia de volumen medida al transferir la mezcla a un cilindro de medición para determinar el volumen a cero y 60 min (Marco y Rosell, 2008). La estabilidad espumante fue calculada como:

$$EES (\%) = (EES_{60 \text{ min}} / EES_{\text{inicial}}) \times 100 \quad (6)$$

- **Análisis estadístico**: Los datos obtenidos se evaluaron estadísticamente a través del test de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer para los casos de más de 2 comparaciones, de lo contrario se utilizó el test t . Considerando significativo un $P < 0,05$ (SAS, 1989).

3. Resultados y Discusión

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en la caracterización de los concentrados de proteínas de plasma bovino, de leche de soja y de leche bovina.

La *absorción y retención de agua* por los ingredientes proteicos tienen un papel fundamental en la calidad de la textura de diversos alimentos especialmente carnes trituradas y pastas de panadería además esta propiedad es fundamental para alimentos viscosos tales como sopas,

salsas, masas y productos horneados. La imbibición o adsorción del agua sin disolución de la proteína, conduce a una hinchazón y le confiere propiedades tales como consistencia, espesamiento, viscosidad y adherencia (Chefter y col., 1989). Si bien la absorción total del agua aumenta con la concentración proteica, los resultados muestran que las proteínas del plasma bovino presentan una capacidad de retención de agua superior a los otros concentrados lo cual puede deberse a un mayor carácter hidrofílico de la proteína, teniendo una relación apropiada agua-proteína y a una concentración iónica óptima.

TABLA 2: Comparación de las características de los diferentes concentrados proteicos.

<i>Propiedades de las proteínas</i>	<i>Plasma</i>	<i>Leche bovina</i>	<i>Leche de soja</i>
Contenido de proteínas totales (%)	27,8 ± 0,4	34,8 ± 0,3	28,8 ± 0,2
CRA (ml de agua /g de producto)	7,31 ± 0,03	1 ± 0,05	2,05 ± 0,06
CLG (ml de aceite/ g de producto)	2,4 ± 0,1	3,90 ± 0,11	2,30 ± 0,08
CE (ml de aceite/ g de producto)	445 ± 5	790 ± 9	260 ± 7
CES (ml/ml)	1,22 ± 0,02	0	0
EE (%)	50,6 ± 0,4	-	-
Cenizas (%) (p/p)	2,5	6,7	7,5

La *capacidad de las proteínas de retención de lípidos* es muy importante para la formulación de productos para freír y para la retención de sabores. Además, disminuye el desarrollo de la rancidez oxidativa y en consecuencia aumenta la estabilidad durante el almacenamiento. La capacidad de retención de grasas fue mayor para la leche bovina; esto puede deberse al excelente carácter hidrófobo de éstas proteínas (Chefter y col., 1989).

Las determinaciones de *capacidad emulsionante* mostraron que todos los concentrados presentan buenas propiedades emulsionantes. Sin embargo, los caseinatos presentes en los concentrados de leche bovina fueron los mejores emulsionantes, esto puede deberse a que poseen una estructura disociada y desplegada naturalmente al mismo tiempo que una hidrofobicidad global relativamente elevada con una separación neta de las zonas muy hidrófilas y muy hidrófobas de la cadena del polipéptido. Además la presencia de fosfato de calcio que al combinarse con las caseínas forman estructuras con propiedades tensioactivas, de carácter anfifílicas que le confieren excelentes características emulsionantes (Chefter y col., 1989).

Es conocido que mínimas concentraciones de lípidos, alteran la *capacidad espumante*. La adsorción de los lípidos de bajo peso molecular produce la ruptura de las interacciones proteína-proteína. El debilitamiento del film viscoelástico alrededor de las burbujas de aire produce la coalescencia de las burbujas y por lo tanto la desestabilización de la espuma (Fillery Travis y col., 2000). En el caso de los concentrados proteicos de soja y leche bovina el proceso de ultrafiltración concentra, además de proteínas, los lípidos, mientras que los concentrados proteicos de plasma bovino que se encuentran exentos de lípidos presentan mayor capacidad espumante. Además, poseen un alto grado de flexibilidad conformacional, que permite que la proteína pueda desenrollarse y reordenarse más fácilmente en la interfase, formando una espuma muy estable (Clarkson y col., 1999). Las propiedades espumantes son muy utilizadas en productos alimenticios tales como confitería, coberturas batidas, postres congelados, pasteles, etc. Las proteínas del plasma bovino presentaron una excelente estabilidad en sus dispersiones (espuma y emulsión), Tabla 2, eso puede deberse a que las mezclas de polisacáridos y proteínas que son moléculas anfifílicas con actividad superficial formando un complejo proteína-

polisacárido con un rol esencial en la estabilización de espumas y emulsiones. Además, produce un refuerzo en las propiedades funcionales de las proteínas y aumenta la viscosidad de las espumas contribuyendo a la estabilidad de las mismas (Benichou y col., 2007).

3.2. Determinación de la solubilidad a diferentes pH

Desde un punto de vista práctico los datos sobre las características de solubilidad son muy útiles para poder determinar las condiciones óptimas de extracción y purificación de las proteínas, así como la separación de fracciones proteicas. La solubilidad, bajo distintas condiciones, también da una buena indicación de las aplicaciones potenciales de las proteínas, y tiene influencia sobre otras propiedades funcionales (Chefter y col., 1989). En la Figura 2, se observa la solubilidad de los diferentes concentrados proteicos en un rango de pH 3 y 9.

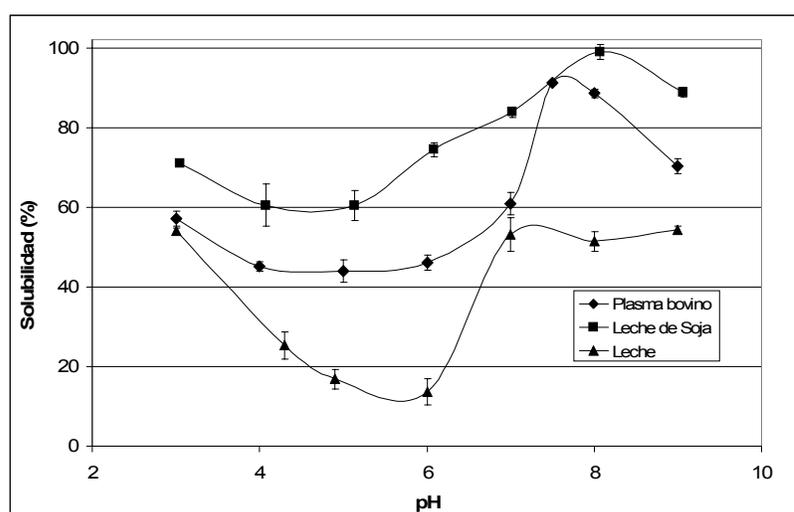


FIGURA 2: Solubilidad de los diferentes concentrados proteicos a diferentes valores de pH.

Los resultados muestran que las proteínas de soja tienen mayor solubilidad en el rango de pH estudiado ($P < 0,05$), presentan un máximo en su solubilidad a pH 8. Además, presenta su menor solubilidad a pH 5, que concuerda con el rango de pH del punto isoeléctrico (PI) de sus proteínas (pH 4,8 – 5,6). Las proteínas de leche bovina presentan una menor solubilidad ($P < 0,05$) lo cual podría estar vinculado a la concentración de Ca producida durante la UF (Chefter y col., 1989). Su menor solubilidad se encuentra en el rango entre 4,6 y 6 correspondiente a su PI.

Las proteínas del plasma bovino presentan un máximo de solubilidad a pH 7,5 y presenta una disminución en la solubilidad en el rango de pH entre 4 y 6, que concuerda con el rango en el cual se encuentra el punto isoeléctrico de sus proteínas (pH 4,6 – 5,2).

4. Conclusiones

Se compararon las propiedades funcionales de las proteínas del plasma bovino frente a las proteínas de la leche de soja y la leche bovina, obtenidas a través de procesos con membranas de ultrafiltración y posterior secado por liofilización.

Una de las características más importantes es la solubilidad proteica, ya que esta afecta las demás propiedades funcionales, se comprobó que a través del agregado de azúcares durante el

tratamiento del plasma bovino, se logró mejorar notablemente su solubilidad. Además las proteínas del plasma bovino presentan mejores capacidades de retención de agua, grasa, y emulsionante al comparar con las proteínas de la leche de soja. Las proteínas de la leche bovina presentan mejor capacidad emulsionante y retención de grasas que las proteínas del plasma bovino, pero su solubilidad es considerablemente menor, haciéndola menos apta para formulaciones de preparados líquidos, tales como jugos.

Por otra parte, las proteínas del plasma bovino presentan excelentes características espumantes, mientras que las proteínas de los concentrados de leche soja y leche bovina no poseen buenas propiedades espumantes. La estabilidad espumante de las proteínas del plasma es relativamente buena, haciéndola excelente para formulaciones de mousse, helados, cremas, etc.

Las proteínas de leche bovina y leche de soja son consideradas proteínas con excelentes propiedades funcionales. De la comparación de las mismas con el concentrado de proteínas del plasma bovino, se encontró que posee propiedades favorables, por lo tanto se las puede considerar como una buena opción para ser utilizadas como ingrediente alimenticio.

De este modo, se demuestra que a través del tratamiento aplicado se logró dar valor agregado a las proteínas plasmáticas tradicionalmente consideradas como un residuo de la industria cárnica.

5. Bibliografía

- Benichou, A.; Aserin, A.; Lutz, R.; Garti, N (2007) Formation and characterization of amphiphilic conjugates of whey protein isolate (WPI)/xanthan to improve surface activity. *Food Hydrocolloids*, 21, 379-391.
- Chefter, J. C. ; Cuq J.L.; Lorient D.(1989) Proteínas alimentarias. España, Acibia S. A.
- Clarkson, J. R.; Cui, Z. F.; Darton, R. C (1999) Protein Denaturation in Foam. *Journal of Colloid and Interface Science*, 215, 333-338.
- Ee, K. Y.; Rehman, A.; Agboola, S.; Zhao, J. (2009) Influence of heat processing on functional properties of Australian wattle seed (*Acacia victoriae* Bentham) extracts. *Food Hydrocolloids*, 23, 116-124.
- Fernández, S. S.; Menéndez, C.; Mucciarelli, S.; Padilla, A. P. (2007) Saltbush (*Atriplex lampa*) leaf protein concentrate by ultrafiltration for use in balanced animal feed formulations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 1850 -1857.
- Fillery-Travis, A.; Mills, E. N. C.; Milde, P (2000) Protein-lipid interactions at interfaces. *Grasas y Aceites*; 51; 50 – 55.
- Liu, C.; Wang, X; Ma, H.; Zhang, Z.; Gao, W.; Xiao, L (2008) Functional properties of protein isolates from soybeans stored under various conditions. *Food Chemistry*, 111, 29– 37.
- Martínez, E. N.; Añón, M. C. (1996) Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2523-2530.
- Marco, C.; Rosell, C. M (2008) Functional and rheological of protein enriched gluten free composite flours. *Journal of Food Engineering*, 88, 94 – 103.
- Rodríguez Furlán, L. T.; Pérez Padilla, A; Campderrós, M (2008) Procedimiento para la obtención de un concentrado proteico de origen animal, concentrado proteico obtenido y usos. Patente Acta: 080103386, Argentina.
- SAS USER GUIDE: Statistic. Versión (1989). SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.
- Yu, J.; Ahmedna, M.; Goktepe, I (2007) Peanut proteins concentrate: Production and functional properties as affected by processing. *Food Chemistry*, 103, 121-129.