



S.E.P.

S.E.S.

Tec.N.M.

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA

**“OBTENCIÓN DE ENCAPSULADOS DE FRACCIONES
ACTIVAS A PARTIR DE HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS
RECUPERADAS DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA
LÁCTEA.”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERIA AMBIENTAL**

PRESENTA:

JAZMÍN CASTILLO SANABRIA

No. CONTROL: 0828M0414

DIRECTOR:

DRA. CLAUDIA ROSARIO MURO URISTA

CO-DIRECTOR:

M. EN C. ROSA ELENA ORTEGA AGUILAR

METEPEC, ESTADO DE MÉXICO, MARZO DE 2019



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Toluca

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

Metepéc, Edo. de México, 05/marzo/2019.

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

DEPI-395-0241/2019

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS

C. JAZMIN CASTILLO SANABRIA
CANDIDATA AL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL
P R E S E N T E.

De acuerdo con el Reglamento de Titulación del Sistema Nacional de Educación Superior Tecnológica de la Subsecretaría de Educación Superior de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora realizó con respecto a su Trabajo de Tesis titulado "OBTENCIÓN DE ENCAPSULADOS DE FRACCIONES ACTIVAS A PARTIR DE HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS RECUPERADAS DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA LÁCTEA" la División de Estudios de Posgrado e Investigación concede autorización para que proceda a la impresión del mismo.

Sin más por el momento, quedo de usted.

ATENTAMENTE

Educación, integridad y ciencia

DR. JOSÉ LUIS GARCÍA RIVAS
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL
DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

JLGR/magj



Av. Tecnológico S/N, Col. Agrícola Bellavista, C.P. 52149,
Metepéc, Estado de México. Tels. Dirección (01722) 208 7205, Subd. Académica 208 7207,
Subd. de Planeación 208 7206, Subd. Administrativa 208 7208, Conmut. 208 72 00
e-mail: info@toluca.tecnm.mx, www.toluca.tecnm.mx



ISO 9001:2015
CERTIFIED



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MEXICO

Instituto Tecnológico de Toluca

Metepec, Méx., 01/marzo/2019

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

DEPI-395-0233/2019

DR. JOSÉ LUIS GARCÍA RIVAS
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
P R E S E N T E.

Por este medio comunicamos a usted que la Comisión Revisora designada para analizar la tesis denominada "OBTENCIÓN DE ENCAPSULADOS DE FRACCIONES ACTIVAS A PARTIR DE HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS RECUPERADAS DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA LÁCTEA", que como parte de los requisitos para obtener el grado académico de Maestra en Ciencias en Ingeniería Ambiental presenta la C. JAZMIN CASTILLO SANABRIA, con número de control 0828M0414 para sustentar el acto de Recepción Profesional, ha dictaminado que dicho trabajo reúne las características de contenido y calidad necesario para proceder a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE


DRA. CLAUDIA ROSARIO MURO URISTA
DIRECTORA DE TESIS




M. en C. ROSA ELENA ORTEGA AGUILERA
CO DIRECTORA DE TESIS


DR. FRANCISCO JAVIER ILLESCAS ARTÍNEZ
REVISOR

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL
DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN


DRA. MARÍA DEL CARMEN DÍAZ NAVA
REVISORA

JLGR/magj



Av. Tecnológico S/N, Col. Agrícola Bellavista, C.P. 52149,
Metepec, Estado de México. Tels. Dirección (01722) 208 7205, Subd. Académica 208 7207,
Subd. de Planeación 208 7206, Subd. Administrativa 208 7208, Conmut. 208 72 00
e-mail: info@toluca.tecnm.mx, www.toluca.tecnm.mx



AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a todas las personas que me apoyaron durante la realización de esta investigación y me facilitaron las herramientas para concluir la satisfactoriamente.

En especial a mi directora de tesis la Dra. Claudia Rosario Muro Urista, por su comprensión, apoyo y enseñanzas, que me guiaron durante la elaboración de esta investigación.

A mi comité tutorial por su tiempo, apoyo otorgado, enseñanzas y correcciones que hicieron a esta investigación para mejorar su contenido.

A mis amigos, por su apoyo y cariño incondicional para cumplir esta meta.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios por guiarme en esta trayectoria y llenarme de fortaleza en los momentos que la he necesitado.

A mis padres de quien siempre he recibido apoyo incondicional y por quien deseo ser una mejor persona cada día. Gracias a sus enseñanzas y esfuerzo concluyo esta meta en mi vida.

A mis hermanos, por ser mis compañeros y amigos y compartir cada uno de mis logros.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es la obtención de encapsulados de fracciones activas (antioxidantes) a partir de hidrolizados de proteínas recuperadas de efluentes de la industria láctea, a fin de mantener o prolongar la actividad biológica de los hidrolizados hasta su liberación final.

Para llevar a cabo el planteamiento anterior se recuperaron las proteínas de un efluente industrial a través de un sistema de membranas de ultrafiltración; dando como resultado un concentrado proteico con un rendimiento de 60.105%, posteriormente, el concentrado obtenido, se sometió a un proceso de hidrólisis, utilizando dos procesos enzimáticos. 1) con biomasa de *B. subtilis* y 2) con enzimas comerciales: Termolisina de *Geobacillus stearothermophilus* y Proteinasa K de *Tritirachium*. El monitoreo del proceso degradativo se realizó cada 2 h hasta llegar a las 8 h. Como resultado de la hidrólisis de proteínas, se encontró, que a las 6 h la mayoría de las fracciones alcanzaron su mayor actividad. A este tiempo el mayor grado de hidrólisis lo alcanzó la termolisina, seguido de *B. subtilis* y finalmente con escasa acción la proteinasa por lo que para estudios posteriores se descartaron los hidrolizados de proteinasa. Una vez seleccionados los hidrolizados con mayor actividad, fueron fraccionados mediante una membrana de nanofiltración para obtener productos de alrededor de 3 KDa de peso molecular y se determinó su actividad antioxidante (AA), expresada en mg de ácido ascórbico por mL de muestra (VCEAC), posteriormente estas fracciones fueron encapsuladas en dos materiales poliméricos compuestos pectina-gelatina (PG) y pectina-colágeno (PC) con fracciones de termolisina (PGT y PCT) o *B. subtilis* (PGS y PCS). Para evaluar la eficiencia de los materiales de encapsulamiento en la protección y liberación de las fracciones encapsuladas, se realizó una simulación gastrointestinal y se midió nuevamente la actividad de los encapsulados

Los resultados mostraron que las fracciones encapsuladas PCS y PGS, permiten mantener valores de actividad mayores que su contraparte no inmovilizada, las cuales pierden gran parte de su actividad. Por otro lado, se observa que las

fracciones PCT y PGT, no aportan ninguna protección ya que mantienen los valores de actividad que tendrían las fracciones libres de termolisina. Lo anterior puede atribuirse a interacciones entre los diferentes péptidos producidos por la degradación de los materiales y aquellos que se encuentran en las fracciones libres, siendo los de *B. Subtilis* los que además de mantener su actividad, logran una mejor adaptación con el material y su estructura, logrando con ello un aumento en su AA

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	v
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
INTRODUCCIÓN	1
1 FUNDAMENTOS	3
1.1 Efluentes residuales de la industria láctea	4
1.1.1 Efluentes de suero lácteo	6
1.2 Recuperación de proteínas de los efluentes de suero lácteo	6
1.3 Hidrólisis de proteínas	8
1.3.1 Hidrólisis de proteínas con bacterias proteolíticas	10
1.4 Fracciones peptídicas bioactivas de hidrolizados de suero lácteo	11
1.4.1 Capacidad biológica de los péptidos activos del lactosuero	11
1.4.2 Péptidos con capacidad antioxidante	12
1.5 Encapsulamiento de fracciones peptídicas	14
1.5.1 Sistemas y técnicas de encapsulamiento	16
1.5.2 Materiales empleados en la encapsulación.	19
1.5.3 Aplicaciones de la microencapsulación	21
2 MÉTODO	23
2.1 Caracterización del efluente lácteo	24
2.2 Recuperación de proteínas del efluente lácteo por ultrafiltración	30
2.2.1 Caracterización del concentrado proteico	32
2.2.2 Determinación del rendimiento de la UF en el concentrado de proteínas	32
2.3 Hidrólisis de proteínas de suero lácteo utilizando <i>Bacillus subtilis</i> , Termolisina y Proteinasa	32
2.3.1 Proceso de hidrólisis usando biomasa de <i>B. subtilis</i>	33

2.3.2	Proceso de hidrólisis usando Termolisina y Proteinasa	34
2.3.3	Determinación del grado de hidrólisis de los concentrados proteicos	35
2.4	Fraccionamiento de los hidrolizados	36
2.5	Determinación de los pesos moleculares de las fracciones hidrolizadas	36
2.6	Determinación de la actividad antioxidante de las fracciones hidrolizadas	39
2.7	Encapsulamiento de fracciones activas	41
2.8	Determinación de la capacidad de liberación del sistema de encapsulamiento en condiciones gastrointestinales simuladas	41
3	RESULTADOS	43
3.1	Caracterización del efluente lácteo	43
3.2	Recuperación de proteínas del efluente lácteo por ultrafiltración	45
3.2.1	Caracterización del concentrado proteico	45
3.2.2	Determinación del rendimiento de la UF en el concentrado de proteínas	47
3.3	Hidrólisis de proteínas de suero lácteo utilizando <i>Bacillus subtilis</i> , Termolisina y Proteinasa	49
3.4	Fraccionamiento de los hidrolizados con una membrana de Nanofiltración	51
3.5	Determinación de los pesos moleculares de las fracciones hidrolizadas	51
3.6	Determinación de la actividad biológica de las fracciones hidrolizadas	53
3.7	Encapsulamiento de fracciones activas	56
3.8	Determinación de la capacidad de liberación del sistema de encapsulamiento en simulación de condiciones gastrointestinales	60
	CONCLUSIONES	64
	FUENTES DE CONSULTA	66
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
1.1. Clasificación de vertidos de la industria láctea en función de su origen	5
1.2. Ventajas y desventajas de los sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas	18
1.3. Materiales empleados en la encapsulación	21
2.1. Volúmenes de la solución patrón de albúmina método de Biuret.	29
2.2. Preparación de los geles de separación y empaquetamiento	37
2.3. Preparación de solución buffer de la muestra 4x para proteínas	38
2.4. Preparación de los reactivos de tinción y desteñido	39
3.1. Resultados obtenidos en la caracterización del efluente lácteo	43
3.2. Resultados reportados por diferentes autores acerca de las características de suero lácteo	44
3.3. Resultados de la caracterización del concentrado de proteínas	45
3.4. Resultados del rendimiento del concentrado de proteínas	47
3.5. Actividad antioxidante expresada en VCEAC de las fracciones < 3 KDa obtenidas con <i>B. subtilis</i> (50 °C y pH de 7) y termolisina (70 °C y pH de 8)	54
3.6. Actividad antioxidante (mg/mL) obtenida en partículas cargadas digeridas, no digeridas y péptidos libres	60

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1.1. Proceso de Ultrafiltración de suero lácteo para la concentración de proteínas	7
1.2 Clasificación de las enzimas según su sitio de acción	9
1.3. Técnicas de encapsulamiento	17
1.4 Sistemas de encapsulamiento a) Liposoma, b) Microesfera	19
2.1. Etapas de la metodología de investigación	23
2.2. Determinación de acidez en el efluente lácteo	25
2.3 Determinación de azúcares reductores	26
2.4 Etapa final en la determinación de calcio	27
2.5 Sólidos totales del efluente lácteo	28
2.6 Cenizas de lactosuero	38
2.7 Determinación de proteínas con reactivo de Biuret	30
2.8 Filtración del efluente	31
2.9 Proceso de Ultrafiltración.	31
2.10 <i>Bacillus subtilis</i> en medio tripticaseína de soya.	33
2.11 Biomasa suspendida de <i>Bacillus subtilis</i> en suero lácteo	34
2.12 Hidrólisis del concentrado de proteínas	35
2.13 a) Equipo de electroforesis y muestras, b) migración de proteínas c) tinción y desteñido.	38
3.1 Efluente lácteo	43
3.2 Fraccionamiento del efluente lácteo. a) permeado, b) concentrado	45
3.3 Rendimiento de la ultrafiltración en el concentrado proteico	48
3.4 Grado de hidrólisis obtenido por los diferentes medios enzimáticos	49
3.5 Fracciones del hidrolizado	51
3.6 Resultados de Electroforesis SDS-PAGE. a) bandas características de las proteínas de suero lácteo presentes en el concentrado proteico, b) fracciones de hidrolizado > 3 kDa obtenidas con termolisina y c) fracciones de hidrolizado > 3 kDa obtenidas con <i>B. subtilis</i> para 2, 4, 6, 8 y 24 h de hidrólisis	52

3.7	Curva de calibración de ácido ascórbico para determinar la actividad antioxidante	53
3.8	Fracciones activas encapsuladas a) PG-T, b) PC-T, c) PG-S, d) PC-S.	56
3.9	Imágenes SEM de partículas cargadas a 500x. a) PC-T, b) PC-S, c) PG-T y d) PG-S.	57
3.10	Espectros FT-IR de los encapsulados con partículas cargadas de fracciones activas, a) PG-T, b) PG-S, c) PC-T, d) PC-S	58

INTRODUCCIÓN

La industria láctea genera grandes volúmenes de efluentes residuales, debido a la diversidad de productos que elabora y a los diferentes procesos que estos involucran, estos efluentes se caracterizan principalmente por tener una elevada carga orgánica, así como un alto contenido de grasas y sólidos en suspensión, lo que los convierte en un problema de carácter ambiental, al no ser tratados de manera adecuada.

Dada la riqueza en contenido de proteínas, algunos de estos efluentes pueden ser aprovechados para obtener productos con valor agregado. En este caso destacan los efluentes de suero lácteo provenientes de la elaboración del queso. Sin embargo, a pesar de que se conoce su riqueza nutricional, muchas industrias aún llevan a cabo su vertido como residuo, o lo mezclan con las aguas de lavado y de esta forma se conducen como un agua residual para su tratamiento. Otras industrias conscientes del valor del suero lácteo lo comercializan como subproducto para su uso en diversas aplicaciones.

Debido a esto, hoy en día el suero lácteo es estudiado como fuente para la elaboración de subproductos con valor comercial, permitiendo disminuir el impacto ambiental que éste genera. Uno de los usos que se le ha dado es como materia prima para la obtención de hidrolizados con péptidos biológicamente activos o moléculas nutraceuticas de gran aplicación en la industria de alimentos y fármacos (Muro *et al.*, 2011). Sin embargo, sus beneficios *in vivo* son cuestionados debido a su baja biodisponibilidad oral, ya que, al momento de entrar en el organismo, estas sustancias son inactivadas por las enzimas del tracto gastrointestinal reduciendo el tiempo de su efectividad, o se degradan fácilmente antes de llegar a la circulación sanguínea y por ende al sitio de acción (Alvarado *et al.*, 2016). Esta limitante ha conducido al estudio del uso de sistemas de encapsulamiento efectivos que permitan conservar y proteger las sustancias de interés para asegurar su beneficio en el organismo, garantizando su absorción y administración en una dosis adecuada.

Debido a lo expuesto anteriormente, este trabajo tiene como objetivo, obtener encapsulados de fracciones activas a partir de hidrolizados de proteínas de suero, provenientes de efluentes de la industria láctea.

Como parte del objetivo general, se contemplan los siguientes objetivos específicos: recuperar las proteínas de un efluente residual lácteo mediante concentración por ultrafiltración, obtener hidrolizados de proteínas utilizando *B. subtilis*, termolisina y proteinasa, fraccionar los hidrolizados utilizando membranas de nanofiltración e identificar las fracciones de mayor actividad biológica, para posteriormente encapsular los productos de mayor actividad y así determinar la efectividad biológica de las fracciones peptídicas encapsuladas y la capacidad de liberación del sistema de encapsulamiento en condiciones de simulación gástrica.

Como hipótesis se tiene que, 1) a partir de proteínas provenientes de efluentes de la industria láctea, es posible obtener fracciones con actividad antioxidante; 2) mediante el encapsulamiento de las fracciones activas es posible prolongar su actividad.

La presentación del trabajo se distribuye en 1. Fundamentos, donde se abordan conceptos generales sobre el tema de investigación. 2. Método, donde se establecen las etapas para llevar a cabo la investigación. 3. Resultados, en los cuales se muestran los resultados obtenidos para cada etapa establecida en el método. Finalmente se hace un listado de las referencias consultadas.

1. FUNDAMENTOS

Debido a la riqueza en contenido de proteínas, algunos efluentes de la industria láctea pueden ser aprovechados para obtener productos con valor agregado. Entre ellos se encuentran los efluentes de suero lácteo que provienen de la elaboración del queso, sin embargo, a pesar de que se tiene conocimiento de la riqueza nutricional de este efluente, muchas industrias aún llevan a cabo su vertido como residuo, o bien, permiten que se mezcle con las aguas de lavado, evitando que sea aprovechado, considerándolo como un agua residual para su tratamiento. En contraste, otras industrias conscientes del valor del suero lácteo lo han comercializado como subproducto para su uso en diversas aplicaciones.

Hoy en día, el lactosuero es estudiado como materia prima para la obtención de hidrolizados con péptidos biológicamente activos o moléculas nutraceuticas de gran aplicación en la industria de alimentos y fármacos (Muro *et al.*; 2011). Sin embargo, sus beneficios *in vivo* son cuestionados debido a su carente biodisponibilidad oral, ya que, al momento de entrar en el organismo, estas sustancias son inactivadas por las enzimas del tracto gastrointestinal reduciendo el tiempo de su efectividad, o se degradan fácilmente antes de llegar a la circulación sanguínea y por ende al sitio de acción (Alvarado *et al.*, 2016). Esta limitante ha conducido al estudio del uso de sistemas de encapsulamiento a fin de conservar y proteger las sustancias de interés para asegurar su beneficio en el organismo, garantizando su absorción y dosificación adecuada en la zona deseada.

A la fecha, se encuentran disponibles diversas investigaciones sobre el encapsulamiento de moléculas activas de origen natural como insulina, carotenoides, licopeno, polifenoles y flavonoides, las cuales pueden ser consultadas en Muro *et al.* (2014) y Alvarado *et al.* (2016). Sin embargo, estudios sobre encapsulamiento de hidrolizados proteicos y/o moléculas activas provenientes de éstos, son escasos y más aún de suero lácteo, algunos de los trabajos de investigación sobre inmovilización, de proteínas o péptidos, son descritos por Van *et al.* (2000); Saez *et al.* (2007); Dai *et al.* (2005); Mohan *et al.* (2016); Giroux *et al.*

(2016); Gómez *et al.* (2016); Tamm *et al.* (2016), siendo un tema de interés actual y de suma importancia, ya que permite el aprovechamiento de un residuo para obtener sustancias activas.

1.1 Efluentes residuales de la industria láctea

La industria láctea es una de las principales fuentes de generación de efluentes industriales. Esta industria se basa en el procesamiento de leche cruda, en productos como yogurt, helado, mantequilla, queso, y diversos tipos de postres por medio de diferentes procesos, tales como pasteurización, coagulación, filtración, centrifugación, enfriamiento, entre otros (Rivas *et al.*, 2010).

Los productos lácteos además de los componentes de la leche pueden contener azúcar, sal, colorantes, estabilizantes, entre otros, dependiendo de la naturaleza, tipo de producto y tecnología de producción empleada. Todos estos componentes aparecen en las aguas residuales en mayor o menor proporción, junto con aguas de limpieza y los productos que se empleen en éstas. De esta forma, las características de los efluentes lácteos pueden variar significativamente según los productos finales, el tipo de sistema y los métodos de operación utilizados en la planta de fabricación.

Algunos de los efluentes generados, se componen principalmente de diferentes diluciones de leche (o productos transformados) y agua de lavado que contiene productos químicos alcalinos y ácidos, materia orgánica, sólidos en suspensión, aceites, grasas, detergentes y nitrógeno orgánico, procedentes de la limpieza de botes, tanques y equipos de proceso (herramientas, bombas, etc.), (Carvalho *et al.*, 2013). Otro tipo de efluente es el vertido de las aguas de refrigeración y purgas de calderas, siempre y cuando el agua no esté en contacto directo con los equipos y piezas a refrigerar, contiene sólidos en suspensión y conductividades elevadas.

De todos los efluentes generados, es de gran interés aquel que se produce en la fabricación de quesos, debido a que contiene cantidades apreciables de lactosuero,

lo que además de incrementar notablemente la carga contaminante, supone la pérdida de un subproducto de alto valor económico. Por tanto, es recomendable, que se evite la incorporación del lactosuero al agua residual y que se destine a la obtención de sustancias aprovechables. En la Tabla 1.1, se resumen las características de los vertidos en función de su origen, en ella se observa que los efluentes de la industria láctea presentan un alto contenido en materia orgánica y grasas, debido a estas características, su tratamiento se lleva a cabo en plantas convencionales, sin embargo, dado que algunos de los componentes de los efluentes, pueden ser aprovechados, hoy en día, se busca recuperar los de mayor riqueza para diversas aplicaciones.

Tabla 1.1. Clasificación de vertidos de la industria láctea en función de su origen
(Adaptado de Andrades, 2008)

Proceso productivo	Operaciones con mayor generación de aguas residuales	Contenido de los efluentes
Leche	Tratamiento térmico Envasado	Diluciones de leche. Aguas de lavado (tanques, superficies, equipos, materiales).
Nata y mantequilla	Pasteurización Batido-Amasado Envasado	Mazada o suero de mantequilla con alto contenido en grasas. Aguas de lavado de la etapa de batido y amasado con restos de mazada. Aguas de lavado, de limpieza final (equipos, materiales).
Yogurt	Limpieza, conducciones	El agua de lavado del proceso de saborizado contiene residuos de colorantes, saborizantes y estabilizadores. Aguas de lavado, de limpieza final.
Queso	Corte-Desuerado Moldeo-Prensado Salado	Lactosuero con un volumen y carga orgánica elevada. Presencia de sólidos en suspensión. Conductividad elevada (debido al vertido de cloruro sódico procedente del salado del queso). Aguas de lavado
Operaciones auxiliares	Limpieza y desinfección Refrigeración	El volumen y carga contaminante de las aguas de limpieza depende de la gestión que se realiza de las mismas. Estas generalmente contienen sólidos en suspensión, aceites, grasas, fósforo y nitratos (debido a los productos de limpieza y desinfección). El vertido de las aguas de refrigeración depende del grado de recirculación, y contiene principalmente sólidos en suspensión y conductividades elevadas.

1.1.1 Efluentes de suero lácteo

Los efluentes de suero lácteo se obtienen de la elaboración del queso, una vez que las proteínas de caseína de la leche son precipitadas. Se estima que a partir de 10 L de leche se puede producir de 1 a 2 kg de queso y un promedio de 8 a 9 kg de lactosuero. Su composición varía dependiendo de las características de la leche utilizada, el tipo de queso producido y el proceso tecnológico empleado en su elaboración, pero en general el contenido aproximado de los efluentes de suero lácteo es de 93.1% de agua, 4.9% de lactosa, 0.9% de proteína cruda, 0.6% de cenizas (minerales), 0.3% de grasa, 0.2% de ácido láctico y vitaminas hidrosolubles.

Cerca del 70% de la proteína cruda que se encuentra en el suero corresponde a proteínas con un valor nutritivo superior al de la caseína, como son β -lactoglobulina, α -lactoglobulina, inmunoglobulinas, proteosa-peptonas y enzimas nativas; su peso molecular varía de 14 a 3000 KDa (Citado en Hannibal *et al.*, 2015). La riqueza nutrimental y actividad biológica de estas proteínas ha llevado a su aprovechamiento para la obtención de nutraceúticos y péptidos activos que se pueden utilizar en la preparación de alimentos funcionales; sin embargo, estos vertidos no siempre son aprovechados, convirtiéndose en efluentes residuales de alto contenido en materia orgánica.

El vertido de efluentes de lactosuero en los ecosistemas provoca contaminación, en el caso de los suelos disminuye el rendimiento de las cosechas y propicia el fenómeno de lixiviación; en el caso del vertido en agua, reduce la vida acuática al agotar el oxígeno disuelto, lo que lo convierte en un peligro para el ecosistema y los seres vivos que allí habitan (Valencia y Ramírez, 2009).

1.2 Recuperación de proteínas de los efluentes de suero lácteo

Los efluentes de suero lácteo por sus características pueden ser aprovechados para diversos usos, sin embargo, algunas de sus aplicaciones demandan el uso de sus

componentes por separado, ya sea para aprovechar la lactosa o las proteínas, siendo estas últimas las que han despertado un gran interés debido a su potencial como materia para la elaboración de subproductos.

Las proteínas se pueden aislar de la lactosa por diferentes métodos, entre ellos precipitación, formación de complejos, liofilización, cromatografía y filtración con membranas. El proceso más utilizado debido a la rapidez con la que se lleva a cabo es la precipitación por calor o utilizando un medio ácido; sin embargo, mediante esta vía, se presenta pérdida nutricional y actividad biológica de dichos aislados (Bylund, 2003, Tovar *et al.*, 2012). Como respuesta a esta limitante, actualmente, los procesos de membrana han desplazado a los anteriores, ya que obtienen un concentrado de proteínas íntegro, y pueden utilizarse a gran escala para este fin. Las membranas utilizadas son generalmente de Ultrafiltración o Nanofiltración, a través de las cuales se hace pasar el lactosuero impulsado por presión.

En la Figura 1.1, se muestra una imagen que representa la concentración de proteínas del suero mediante Ultrafiltración.

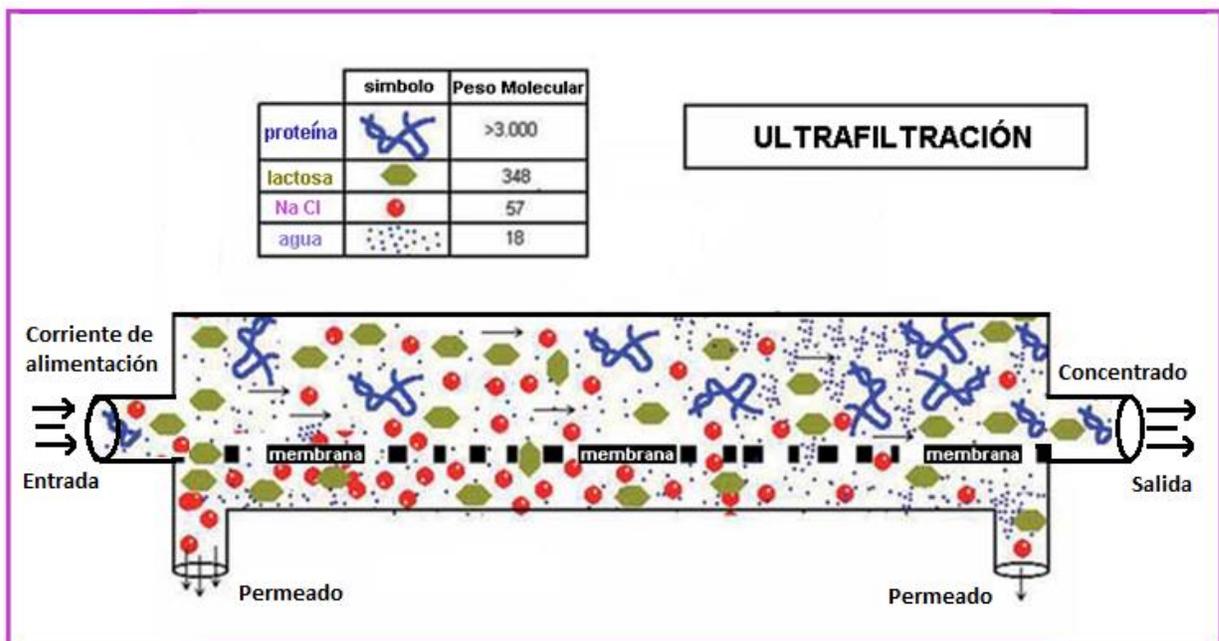


Figura 1.1. Proceso de Ultrafiltración de suero lácteo para la concentración de proteínas
(Adaptada de Gutiérrez, 2013)

El concentrado de proteínas de suero o fase enriquecida en soluto “retenido” contiene las proteínas cuyo peso molecular está de 14-3000 kDa, y se obtiene como un producto de retención o rechazo de la membrana; mientras que el filtrado contiene agua, lactosa, vitaminas y sales del suero, con pesos moleculares menores a 348 kDa (Gil, 2010). El uso de la tecnología de membranas permite además fraccionar un concentrado de proteínas obteniendo un conjunto de proteínas de bajo peso molecular y otro de alto peso molecular para obtener un concentrado específico (Krzeminski *et al.*, 2011; Dissanayake & Vasiljevic, 2009; Parra, 2009; Baldasso *et al.*, 2011).

1.3 Hidrólisis de proteínas

Las proteínas se hidrolizan con el objeto de potenciar su actividad, mejorar su funcionalidad, hacer a la proteína hipoalergénica o bien para obtener una cierta aplicación clínica. A través de este proceso las proteínas se fragmentan, obteniendo péptidos de cadena más corta con aminoácidos específicos, mejorando así su actividad biológica.

Los hidrolizados de proteína, pueden ser incorporados en los alimentos para obtener productos funcionales o bien utilizarlos en la preparación de formulaciones farmacéuticas, una vez ingeridos pasan a la circulación sanguínea generando algún efecto terapéutico al participar en la regulación de diferentes vías fisiológicas.

La hidrólisis puede ser química o enzimática. Ésta última presenta ventajas frente a la química ya que las enzimas utilizadas tienen selectividad por un determinado enlace y, por tanto, es posible obtener productos de actividad específica, conservando el valor nutritivo.

La hidrólisis enzimática se puede llevar a cabo de dos formas: utilizando enzimas comerciales o a través de cultivos proteolíticos. Las enzimas comerciales utilizadas en este tipo de hidrólisis pueden ser de origen animal, tales como la tripsina y quimiotripsina; enzimas de microorganismos o enzimas de plantas como la alcalasa

y la papaína, mientras que, si se hace por fermentación con cultivos iniciadores proteolíticos, generalmente se utilizan bacterias lácticas.

Dependiendo del sitio de acción, las enzimas proteolíticas se clasifican en endopeptidasas o proteinasas y exopeptidasas o peptidasas. Las primeras hidrolizan enlaces peptídicos en el interior de la cadena polipéptida y las segundas hidrolizan aminoácidos y dipéptidos de los extremos de las cadenas polipeptídicas (Koolman y Klausenrich, 2004; Guadix *et al.*, 2000). Estas últimas pueden dividirse a su vez en aminopeptidasas si actúan por el extremo N-terminal o carboxipeptidasas si lo hacen por el extremo C-terminal (Figura 1.2).

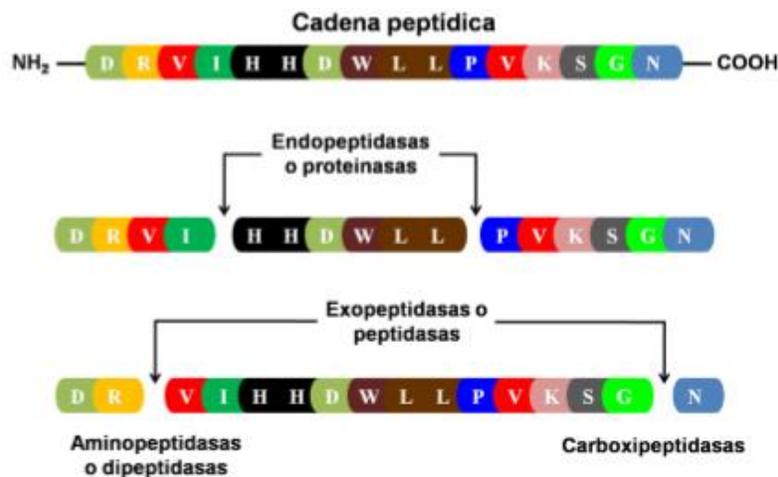


Figura 1.2. Clasificación de las enzimas según su sitio de acción (Torruco *et al.*, 2008)

Para determinar la eficiencia de la enzima o cultivo se determina el grado de hidrólisis (GH) de las proteínas, el cual se define como el porcentaje de enlaces peptídicos fragmentados en relación con la proteína original y está determinado por las condiciones utilizadas, tales como, la concentración de sustrato, la relación enzima/sustrato, tiempo de incubación, condiciones fisicoquímicas (pH y temperatura), así como la naturaleza de la enzima que determina su actividad específica.

El GH afecta directamente el peso molecular y la composición de aminoácidos de los hidrolizados (Kristinsson y Rasco, 2000). Diferentes GH indican diferentes actividades biológicas y propiedades funcionales de los hidrolizados.

De acuerdo con el GH, los hidrolizados pueden ser limitados (grado menor del 10%), o extensivos (grado mayor del 10%); los primeros son utilizados para mejorar las propiedades funcionales de las proteínas y los hidrolizados extensivos se utilizan para preparar alimentos funcionales, como suplementos nutrimentales, y para el tratamiento de síndromes específicos (Benítez *et al.*, 2008).

1.3.1 Hidrólisis de proteínas con bacterias proteolíticas

Las bacterias proteolíticas, han sido utilizadas ampliamente en la industria como cultivos iniciadores en la fermentación de alimentos. Estas bacterias generan péptidos biológicamente activos durante la fermentación de la leche por enzimas proteolíticas, algunas de estas son el *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* y *Lb. delbrueckii ssp. Bulgaricus*. El sistema proteolítico de estas bacterias puede ser dividido en 3 mecanismos: proteinasas, que degradan las proteínas en péptidos, peptidasas, que degradan los péptidos en aminoácidos, y un sistema de transporte, que introduce en la célula los productos.

Artículos recientes y capítulos de libros han revisado la liberación de diversos péptidos bioactivos de proteínas de la leche a través de la proteólisis microbiana (Gobbetti *et al.*, 2004, Gobbetti, *et al.*, 2002, Pihlanto *et al.*, 1998; Matar *et al.*, 2003). La mayoría de estos estudios informan sobre la producción de péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) o antihipertensivos, y también se han identificado péptidos inmunomoduladores, antioxidantes y antimicrobianos.

Pihlanto *et al.* (1998) estudiaron la formación potencial de péptidos inhibidores de la ECA en suero de queso y caseínas durante la fermentación con diversos iniciadores comerciales de productos lácteos utilizados en la fabricación de yogurt y leche agria.

Una importante bacteria estudiada en los últimos años, debido a su capacidad proteolítica es el *Bacillus subtilis*. Las bacterias del género *Bacillus* constituyen un grupo diverso de bacterias Gram-positivas en forma de varilla, caracterizadas por su capacidad para producir esporas resistentes. Específicamente, las diferentes

especies de *Bacillus* sintetizan y excretan una gran cantidad de enzimas proteolíticas durante su crecimiento y esporulación de forma extracelular. La mayoría de las proteinasas extracelulares aisladas de varias cepas de *B. subtilis* son de dos tipos las metaloproteasas neutras como la neutrasa que se activan a valores de pH neutro y las serinproteasas como la subtilisina que se activan a pH alcalinos. La eficacia de las proteasas bacterianas es mayor que las de origen animal, las enzimas de cultivos proteolíticos poseen un efecto sinérgico que favorece la hidrólisis en su actuación conjunta (Guadix *et al.*, 2000). Estas enzimas actúan en condiciones moderadas para la hidrólisis de proteínas, lo cual permite fragmentar las proteínas, aumentando su actividad biológica. Debido a esas características, el *B. subtilis* ha sido utilizado para hidrolizar proteínas de leche.

1.4 Fracciones peptídicas bioactivas de hidrolizados de suero lácteo

Los productos de la hidrólisis de las proteínas del suero lácteo son los hidrolizados, los cuales se conforman por péptidos con diferentes secuencias de aminoácidos y de menor peso molecular. Los hidrolizados pueden ser fraccionados mediante el uso de membranas o cromatografía de exclusión o filtración, para separar fracciones de péptidos en función de su tamaño, obteniendo productos que pueden tener mayor actividad que los propios hidrolizados. En el caso de los péptidos del suero de leche, la mayor parte de las actividades biológicas se deben principalmente a péptidos de menor tamaño (3 a 10 aminoácidos) (Alvarado y Guerra, 2010).

1.4.1 Capacidad biológica de los péptidos activos del lactosuero.

Debido a su contenido de aminoácidos esenciales, el valor biológico de las proteínas de suero de leche es elevado (Jovanovic *et al.*, 2005), por lo que cuando son hidrolizadas contienen un alto nivel de péptidos bioactivos y complejos minerales. Los péptidos bioactivos han sido definidos como fragmentos específicos de

proteínas, de origen animal o vegetal, que tienen un impacto positivo sobre funciones o condiciones corporales y que pueden influir sobre la salud humana, más allá de una nutrición normal y adecuada. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos que contengan, los péptidos pueden presentar diferente actividad biológica, entre las que se encuentran la antihipertensiva, la cual juega un papel importante en la regulación de la presión sanguínea, la opioide, vinculada con el control de la motilidad intestinal, comportamiento emocional, analgesia y saciedad, antioxidante, la cual se describe como la habilidad de inhibir los daños causados por la oxidación lipídica, capacidad para la eliminación de radicales y las propiedades de quelación de iones metálicos (Sarmadi y Ismail, 2010), antimicrobiana, en la cual se altera y penetra la estructura lipídica de la membrana celular del microorganismo, lo que conduce a su destrucción, haciéndola más permeable lo que permite la fuga del material del citoplasma y por ende provoca la muerte del microorganismo, y finalmente la inmunomoduladora, la cual juega un papel importante en la modulación de la respuesta inmunológica.

La actividad biológica está relacionada con la composición y secuencia de los aminoácidos que los conforman (Alvarado y Guerra, 2010). Las secuencias de aminoácidos que contienen los péptidos dependen del proceso de hidrólisis utilizado. En el caso de los procesos enzimáticos, depende de la selectividad de la enzima para llevar a cabo el corte de los enlaces en la proteína.

1.4.2 Péptidos con capacidad antioxidante

Las especies reactivas de oxígeno se generan constantemente en los seres vivos como resultado de las reacciones metabólicas, pudiendo dañar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, este daño ha sido relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades y con el proceso de envejecimiento (Vioque *et al.*, 2006). En el caso de los alimentos, la peroxidación lipídica puede generar radicales libres que pueden conducir a la descomposición de ácidos grasos, lo que puede reducir el valor

nutricional y la inocuidad de los alimentos al producir sabores y sustancias tóxicas indeseables (Niki *et al.*, 2005).

Una alternativa para reducir la oxidación la constituyen los antioxidantes sintéticos, sin embargo, el uso de estos compuestos ha sido altamente cuestionado, debido a los riesgos que representan para la salud (Saiga *et al.*, 2003), por lo que actualmente se ha enfatizado el uso de productos naturales como fuente de antioxidantes.

La vitamina A, C, E, licopeno, betacaroteno y algunos minerales, son fuentes de antioxidantes naturales que pueden ser consumidos a través de alimentos que los contienen. La vitamina A, se encuentra en cantidades importantes en muchos vegetales de consumo cotidiano, generalmente en forma de betacarotenos, como es el caso de las zanahorias, albaricoques, espinacas, melón, etc. También se puede extraer de huevos, productos lácteos e hígados de peces y animales. Los alimentos con una mayor riqueza en vitamina C, son las frutas (cítricos, guayaba, kiwis) y las hortalizas (pimientos, perejil, coles, cebolla), para el caso de la vitamina E, se encuentra en almendras, avellanas, coco, aceite de oliva, cacahuates, nueces, entre otras, el licopeno se encuentra abundantemente en el jitomate y sandía y es el responsable de impartir el color rojo a estos frutos. Los minerales son otros potentes antioxidantes, entre ellos se encuentra el cobre, manganeso, selenio, zinc y hierro, ejerciendo su función antioxidante en diversos procesos y pasos metabólicos en el organismo (Vilaplana, 2007).

Por otro lado, el uso de proteínas de suero lácteo, para la obtención de péptidos bioactivos como antioxidantes naturales han atraído mucho interés debido a que son considerados una fuente segura y con amplias propiedades de distribución para su uso como antioxidantes naturales a diferencia de los antioxidantes sintéticos que se usan bajo estrictas regulaciones debido a sus efectos tóxicos (Zhang *et al.*, 2009).

Los péptidos antioxidantes generalmente consisten en 5-11 aminoácidos, incluyendo aminoácidos hidrófobos, prolina, histidina, tirosina y/o triptófano (Zhou

et al., 2012). La actividad antioxidante de los péptidos generados por hidrólisis *in vitro* de proteínas está relacionada con un mayor número de grupos ionizables y también con la exposición de grupos hidrofóbicos (Sarmadi & Ismail, 2010). La relación de la estructura/actividad de los antioxidantes que contienen histidina puede ser atribuida a la habilidad de donación del hidrógeno, al atrapamiento del radical peroxil de lípidos, y/o a la habilidad de quelación metálica del grupo imidazol (Chan *et al.*, 1994).

1.5 Encapsulamiento de fracciones peptídicas

Para el caso de fracciones peptídicas con actividad biológica, estas pueden obtener *in vitro* una alta actividad biológica; sin embargo, de forma *in vivo* es diferente, ya que la efectividad biológica de éstas depende de su capacidad para llegar intactas a su objetivo al paso por el organismo. Además de esto, las fracciones peptídicas son inestables, de vida corta y fácilmente degradables por las enzimas en su paso por el organismo antes de cumplir su función (Madureira *et al.*, 2010).

Cuando una sustancia es administrada por vía oral, debe atravesar la pared intestinal y después circular hasta el hígado, en estos dos sitios, se produce el metabolismo del primer paso (inactivación que puede ocurrir antes de que la fracción peptídica alcance la circulación sistémica). Este problema se presenta en la mayoría de las sustancias activas de origen natural, y es identificado como baja biodisponibilidad oral. Otra causa importante de baja biodisponibilidad es no contar con el tiempo suficiente en el tracto digestivo como para que se produzca la absorción adecuada. Si la sustancia no se disuelve con facilidad o es incapaz de atravesar la membrana epitelial (por ejemplo, si está altamente ionizado y es polar), el tiempo de permanencia en los lugares de absorción puede ser insuficiente. En estos casos, además de ser baja, la biodisponibilidad suele ser muy variable. Para superar la baja biodisponibilidad de las sustancias activas se ha sugerido el uso de sistemas de encapsulación a fin de proteger dichas fracciones del ataque enzimático del organismo (Muro *et al.*, 2014).

La encapsulación consiste en atrapar o envolver la sustancia de interés en una matriz o membrana, la cual debe ser de un material y tamaño adecuado para cumplir su objetivo. Esta alternativa ha sido aplicada para la encapsulación de preparados farmacéuticos de origen natural, entre los que se encuentran la insulina, licopeno, carotenoides y flavonoides; así como fármacos de origen sintético, donde para resguardar su estabilidad, ha sido necesario su encapsulamiento. Sin embargo, además de la protección que deben brindar los sistemas de encapsulamiento en ambientes adversos, estos también deben ser biodegradables, compatibles con el organismo, y ser capaces de liberar la sustancia de interés de forma controlada en sitios específicos. Razones por lo cual pocos sistemas han cumplido con ese objetivo, y la investigación continua en auge.

En el caso del encapsulamiento de compuestos bioactivos como fracciones peptídicas de suero lácteo, la investigación es escasa, ya que de la gran variedad de técnicas que se han desarrollado, solo algunas se ajustan a las características de las sustancias proteicas, esto debido a la fragilidad de estas moléculas frente a condiciones experimentales. Algunas de las investigaciones enfocadas en esta problemática son las desarrolladas por (Mohan *et al.*, 2016), quienes estudiaron la influencia del peso molecular de péptidos bioactivos de suero de leche, en su encapsulación dentro de nanoliposomas derivados de la lecitina de soja.

Rao *et al.* (2016) encapsularon hidrolizados de caseína enriquecidos con péptidos antioxidantes (AO-CH) utilizando materiales compuestos como maltodextrina-goma arábica (MD/GA) para superar los problemas relacionados con su aplicación directa, obteniendo una eficiencia de encapsulación (EE) de 87%, reduciendo el amargor del producto y obteniendo una máxima retención de la actividad antioxidante de 93%, lo que junto con el estrecho rango de tamaño de partícula obtenido, mejoró la estabilidad de los encapsulados consiguiendo un aditivo alimentario prometedor para su incorporación en los alimentos funcionales.

Ma *et al.* (2014), obtuvieron un hidrolizado concentrado de proteína de suero microencapsulado (WPCH) con el objetivo de reducir su sabor amargo y resistencia a la higroscopicidad sin alterar su actividad inmunorreguladora mediante la técnica

de secado por aspersión. Los resultados revelaron que el WPCH exhibió significativamente mayor actividad de proliferación de esplenocitos (relacionada con el aumento en la actividad inmunomoduladora) que el propio concentrado de proteína de suero (WPC) nativo, mostrando que el método de encapsulamiento no tuvo un efecto negativo sobre la actividad inmunomoduladora de WPCH. Por lo que se puede afirmar que el WPCH, posee un gran potencial para ser utilizado como ingrediente en los sistemas alimentarios.

Debido a las limitaciones que conlleva el encapsulamiento de fracciones peptídicas, se trabaja en la búsqueda de nuevos sistemas de administración, que permitan aprovechar el potencial terapéutico de las proteínas con el mínimo de inconvenientes posible.

Entre las propiedades que se buscan mejorar a través de la inmovilización, se encuentran: aumentar el tiempo de vida de las fracciones peptídicas en el organismo, proporcionar una mayor estabilidad térmica y frente a la acción de las proteasas y una disminución de la dosis total requerida para un tratamiento debido a una mayor eficiencia en el aprovechamiento de la dosis administrada.

1.5.1 Sistemas y técnicas de encapsulamiento

Las técnicas de encapsulamiento han sido utilizadas para la protección de una gran variedad de ingredientes en la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética. Estas técnicas se dividen en químicas y mecánicas y su clasificación se puede ver esquematizada en la Figura 1.3.

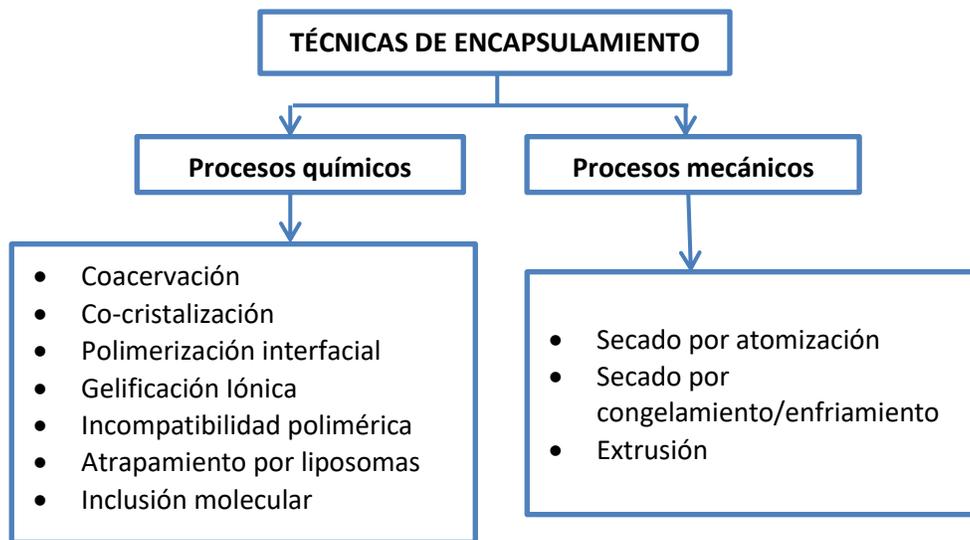


Figura 1.3. Técnicas de encapsulamiento (Parra, 2010)

De la gran variedad de técnicas de encapsulamiento que se han ido desarrollando, sólo algunas han sido aplicadas a la obtención de microesferas cargadas con sustancias de naturaleza proteica; debido a la fragilidad de estas moléculas frente a las condiciones experimentales de los procesos de encapsulamiento. Entre ellas se encuentran la de coacervación simple, el secado por aspersion, la polimerización interfacial, la evaporación del disolvente a partir de una doble emulsión y el atrapamiento por liposomas (Saez, 2012). Debido a estas limitaciones, se trabaja en la búsqueda de nuevos sistemas de administración, que permitan aprovechar el potencial terapéutico de las proteínas con el mínimo de inconvenientes posible.

De acuerdo con lo anterior, los sistemas que se han aplicado con mayor éxito en péptidos y proteínas son: los que se basan en la encapsulación de las moléculas en sistemas lipídicos (liposomas) o poliméricos (microesferas). En la Tabla 1.2, se muestra un resumen de las ventajas y desventajas de estos sistemas de liberación controlada.

Tabla 1.2. Ventajas y desventajas de los sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas (Saez *et al.*, 2007)

Sistema	Ventajas	Desventajas
Liposomas	Mejora la farmacocinética del producto Disminuye la toxicidad del fármaco Permite el direccionamiento pasivo de fármaco	Debilitamiento vascular Dificultad para producir una estabilidad fisicoquímica de larga duración
Microesferas	Mantienen niveles séricos del fármaco por largos periodos Poca fluctuación en la concentración del fármaco	Perfil de liberación incompleto Inestabilidad de las proteínas frente a la microencapsulación.

Los liposomas son vehículos coloidales formados por una bicapa de fosfolípidos, que encierran un interior acuoso (Figura 1.4a). Las estructuras únicas de los liposomas les brindan propiedades interesantes ya que son capaces de incorporar a su estructura moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas y también las de carácter anfifílico. Además, algunas de sus propiedades físicas como carga superficial, tamaño, permeabilidad y rigidez de la pared, o su capacidad de carga son fácilmente modulables debido a la variedad de fosfolípidos que tienen (Ruano, 2013). En los tejidos, alteran la distribución de los fármacos encapsulados: aumentan su eficacia y disminuyen su toxicidad.

Los liposomas también se pueden usar en el direccionamiento pasivo de los fármacos hacia los tejidos enfermos, en enfermedades asociadas con el incremento de la permeabilidad capilar (cáncer, infección, inflamación), los liposomas se concentran más en las zonas afectadas que en los tejidos sanos, pues los capilares sanos no dejan entrar a los liposomas (Saez *et al.*, 2007).

Por otro lado, en el caso del uso de microesferas de polímeros biocompatibles como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas, generalmente, el fármaco está distribuido en la matriz polimérica (Figura 1.4b) y es liberado por dos mecanismos fundamentales: la difusión a través de la matriz, y por la degradación del polímero, que lleva a la erosión de las partículas. Para ello se han empleado

polímeros naturales y sintéticos; entre estos últimos se destacan los copolímeros del ácido láctico y del ácido glicólico (Saez *et al.*, 2007).

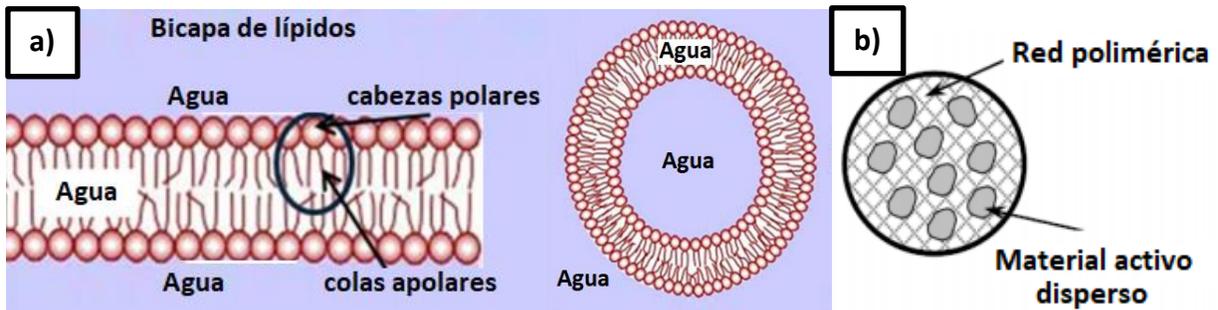


Figura 1.4. Sistemas de encapsulamiento a) Liposoma, b) Microesfera (Adaptado de Ruano, 2013; Matté & Rosa, 2013)

1.5.2 Materiales empleados en la encapsulación

Independientemente de la técnica de encapsulamiento elegida, el primer paso en la encapsulación será la selección del material adecuado. La variedad de materiales que pueden emplearse para la encapsulación se ha ampliado gradualmente en la medida en que surgen nuevos biomateriales y se perfilan nuevas aplicaciones de esta técnica. Muchas sustancias se emplean para recubrir o encapsular sólidos, líquidos o gases, de diferentes tipos y propiedades (Tabla 1.3). Sin embargo, las regulaciones sobre aditivos de alimentos son más rígidas que para productos farmacéuticos. Los materiales utilizados para el diseño de las cápsulas deben ser grado alimenticio, biodegradables y capaces de formar una barrera entre la fase interna y su alrededor (Nedovic *et al.*, 2011). De modo general, los materiales capaces de constituirse en micropartículas se clasifican en tres categorías: grasas o lípidos, proteínas y polímeros.

Algunas de las grasas utilizadas en el encapsulamiento son: la cera de carnauba, el alcohol estearílico y el ácido esteárico las cuales se funden a una determinada temperatura y son erosionables por la acción de las lipasas que existen en la cavidad gástrica.

La gelatina fue el primer material proteico utilizado en la microencapsulación, y es, en la actualidad, un material con un importante potencial. La albúmina y el colágeno también se han empleado en la obtención de micropartículas.

Algunas de las investigaciones que se han centrado en el uso de materiales proteicos, como materiales de encapsulación, se nombran a continuación.

Picot & Lacroix (2004); Reid *et al.* (2005); Livney (2010); Weibreck *et al.* (2010), mencionan que las proteínas de la leche ofrecen propiedades funcionales para usarse como recubrimiento en procesos de encapsulación tales como: alta solubilidad, baja viscosidad en solución, buenas propiedades de emulsión y formación de películas, por lo que se han sido utilizadas como vehículos para células probióticas. Ariyaratna & Karunaratne (2015) reportan el uso de proteínas aisladas de garbanzo para la encapsulación de vitamina B9 en preparaciones alimenticias, obteniendo una eficiencia de encapsulación de $62.19 \pm 2.05\%$ y una mayor estabilidad en el suministro de nutrientes en relación con la vitamina B9 no encapsulada.

Como puede observarse, el uso de proteínas como agente encapsulante cada vez es más explorado, ya que no representan ningún peligro para el organismo que los consume, adicionalmente, son biodegradables y pueden liberar el incipiente activo con facilidad (Parra, 2010).

Debido a su gran versatilidad, la familia de los polímeros es la más utilizada en la microencapsulación de sustancias. Dentro de ella están los polímeros naturales, los semisintéticos y los sintéticos. Los polímeros naturales principalmente son de naturaleza polisacárida, de origen animal y vegetal; de los cuales se destacan el alginato, la goma arábiga y el quitosano. Los polímeros sintéticos más utilizados son los derivados acrílicos y los poliésteres y los polímeros semisintéticos engloban los derivados de la celulosa, de los cuales existe una amplia variedad en el mercado con diferentes características de solubilidad.

De acuerdo con la aplicación del producto que va a ser encapsulado, se selecciona el material adecuado. Sin embargo, es imprescindible que sea soluble en el

disolvente de elección; estable en las condiciones ambientales, e inerte frente a los demás compuestos que estén en contacto con él, además si se destinan al diseño de medicamentos, deben carecer de toxicidad y de actividad farmacológica (Saez *et al.*, 2007). En la Tabla 1.3 se muestran algunos de los materiales más empleados en la encapsulación.

Tabla 1.3 Materiales empleados en la encapsulación (Desai & Park, 2005)

Tipo de cobertura	Cobertura específica
Gomas	Agar, alginato de sodio, carragenina, goma arábica.
Carbohidratos	Almidón, dextranos, sacarosa, jarabes de maíz.
Celulosas	Etilcelulosa, metilcelulosa, acetilcelulosa, nitrocelulosa, carboximetil-celulosa.
Lípidos	Ceras, parafinas, diglicéridos, monoglicéridos, aceites, grasas, ácido esteárico, trisetearina.
Proteínas	Gluten, caseína, albúmina
Materiales inorgánicos	Sulfato de calcio, silicatos.

1.5.3 Aplicaciones de la microencapsulación

Las aplicaciones de la microencapsulación se han ampliado, entre las cuales se encuentran: enmascarar propiedades organolépticas indeseables que pueden presentar algunas sustancias (olor, color, sabor desagradable), aislar algún componente de una formulación sensible a las condiciones ambientales, revestir partículas que por su forma irregular son difíciles de comprimir, convertir principios activos líquidos en sólidos facilitando así su manipulación y, sobre todo, en el diseño de formulaciones de liberación controlada de fármacos con diferentes fines. Específicamente en el campo de la liberación modificada de biomoléculas la

microencapsulación se emplea con el objetivo de alcanzar una o varias de las siguientes ventajas (Freiberg & Zhu, 2004; Li & Poncelet, 2008):

- ❖ Disminución de la frecuencia de administración, lo que conlleva a una mayor aceptación por parte del paciente.
- ❖ Aumento del beneficio terapéutico debido a la eliminación de las fluctuaciones en los niveles séricos de la proteína.
- ❖ Disminución de la dosis total requerida para un tratamiento debido a una mayor eficiencia en el aprovechamiento de la dosis administrada.
- ❖ Disminución de los efectos adversos ya que disminuye la magnitud de la cantidad de proteína liberada en el organismo al momento de la aplicación.

2 MÉTODO

Las actividades que conforman la presente investigación se muestran en el diagrama de la Figura 2.1.

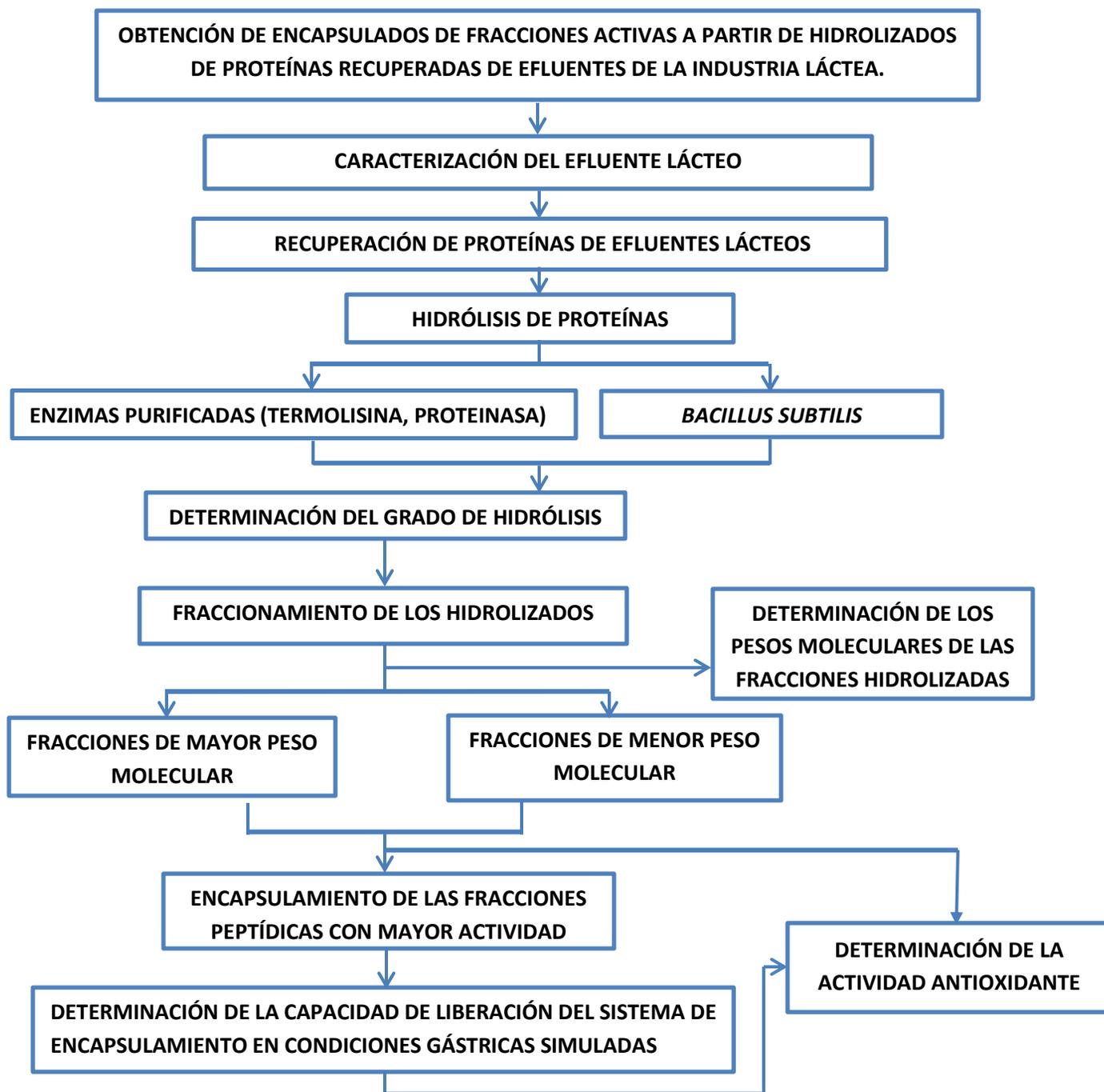


Figura 2.1. Etapas de la metodología de investigación

2.1. Caracterización del efluente lácteo

El efluente industrial utilizado para este trabajo fue proporcionado en un solo lote de una muestra de 5 L, por una empresa de elaboración de quesos artesanales, compuesto principalmente por suero de queso. La muestra fue dividida en recipientes de medio litro y almacenada a 4 °C para su uso posterior. Los parámetros determinados para su caracterización fueron: pH, acidez, calcio, proteínas, sólidos totales y cenizas. Estos parámetros se evaluaron según los siguientes métodos.

1. Determinación de pH. Se siguió el procedimiento descrito por la norma mexicana NMX-F-317-S-19, el cual menciona que se debe mezclar cuidadosamente la muestra hasta su homogeneización, posteriormente se ajustó la temperatura a 20 ± 0.5 °C, se hizo la medición del pH y se registraron los datos obtenidos, para ello se utilizó un potenciómetro marca HANNA HI 9126.

2. Determinación de la acidez. Se siguió el procedimiento descrito por la norma mexicana NMX-F-420-1982; se midieron 20 mL de muestra en un matraz Erlenmeyer y se diluyeron agregando dos veces su volumen con agua libre de CO₂. Posteriormente se añadieron unas gotas de solución de fenolftaleína y se tituló con hidróxido de sodio 0.1 N hasta la aparición de un color rosado persistente de 15 a 30 segundos (Figura 2.2). Una vez terminada la titulación se anotó el gasto de mL utilizados y se determinó la acidez en las muestras (expresada en g/L de ácido láctico) usando la ecuación 2.1.

$$A = \frac{V(N)(90)}{M} \quad (2.1)$$

A= Acidez (g/L de ácido láctico)

V= Volumen de solución de Hidróxido de Sodio 0.1 N gastado en la titulación de la muestra (mL).

N = Normalidad de la solución de hidróxido de sodio (eq g/L)

M= Volumen de la muestra (mL)

90 = Equivalente del ácido láctico (un cm^3 de NaOH 0.1 N es igual a 0.0090 g de ácido láctico).



Figura 2.2 Determinación de acidez en el efluente lácteo

3. Determinación de azúcares reductores. Para esta prueba se prepararon dos soluciones de Fehling (Fehling I y Fehling II). El procedimiento se describe a continuación. Para Fehling I, se pesaron 6.928 g de Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y se colocaron en un matraz volumétrico aforando con agua destilada a 100 mL. Para Fehling II, se pesaron 34.6 g de cristales de Tartrato de sodio potásico ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y 5 g de hidróxido de sodio (NaOH) y se colocaron en un matraz, aforando con agua destilada a 100 mL.

Para la determinación de la titulación con el reactivo de Fehling se preparó una solución de glucosa al 2%, para ello se pesó 0.5 g de glucosa la cual se colocó en un matraz volumétrico y se aforó con agua destilada hasta 250 mL. Posteriormente se montó el equipo de titulación y se colocó en la bureta la solución de glucosa al 2%.

En un matraz Erlenmeyer se colocaron 5 mL de la solución de Fehling I y 5 mL de la solución de Fehling II, se adicionaron 50 mL de agua destilada y 4 gotas de azul de metileno como reactivo indicador; posteriormente, la solución fue calentada hasta ebullición con agitación constante (la ebullición se mantuvo mientras se adicionó la solución de glucosa al 2%). El final de la titulación deberá alcanzarse en

no más de un minuto. El punto de vire está marcado por el cambio de color del azul cada vez más intenso, hasta el rojo brillante impartido al líquido en ebullición por el óxido cuproso en suspensión (Figura 2.3). El tiempo total de ebullición se limitó a tres minutos.

Por último, se repitió el proceso en el cual se sustituyó la solución de glucosa al 2% por el efluente y se anotó el gasto volumétrico en mL para ambos casos como datos para el cálculo de azúcares reductores para lo cual se utilizó la ecuación 2.2.

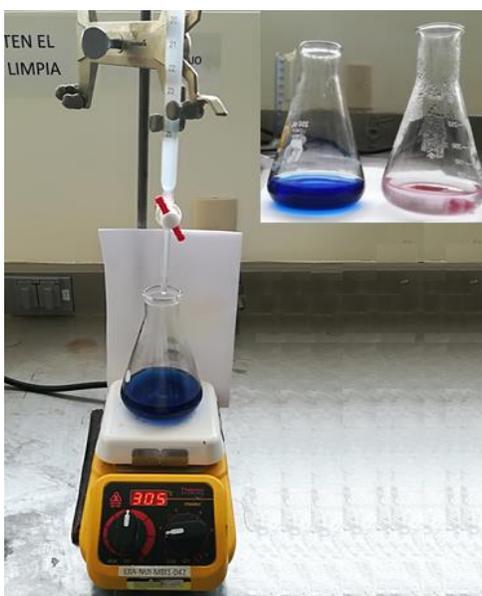


Figura 2.3 Determinación de azúcares reductores

$$R = \frac{2G'}{G} F \quad (2.2)$$

R = cantidad de azúcares reductores (g/L)

G' = Gasto de glucosa (2%) necesario para decolorar la solución de Fehling (mL)

G = Gasto de efluente lácteo necesario para decolorar la solución de Fehling (mL)

F = Factor de dilución

4. Determinación de Calcio. Para esta prueba se realizó el siguiente procedimiento. Se colocaron 50 mL del efluente lácteo en un matraz Erlenmeyer, se agregó cuidadosamente NaOH 1 N hasta ajustar el pH entre 12 y 13. Posteriormente se

adicionaron 0.01 g de murexida como reactivo indicador y se tituló con solución EDTA 0.01 N agitando continuamente hasta un vire de color de rosa a violeta como se muestra en la Figura 2.4, el dato obtenido del gasto de EDTA se utilizó en la ecuación 2.3 para calcular la cantidad de calcio presente.



Figura 2.4 Etapa final en la determinación de calcio

$$C = \frac{(A-B)(N)(40000)}{V} \quad (2.3)$$

C= mg/L de Ca⁺²

A= Volumen de EDTA gastado en la muestra (mL)

B= Volumen de EDTA gastado en el blanco (mL)

N= Normalidad del EDTA (eq g/L)

V= Volumen del efluente lácteo (mL)

Peso Molecular del Ca = 40.078

5. Determinación de sólidos totales. La prueba se realizó bajo la norma mexicana NMX-F-426-1982. La cual menciona que se deben pesar tres cápsulas de porcelana en una báscula analítica, se transfieren a una estufa durante 30 min y posteriormente al desecador por 15 min. Este procedimiento se repite hasta mantener las cápsulas de porcelana a masa constante. Posteriormente se midieron 2 mL de efluente lácteo y se colocaron en cada una de las cápsulas colocándoles encima una cama de gasa. La cápsula fue puesta en un baño de agua en ebullición hasta la sequedad, una vez hecho esto se transfirió la cápsula con el contenido a

una estufa de secado durante 3 h a 100 °C. Una vez fría, se determinó la masa del residuo por diferencia de peso utilizando la ecuación 2.4. El resultado final de la determinación de sólidos totales se puede observar en la Figura 2.5.

$$S = \frac{P_2 - P_1}{M} (1000) \quad (2.4)$$

S = Sólidos Totales (g/L)

P₂ = Masa de la cápsula con residuo seco (g)

P₁ = Masa de la cápsula con la cama de gasa. (g)

M = Volumen de la muestra (mL)



Figura 2. 5. Sólidos totales del efluente lácteo

6. Determinación de cenizas. Se hizo utilizando la norma mexicana NMX-F-066-S-1978. Los sólidos totales obtenidos en la etapa anterior se calcinaron en una mufla a 550 °C durante 3 h. Para efectuar el cálculo de la cantidad de cenizas expresado en porcentaje, se utilizó la ecuación 2.5. La Figura 2.6 muestra las cenizas del resultado final de esta prueba.



Figura 2.6. Cenizas de lactosuero

$$C = \frac{P-p}{M}(100) \quad (2.5)$$

C = Cenizas (%)

P = Masa de la cápsula con cenizas (g)

p = Masa de la cápsula vacía (g)

M = Masa de la muestra (g)

7. Determinación de proteínas. Para este trabajo se utilizó el método de Biuret, como una reacción basada en la formación de un compuesto de color violeta, debido a la formación de un complejo entre los iones Cu^{2+} y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos, presentando un máximo de absorción a 540 nm.

Para la determinación de las proteínas del lactosuero, se realizó una curva de calibración, utilizando soluciones de albúmina de diferente concentración obtenidas a partir de una solución patrón de Albúmina de Suero Bovino (BSA) de concentración de 1 mg/mL. Se prepararon 11 tubos con solución de BSA y agua destilada como se muestra en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Volúmenes de la solución patrón de albúmina método de Biuret

No. de tubo	Albúmina patrón (mL)	Agua (mL)	Volumen total (mL)
1	0	2.0	2.0
2	0.1	1.9	2.0
3	0.2	1.8	2.0
4	0.3	1.7	2.0
5	0.4	1.6	2.0
6	0.5	1.5	2.0
7	0.6	1.4	2.0
8	0.7	1.3	2.0
9	0.8	1.2	2.0
10	0.9	1.1	2.0
11	1.0	1.0	2.0

A cada uno de los tubos de ensayo se le añadieron 2 mL del reactivo de Biuret, se les colocó su tapa y se rotularon adecuadamente, se introdujeron en un baño de agua a 37 °C, dejando que se desarrolle el cambio de coloración de azul a violeta o rosa, durante 15 min. Se enfriaron los tubos en agua a temperatura ambiente y se procedió a medir en el espectrofotómetro marca Perkin Elmer modelo Lambda 35 UV-Vis a una longitud de onda de 540 nm.

La curva patrón se utilizó para determinar la concentración de proteínas en las muestras. En la Figura 2.7, se muestra la prueba de Biuret realizada al suero lácteo.

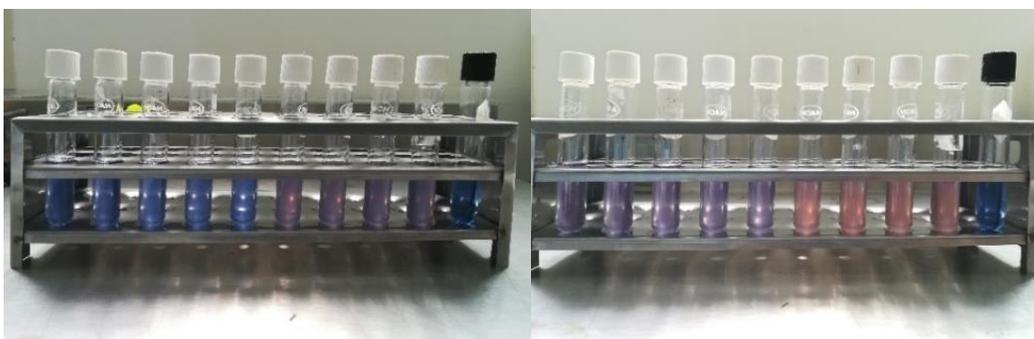


Figura 2.7 Determinación de proteínas con reactivo de Biuret

2.2. Recuperación de proteínas del efluente lácteo por ultrafiltración

La recuperación de las proteínas del efluente se realizó mediante una membrana de ultrafiltración. Previo al uso de este proceso, se eliminó la grasa y los sólidos suspendidos de la muestra, por filtración al vacío, utilizando papel filtro y tierra de diatomácea como adsorbente (Figura 2.8). Este pretratamiento se hizo para evitar la obstrucción de los poros de la membrana, y con esto evitar una disminución en la eficiencia del proceso.



Figura 2.8. Filtración del efluente

Para llevar a cabo la UF se utilizó el equipo mostrado en la Figura 2.9, el cual está compuesto por una membrana polimérica con un umbral de corte de 6 KDa. Las condiciones de operación durante el proceso fueron, un gasto de alimentación controlado con velocidad de la bomba de 40 rpm con una presión transmembrana (PTM) de 7.5 psi y un volumen inicial de la muestra de 500 mL.

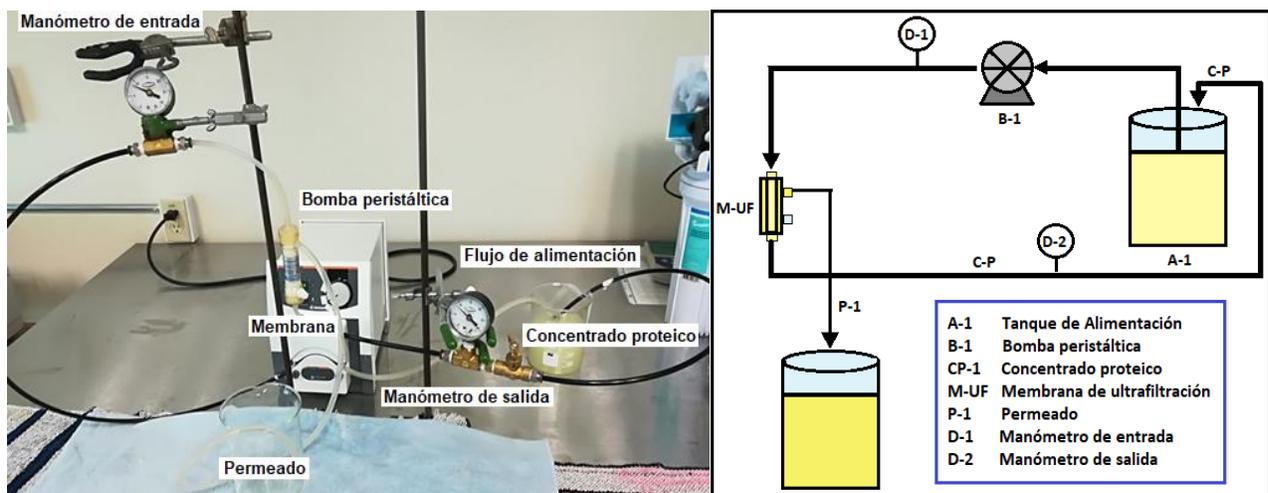


Figura 2.9 Proceso de Ultrafiltración

2.2.1 Caracterización del concentrado proteico

El concentrado de proteínas obtenido del proceso de ultrafiltración fue caracterizado según los procedimientos descritos para el suero lácteo en el apartado 2.1.

2.2.2 Determinación del rendimiento de la UF en el concentrado de proteínas

Se determinó el rendimiento (Y) expresado en porcentaje de cada uno de los parámetros que representan la caracterización del concentrado de proteínas del lactosuero utilizando la ecuación 2.6.

$$Y = \frac{V_2 C_2}{V_1 C_1} (100) \quad (2.6)$$

Y = Rendimiento de los concentrados

C₂= Concentración final del parámetro en el concentrado.

C₁= Concentración inicial del parámetro en el suero.

V₁= Volumen del suero inicial en la UF (mL).

V₂ = Volumen final en la UF (mL).

2.3 Hidrólisis de proteínas de suero lácteo utilizando *Bacillus subtilis*, Termolisina y Proteinasa

En este apartado se describen las condiciones de temperatura, pH y relación enzima-sustrato, en las que fue llevado a cabo el proceso de hidrólisis.

2.3.1 Proceso de hidrólisis usando biomasa de *B. subtilis*

Para llevar a cabo el proceso de hidrólisis mediante *Bacillus subtilis*, previamente se realizó la propagación de la cepa y se preparó biomasa en suspensión a fin de lograr su homogenización en medio líquido. Para la propagación del *B. subtilis*, se sembró el microorganismo en una caja Petri en medio de cultivo sólido de tripticaseína de soya, para ello se utilizó el método de siembra por estría en placa. El *B. subtilis* fue incubado a 37 ° C durante 24 h. En la Figura 2.10 se muestra el *B. subtilis* en una caja Petri.



Figura 2.10. *Bacillus subtilis* en medio tripticaseína de soya

Para la preparación de biomasa en suspensión de *Bacillus subtilis*, se tomó una caja Petri con biomasa joven de la bacteria, y se cortó en cuadros de aproximadamente 1 cm², para posteriormente ser colocados en un matraz de capacidad de 250 mL, al cual se le agregaron 100 mL de suero lácteo previamente filtrado. La mezcla se colocó en un agitador Heidolph inkubator 1000 bajo condiciones estériles a 37 °C y 100 rpm por un periodo de 24 h. Una vez que finalizó la agitación, la suspensión bacteriana se mantuvo en refrigeración, para su uso posterior, repitiéndose este proceso cada mes, esto con la finalidad de tener un cultivo joven. En la Figura 2.11, se muestra la imagen de la suspensión bacteriana elaborada.

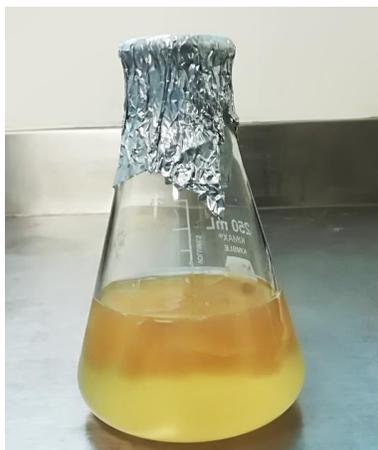


Figura 2.11. Biomasa suspendida de *Bacillus subtilis* en suero lácteo

Para llevar a cabo el proceso de hidrólisis usando biomasa libre de *Bacillus subtilis*, se tomaron muestras de 100 mL de concentrado de proteínas y se sometieron a 24 h de hidrólisis. Por cada 100 mL de concentrado se utilizaron 10 mL de biomasa de *B. subtilis*.

En la hidrólisis con *B. subtilis*, se utilizó una temperatura de 50 °C y un pH de 7. Durante el periodo de hidrólisis se tomaron muestras a un tiempo de 2, 4, 6, 8 y 24 h. Al finalizar el tiempo establecido, la enzima y el microorganismo fueron inactivados por calentamiento a 85 °C durante 15 min, posteriormente cada muestra se centrifugó durante 15 min a 5000 rpm y se mantuvo en refrigeración a -20 °C hasta su uso posterior.

2.3.2 Proceso de hidrólisis usando Termolisina y Proteinasa

Las enzimas utilizadas para la hidrólisis del concentrado de proteínas de suero fueron enzimas comerciales purificadas; la Termolisina proviene de *Geobacillus stearothermophilus* y la Proteinasa K, de *Tritirachium*, para lo cual se utilizó una relación de enzima sustrato (E/S) de 0.003% (p/V) en cada caso.

Para llevar a cabo la hidrólisis se tomaron muestras de 100 mL de concentrado de proteínas y se sometieron a 24 h de hidrólisis (Figura 2.12). Por cada 100 mL de concentrado se utilizaron 0.30 mg de enzima pura.

Cada enzima se utilizó bajo las condiciones óptimas de actividad, señaladas por el fabricante. Para el caso de la termolisina se utilizó una temperatura de 70 °C y un pH de 8, y para la proteinasa, una temperatura de 37 °C y un pH de 8. Durante el periodo de hidrólisis se tomaron muestras a un tiempo de 2, 4, 6, 8 y 24 h. Al finalizar el tiempo establecido, la enzima fue inactivada por calentamiento a 85 °C durante 15 min, posteriormente cada muestra se centrifugó durante 15 min a 5000 rpm y se mantuvo en refrigeración a -20 °C hasta su uso posterior.



Figura 2.12. Hidrólisis del concentrado de proteínas

2.3.3 Determinación del grado de hidrólisis de los concentrados proteicos

Una vez concluido el tiempo de hidrólisis, se obtuvo el grado de hidrólisis, el cual se determinó mediante la cuantificación de proteínas presentes en el sobrenadante obtenido de cada muestra durante el período de dicha hidrólisis.

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Biuret, tomando como referente una curva patrón de solución de Albúmina de suero bovino (BSA) a concentración de 1 mg/mL. Con los datos registrados de concentración de proteínas se calculó el porcentaje del grado de hidrólisis utilizando la siguiente ecuación.

$$GH = \frac{C_o - C_f}{C_o} 100 \quad (2.7)$$

GH = Grado de Hidrólisis (%)

C_o = Concentración inicial de proteínas (g/L)

C_f = Concentración de proteínas en el sobrenadante (g/L)

2.4 Fraccionamiento de los hidrolizados

La separación y/o fraccionamiento de hidrolizados se llevó a cabo por Nanofiltración (NF), para ello se utilizó una membrana polimérica con un umbral de corte de 3 KDa y un volumen inicial de la muestra de 150 mL de hidrolizados previamente seleccionados, de acuerdo con el grado de hidrólisis obtenido. Durante la NF se recolectó el concentrado o retenido (fracciones > 3 KDa) y el filtrado o permeado (fracciones < 3KDa). Las condiciones de operación durante el proceso fueron: temperatura ambiente (22 a 23 °C), un gasto de alimentación controlado con velocidad de la bomba de 40 rpm y una presión transmembrana (PTM) de 7.5 psi

2.5 Determinación de los pesos moleculares de las fracciones hidrolizadas

Con el fin de identificar la masa molecular de las fracciones peptídicas de los hidrolizados, se utilizó el método de electroforesis (SDS-PAGE). Para ello se prepararon dos geles de poliacrilamida: un gel de separación, con una concentración de 10% de poliacrilamida y un gel de empaquetamiento, con concentración de 4% de poliacrilamida.

Para la preparación del gel de separación, se utilizaron los reactivos mostrados en la Tabla 2.2, para lo cual, se colocaron los primeros cuatro reactivos en un frasco y al momento de utilizarse el gel, se agregaron los dos reactivos faltantes, se puso en agitación suave, evitando la formación de burbujas y la mezcla se colocó en las placas de vidrio del equipo Thermo Scientific modelo P8DS. Se agregó una pequeña cantidad de agua sobre el gel para evitar la formación de burbujas y se dejó que la mezcla gelificara. Posteriormente, se retiró la capa de agua y se realizó la preparación del gel de empaquetamiento, formado por los reactivos descritos en la Tabla 2.2, donde, al igual que para el gel de separación, inicialmente solo se colocaron los primeros 4 reactivos y cuando el gel fue utilizado, se añadieron los 2 reactivos finales para acelerar la polimerización, inmediatamente después de colocar el gel de empaquetamiento en las placas, se colocaron los peines para la formación de los pocillos donde se colocaron las muestras y se dejó gelificar.

Tabla 2.2 Preparación de los geles de separación y empaquetamiento

Reactivo	Gel de separación al 10% (mL)	Gel de empaquetamiento al 4% (mL)
Agua desionizada	4	3
Poliacrilamida al 30%	3.33	0.65
Buffer Tris	2.5 (pH 8.8)	1.25 (pH 6.8)
SDS 10%	0.100	0.040
TEMED	0.010	0.010
Persulfato de amonio al 10%	0.050	0.050

Para la preparación de las muestras, se utilizó 40 μ L de muestra y 20 μ L de solución buffer 4x para proteínas, la cual fue preparada de acuerdo con la Tabla 2.3.

Tabla 2.3 Preparación de solución buffer de la muestra 4x para proteínas

Reactivo	Volumen (mL)
Buffer Tris 0.5 M, pH 6.8	2.5
SDS 10%	2.5
2-Mercaptoetanol	2.5
Glicerol	2.5
Azul de bromofenol	1 mg

Una vez preparadas las muestras, estas se coloraron en cada uno de los pocillos formados en el gel de empaquetamiento, tomando como referencia un marcador estándar de proteínas. Posteriormente se colocó el portaplacas de los geles de poliacrilamida en la cámara del equipo con solución buffer de electroforesis tris-glicina y se conectaron los electrodos a una fuente de poder, aplicando un voltaje de 100 V durante aproximadamente 3 h (Figura 2.13).

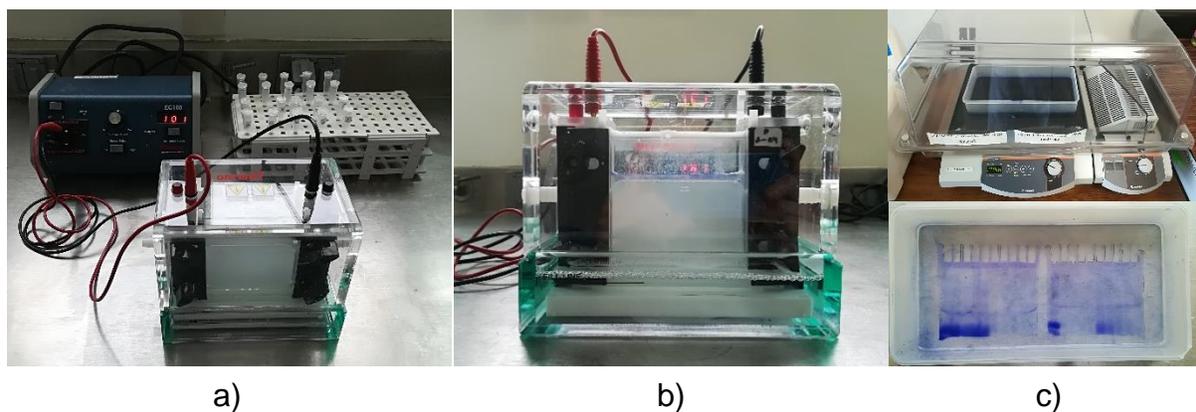


Figura 2.13. a) Equipo de electroforesis y muestras, b) migración de proteínas c) tinción y desteñido

Una vez terminada la corrida de las muestras, los geles se retiraron de las placas y se enjuagaron. Posteriormente se realizó la tinción y desteñido de éstos. Todo el proceso descrito anteriormente, se ve ilustrado en la Figura 2.13.

La preparación de las soluciones utilizadas para este proceso se realizó de acuerdo con la Tabla 2.4. Se adicionó 0.25 g de azul brillante de coomasie R250 en el caso de la solución de tinción.

Tabla 2.4 Preparación de los reactivos de tinción y desteñido

Reactivo	Solución de tinción (mL)	Solución de decoloración rápida (mL)	Solución de decoloración lenta (mL)
Ácido acético glacial	10	30	30
Agua destilada	45	120	255
Metanol	45	150	15
Total	100	300	300

La tinción de los geles se realizó, colocando en un recipiente los geles de poliacrilamida con solución de tinción en un volumen que permitió cubrir los geles. Se dejó bajo agitación ligera durante 2 h y una vez concluido el tiempo de tinción, se cubrió el gel teñido con solución de decoloración rápida y se dejó agitando por 30 min. Posteriormente, se eliminó la solución de decoloración rápida y se añadió un segundo volumen de ésta, hasta apreciar las primeras bandas. Finalmente, se eliminó la solución de decoloración rápida y se añadió solución decolorante lenta. Se dejó destiñendo a movimiento constante por lo menos 1 h, cambiando la solución por una nueva, hasta que las bandas de las proteínas fueron apreciadas.

Los pesos moleculares se estimaron a partir del uso de un marcador correspondiente al concentrado de proteína de suero, con bandas de proteínas de peso molecular conocido.

2.6 Determinación de la actividad antioxidante de las fracciones hidrolizadas

La actividad antioxidante, se determinó usando el método descrito por Xiao *et al.* (2014), para la eliminación de radicales ABTS (ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico), descrito a continuación.

Se preparó una solución de $ABTS^{\bullet+}$, por la reacción de una solución acuosa 7 mM de ABTS con una solución acuosa 2.45 mM de $K_2S_2O_8$, llevada a cabo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 h antes de su uso. La solución de $ABTS^{\bullet+}$, se diluyó con etanol absoluto hasta obtener una absorbancia de $1.6 (\pm 0.1)$ a 750 nm (longitud de onda de máxima absorción). Posteriormente, se hizo una curva de calibración del antioxidante de referencia (ácido ascórbico).

Para la lectura de las muestras, se mezclaron 120 μ L de muestra y se le añadieron 5880 μ L de solución etanólica de $ABTS^{\bullet+}$, colocándose en un baño a 37 °C durante 5 min; después del tiempo transcurrido se midió la absorbancia a 750 nm usando un espectrofotómetro. Como blanco se utilizó 120 μ L de etanol al 50% y 5880 μ L de la solución etanólica de $ABTS^{\bullet+}$.

La capacidad de eliminar el $ABTS^{\bullet+}$, se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de eliminación del cation radical ABTS (\%)} = \left[\frac{A_{control} - A_{muestra}}{A_{control}} \right] \times 100 \quad (2.9)$$

Dónde:

$A_{control}$: Absorbancia del blanco sin muestra o ácido ascórbico

$A_{muestra}$: Absorbancia en presencia de muestra o ácido ascórbico

Los resultados de actividad antioxidante se expresaron en VCEAC (actividad antioxidante equivalente a ácido ascórbico como mg de ácido ascórbico por litro de muestra (mg/L)).

2.7 Encapsulamiento de fracciones activas

Las fracciones con mayor actividad antioxidante se encapsularon en matrices compuestas de pectina-gelatina (PG) y pectina-colágeno (PC) usando una relación de (0.1-0.5% p/v). Las fracciones (15% v/v con respecto al volumen total) se dispersaron en las matrices compuestas; las muestras obtenidas se secaron a 40 °C y se pulverizaron, obteniéndose en cada caso, partículas sólidas cargadas de fracciones con actividad biológica. Las partículas fueron identificadas como PG-T (de la termolisina), PG-S (de *B. Subtilis*), PC-T (de la termolisina) y PC-S (de *B. Subtilis*). Estas partículas fueron caracterizadas por la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés, Scanning Electron Microscopy) y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés, Fourier-Transform Infrared spectroscopy). La técnica de SEM se utilizó con el fin de analizar la morfología y distribución de los materiales e identificar la existencia de péptidos en las partículas (PG-T, PG-S, PC-T Y PC-S), mientras que el objetivo de realizar un análisis FT-IR fue de analizar los cambios en la estructura química de los encapsulados con respecto a los materiales que la componen.

2.8 Determinación de la capacidad de liberación del sistema de encapsulamiento en condiciones gastrointestinales simuladas

Para determinar la capacidad de liberación del sistema de encapsulamiento, las partículas cargadas con fracciones activas fueron sometidas a una digestión gastrointestinal *in vitro* de acuerdo con el método descrito por Alting *et al.* (1997) con algunas modificaciones, el cual se describe a continuación. Las fracciones peptídicas (2 mL) de forma libre y encapsulada se incubaron con pepsina (0.06 mg/mL) en 10 mL de una solución acuosa de pH=2 ajustada con HCl 10 N a 37 °C y agitación constante de 200 rpm durante 2 h, al término de este tiempo se tomaron

2 alícuotas de 1 mL y fueron centrifugadas durante 15 min a 5000 rpm. El sobrenadante fue analizado por espectrofotometría para determinar su actividad antioxidante.

A la solución restante (10 mL) se le agregó 0.05 mg/mL de tripsina y se ajustó a un pH de 5 a 6 con NaHCO_3 0.1 M y subsiguiente a un pH de 7.5 con NaOH 1 N a 37 °C y se mantuvo durante 2 h en agitación suave (100 rpm).

Por último, la reacción se finalizó calentando las muestras durante 15 min a 85 °C en un baño de agua para inactivar la enzima y fueron centrifugadas durante 15 min a 5000 rpm. Al sobrenadante restante se le midió la actividad antioxidante con el método presentado en el apartado 2.6 en este documento.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterización del efluente lácteo

En la Figura 3.1, se presenta la imagen de una muestra del efluente analizado, el cual es un líquido amarillento, turbio y con olor agradable. Los resultados obtenidos de la caracterización de este líquido se muestran en la Tabla 3.1.



Figura 3.1. Efluente lácteo

Tabla 3.1 Resultados obtenidos en la caracterización del efluente lácteo

Parámetros	Efluente lácteo
pH	6.06
Acidez (g/L ácido láctico)	2.40
Calcio (g/L)	0.27
Azúcares reductores (g/L)	40.96
Sólidos totales (g/L)	125.30
Cenizas (%)	1.73
Proteínas (g/L)	11.67

Tabla 3.2 Resultados reportados por diferentes autores, acerca de las características de suero lácteo

Autor	Miranda (2009)		Abaigar (2009)		Tovar <i>et al.</i> (2012)	Callejas <i>et al.</i> (2012)	Romero (2014)		Paredes <i>et al.</i> (2014)	Alvarado (2017)
	SD	SA	SA	SA	SD	SA	SD	SA	SD	SD
Tipo de suero										
Parámetros										
pH	6.6	4.2	4.82	4.5	5-6.6	4.82	6.7	4.5	5.82-7.42	6.2
Acidez (g/L ácido láctico)	0.08	0.32	4.45	7-8		4.45	0	10.35	1.4-18	2.25
Calcio (g/L)	0.53	0.51		1.2-1.4	0.64		0.25	0.28	0.48-0.55	0.48
Azúcares reductores (g/L)					48.43		26	38.9		23.33
Sólidos totales (g/L)			71.7	55-65		71.7	51	86		62.7
Cenizas (%)			6.7	6-8	15.12	6.7	4	7.5	0.5-0.52	8.29
Proteínas (g/L)	9.6	9.4	2.1	7-12	12.13	2.1	3.7	3.3	6-10	10.18

SD Suero dulce. SA suero ácido

Analizando los resultados obtenidos, en la Tabla 3.1 se observa que los valores obtenidos para el efluente son similares a los reportados para suero lácteo (Tabla 3.2), lo que puede sugerir que el efluente analizado está compuesto en su mayoría por este componente, además el contenido de proteínas obtenido (11.67) que es de gran interés, se encuentra en el rango de los datos publicados por Tovar *et al.* (2012), Paredes *et al.* (2014) y Alvarado (2017).

En cuanto a los demás parámetros analizados, el valor de pH obtenido es ligeramente mayor a 6, por lo que el efluente se considera dentro de la clasificación de un suero dulce y será analizado en base a ese criterio, el contenido de calcio obtenido (0.27) se encuentra dentro del rango reportado en la literatura (0.25-0.64), acercándose a los valores reportados por Romero (2014), el contenido de azúcares reductores (40.96) también se encuentran dentro de los rangos reportados (23.33-48.43) al igual que los valores de cenizas (1.73) los cuales se encuentran cerca del límite inferior (0.5-15.12) de los reportados por Paredes *et al.* (2014), por el contrario el valor de sólidos totales (125.3) se encuentran encima de los valores reportados (51-62.7), lo que se atribuye a una elevada cantidad de materia orgánica en la muestra, lo cual se ve reflejado en el parámetro de cenizas.

3.2 Recuperación de proteínas del efluente lácteo por ultrafiltración

Durante la separación del efluente lácteo, a través del proceso de ultrafiltración, se obtuvieron dos corrientes de salida: un concentrado proteico y un permeado (Figura 3.2). El concentrado es un líquido amarillo-verdoso turbio, el cual contiene en mayor proporción moléculas de elevado peso molecular tales como proteínas, mientras que el permeado es un líquido amarillo transparente, que contiene en su mayoría lactosa, agua y sales, este último no fue considerado en el estudio debido a que el compuesto de interés son las proteínas.

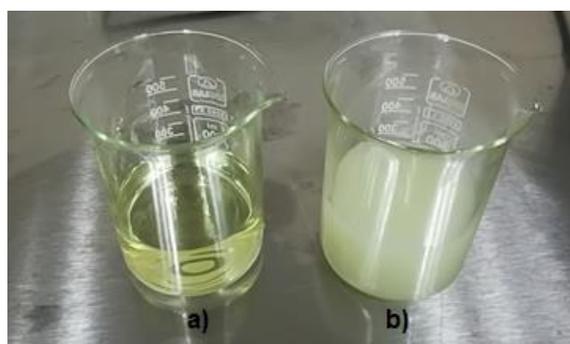


Figura 3.2. Fraccionamiento del efluente lácteo. a) permeado, b) concentrado

3.2.1 Caracterización del concentrado proteico

Los parámetros determinados en esta etapa se muestran en la Tabla 3.3., acompañados de los valores del efluente inicial.

Tabla 3.3. Resultados de la caracterización del concentrado de proteínas

Parámetros	Efluente lácteo	Concentrado proteico
pH	6.06	6.20
Acidez (g/L ácido láctico)	2.40	2.61
Calcio (g/L)	0.27	0.24
Azúcares reductores (g/L)	40.96	23.95
Sólidos totales (g/L)	125.30	60.35
Cenizas (%)	1.73	0.65
Proteínas (g/L)	11.67	14.03

Dentro de los parámetros analizados en el concentrado, el parámetro de mayor interés son las proteínas, las cuales, se ven incrementadas como resultado del proceso de ultrafiltración; lo que convierte al efluente analizado en una fuente viable para la recuperación de proteínas.

En cuanto a los demás parámetros, se observa que el valor de pH y acidez no cambiaron significativamente en el concentrado; este comportamiento según Baldasso *et al.* (2011) indica que la solución no fue degradada durante el tiempo de experimentación. También se muestra una disminución considerable (aproximadamente 50%) de los parámetros de azúcares reductores, sólidos totales y cenizas, lo cual se debe al proceso de ultrafiltración al que fue sometido el efluente, ya que estas membranas tienen alta permeabilidad para sales monovalentes (por ejemplo, NaCl, KCl) y compuestos orgánicos de bajo peso molecular, y muy baja permeabilidad para los compuestos orgánicos de peso molecular superior (Pan *et al.*, 2011).

Entre las investigaciones realizadas acerca de la concentración de proteínas, se encuentra el trabajo de Baldasso *et al.* (2011), quienes concentraron y purificaron proteínas de suero utilizando ultrafiltración (UF) en asociación con diafiltración discontinua (DF), los resultados que obtuvieron mostraron que el proceso de UF es adecuado para la producción de concentrados proteicos, obteniendo un concentrado de proteína superior al 70% en peso (base seca), con porcentajes de cenizas cercanos a cero al final de la UF, mostrando que casi toda la ceniza fue eliminada del concentrado de proteína.

Palatnik *et al.* (2015), investigaron la recuperación de proteínas del suero de queso caprino, utilizando procesos de membrana que incluyen microfiltración y ultrafiltración tangencial para purificar y concentrar la solución de proteína, alcanzando una concentración de proteína de 91.4 g/100 g, convirtiendo estos efluentes en ingredientes de valor agregado para la industria alimenticia.

Das *et al.* (2016) mostraron que el proceso de UF es adecuado para la producción de concentrados de proteína a partir de efluentes lácteos residuales; obteniendo un concentrado de proteína superior al 70% en peso (base seca).

3.2.2 Determinación del rendimiento de la UF en el concentrado de proteínas

La cantidad de componentes iniciales del suero lácteo se pueden comparar con los obtenidos en el concentrado de proteínas a través del cálculo del rendimiento de los parámetros fisicoquímicos reportados.

Los resultados de la Tabla 3.4 muestran la eficiencia en la concentración de los componentes del efluente después de haber sido sometido al proceso de UF, los cuales indican que se obtuvo un rendimiento considerable, para el caso de las proteínas como componente de interés, ya que se determinó que aproximadamente el 60% de éstas, fueron retenidas por la membrana utilizada. Otros componentes como el calcio y acidez mostraron rendimientos menores ya que son partículas de pesos moleculares menores que fueron separadas en la fracción del permeado. En la Figura 3.3 se observa el rendimiento obtenido para cada parámetro evaluado.

Tabla 3.4. Resultados del rendimiento del concentrado de proteínas

Parámetros	Efluente Lácteo	Concentrado proteico	Rendimiento del concentrado proteico (%)
Calcio (g/L)	0.272	0.242	44.485
Azúcares reductores(g/L)	40.96	23.9493	29.235
Sólidos totales (g/L)	125.3	60.35	24.082
Ceniza (%)	1.7326	0.6482	18.706
Proteínas (g/L)	11.6671	14.0250	60.105
Acidez (g/L)	2.4	2.6048	54.260

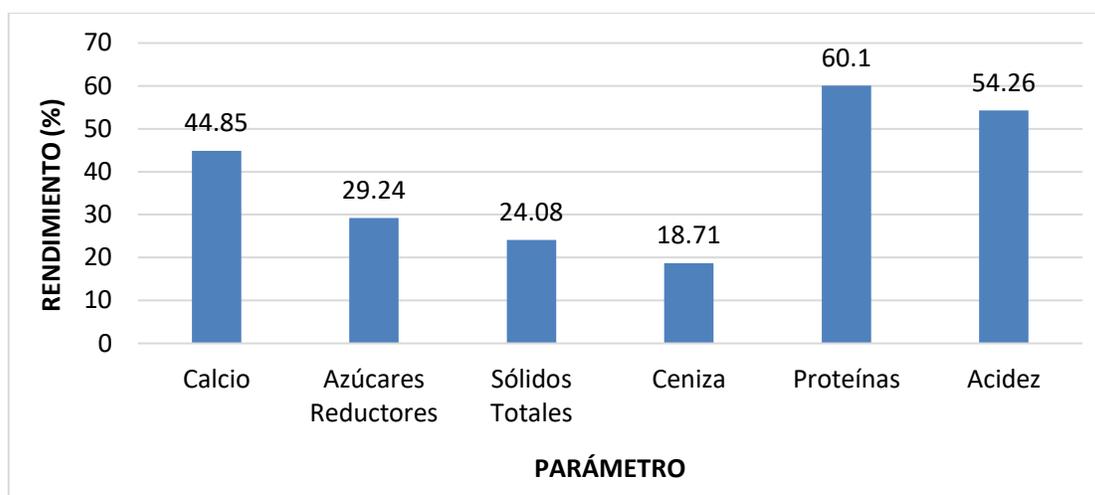


Figura 3.3. Rendimiento de la ultrafiltración en el concentrado proteico

De los resultados obtenidos, se observa que el porcentaje de rendimiento de proteínas en el concentrado se encuentra dentro de los valores reportados en la literatura que abarcan rangos de 35-80%, siendo más cercanos a los reportados por Tovar *et al.* (2012) y Muñi *et al.* (2005). Algunas de las investigaciones realizadas, se muestran a continuación.

Muñi *et al.* (2005) reportan el rendimiento en la concentración de proteína de lactosuero con una planta móvil de ultrafiltración/nanofiltración, donde el máximo rendimiento de retención de proteína en el proceso de ultrafiltración se obtuvo a la presión de 487.46 KPa y fue de 71.60%, logrando un alto grado de fraccionamiento del lactosuero que puede verificarse con los valores de proteína obtenidos en el proceso de ultrafiltración y de lactosa en el proceso de nanofiltración.

Muro *et al.* (2010) destacan la influencia de la temperatura en la ultrafiltración para retener las proteínas, alcanzando el 80% de rendimiento con una membrana de 15 kDa operando a 2.4 L/h a 30 °C y 1.5 bar.

Baldasso *et al.* (2011), encontraron que, mediante el uso de suero dulce, se puede alcanzar aproximadamente un 42 y 35% de rendimiento de proteína a una temperatura de 50 °C, en una membrana de 10 kDa.

Tovar *et al.* (2012), reportaron el 53% de rendimiento en el proceso de UF para el concentrado de proteínas de suero lácteo dulce utilizando una membrana cerámica de 15 kDa y 1.5 bar de presión.

3.3 Hidrólisis de proteínas de suero lácteo utilizando *Bacillus subtilis*, Termolisina y Proteinasa

En este apartado se muestran los resultados obtenidos de la hidrólisis del concentrado de proteína de suero por métodos enzimáticos, expresados en grado de hidrólisis (GH).

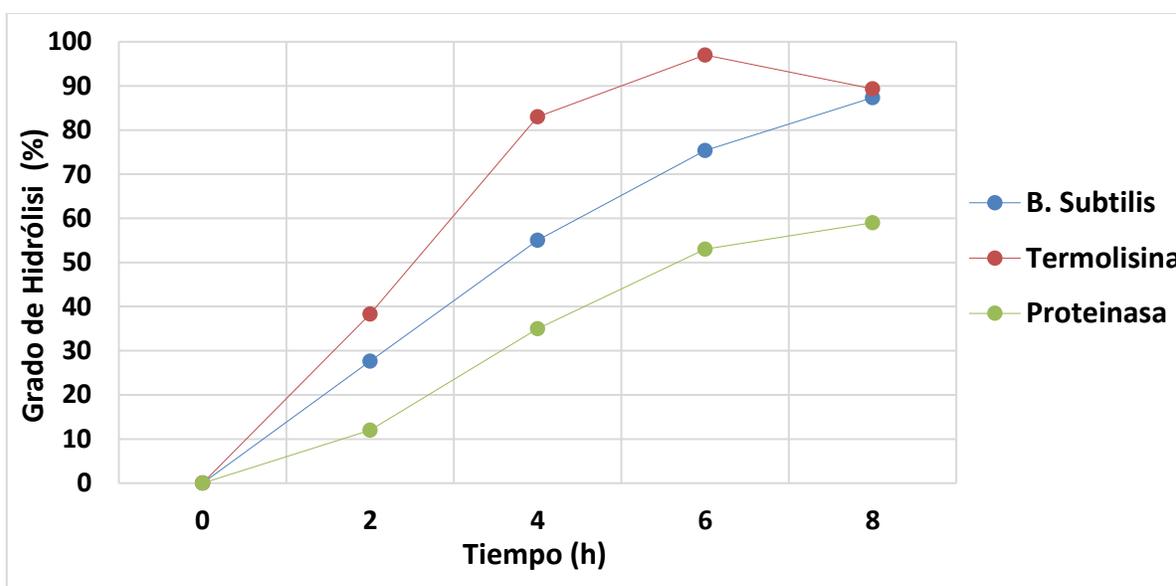


Figura 3.4. Grado de hidrólisis obtenido por los diferentes medios enzimáticos

En la Figura 3.4 se muestra el GH obtenido por *B. subtilis*, termolisina, y proteinasa en función del tiempo, que en términos generales puede entenderse como una cinética la cual está influenciada por la concentración del sustrato. Analizando cada uno de los medios enzimáticos utilizados se observa que la termolisina mostró la mayor velocidad de reacción, manteniendo un comportamiento lineal durante las

primeras 4 h y posteriormente existe un decaimiento de la linealidad, alcanzando un valor máximo de GH de 97 % a las 6 h.

Para el caso del *B. subtilis* se observa que éste tiene una velocidad de reacción menor a la termolisina y un comportamiento lineal durante las primeras 6 h, donde posteriormente existe una disminución de su velocidad sin alcanzar su valor máximo de GH a las 8 h, debido al comportamiento de una cinética enzimática se espera que el aumento que exista sea ligeramente mayor haciendo innecesario aumentar el tiempo de hidrólisis. Finalmente, la proteinasa presentó la velocidad de reacción más baja e inicialmente requirió de 2 h para presentar un comportamiento lineal que mantiene hasta las 6 h, posterior a eso su velocidad decae, alcanzando un máximo valor de GH de 59% a las 8 h, siendo el valor más bajo obtenido.

De lo anterior se puede decir que los tres medios utilizados, siguen el comportamiento de una cinética enzimática, la cual muestra un aumento lineal al inicio de la reacción el cual disminuirá a cero a medida que se termina el sustrato manteniendo un valor constante o ligeramente menor de GH, siendo innecesario usar tiempos de hidrólisis mayores. Debido a estos resultados se seleccionan los hidrolizados obtenidos a las 6 h por *B. subtilis* y Termolisina para análisis posteriores.

Algunas de las investigaciones realizadas sobre hidrólisis, se han hecho a tiempos de degradación menores, sin embargo, los resultados son semejantes a los reportados, tal es el caso de Harriman *et al.* (2013), quienes encontraron un 47% de hidrólisis en concentrados de proteína de suero lácteo durante 5 h con *Aspergillus Sojae* y *Bacillus licheniformis*. Alvarado (2017) llevó a cabo la hidrólisis de un concentrado de proteína de suero con *B subtilis* libre y encapsulado obteniendo valores de 70% de GH a las 8 h y un valor máximo de porcentaje de hidrólisis de 85% a las 24 h con *B. subtilis libre* y de 83% con *B. subtilis* encapsulado.

Spellman *et al.* (2003) obtuvieron un grado de hidrólisis de 20% con la enzima Debitrasa HYW20, en un periodo de incubación de 6 h, en suero de leche y de 15% con Alcalasa en el mismo tiempo de incubación.

3.4 Fraccionamiento de los hidrolizados con una membrana de Nanofiltración

En la Figura 3.5, se muestran los productos obtenidos del fraccionamiento del hidrolizado mediante una membrana de nanofiltración, la cual dio como resultado fracciones >3 kDa (líquido semitransparente, ligeramente amarillo cuya composición es mayor en proteínas y menor en lactosa, agua y sales) y fracciones < 3 kDa (líquido transparente e incoloro cuya composición es mayor en lactosa agua y sales y menor en proteínas).

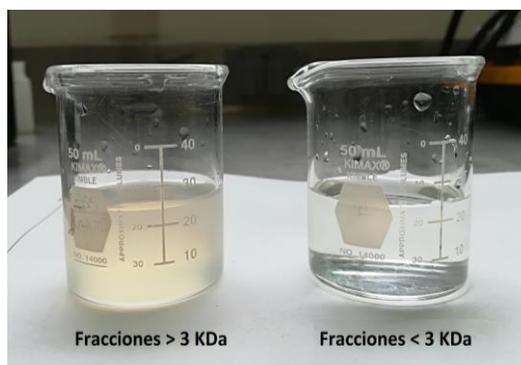


Figura 3.5. Fracciones del hidrolizado

3.5 Determinación de los pesos moleculares de las fracciones hidrolizadas

En este apartado se presentan los resultados del análisis de electroforesis para las fracciones > 3 kDa provenientes de hidrolizados de 2, 4, 6, 8 y 24 h por termolisina y *B. subtilis*. La Figura 3.6 muestra el diagrama de electroforesis obtenido en el cual se observa el marcador correspondiente al concentrado proteico (3.6a) con pesos moleculares conocidos, donde se pueden apreciar las principales bandas de las proteínas de suero lácteo, entre las cuales se encuentran la inmunoglobulina (Ig), lactoferrina (Lf), albumina de suero bovino (BSA) y en mayor proporción la β -lactoglobulina (β -Lg) y α -lactoalbúmina (α -La). Este marcador se utilizó para la estimación de los pesos moleculares de las proteínas encontradas en las muestras.

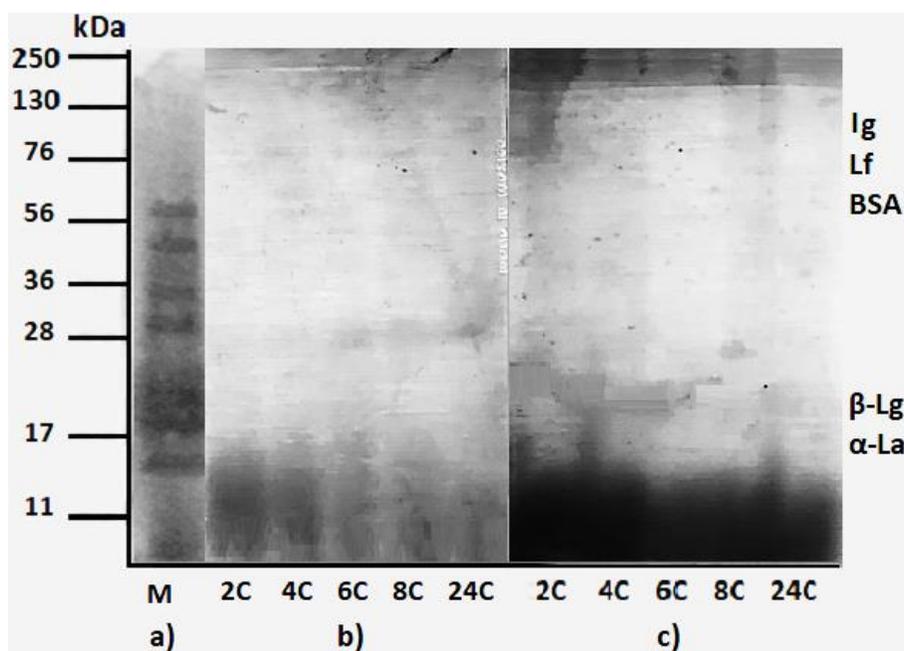


Figura 3.6. Resultados de Electroforesis SDS-PAGE. a) bandas características de las proteínas de suero lácteo presentes en el concentrado proteico, b) fracciones de hidrolizado > 3 kDa obtenidas con termolisina y c) fracciones de hidrolizado > 3 kDa obtenidas con *B. subtilis* para 2, 4, 6, 8 y 24 h de hidrólisis

La Figura 3.6b muestra las fracciones de hidrolizado > 3 kDa obtenidas con termolisina durante 24 h de hidrólisis, donde se observa una degradación de las proteínas de mayor peso molecular, obteniéndose fracciones <17 kDa que a medida que transcurre el tiempo de hidrólisis, se van haciendo más tenues, lo que indica la degradación de éstas en fragmentos de menor tamaño, también puede apreciarse una banda ligera de las 6 a las 24 h correspondiente a fracciones de 28 kDa. En la Figura 3.6c, se muestran las fracciones de hidrolizado > 3 kDa obtenidas con *B. Subtilis* las cuales muestran que de las 2 a las 24 h se degradaron las proteínas de mayor peso molecular, observándose residuos de la β -Lg y la α -La durante las primeras 4 h, encontrándose en mayor cantidad fracciones < 17 kDa.

Estos resultados comprueban que por ambos medios existió una hidrólisis adecuada del concentrado de proteína. Debido a las limitaciones de los geles utilizados no fue posible distinguir las fracciones < 3 kDa, sin embargo, se sabe que se encuentran presentes debido al rango de proteínas obtenido.

3.6 Determinación de la actividad biológica de las fracciones hidrolizadas

Los resultados correspondientes a la actividad antioxidante (AA) obtenida por las fracciones < 3 KDa, se muestran en este apartado, para ello se realizó una curva de calibración del ácido ascórbico (Figura 3.7), en la cual se graficó la absorbancia en función de la concentración y se utilizó como referencia para determinar la actividad antioxidante de las muestras. La actividad antioxidante se expresó en VCEAC (actividad antioxidante equivalente a ácido ascórbico) como mg de ácido ascórbico por mL de muestra.

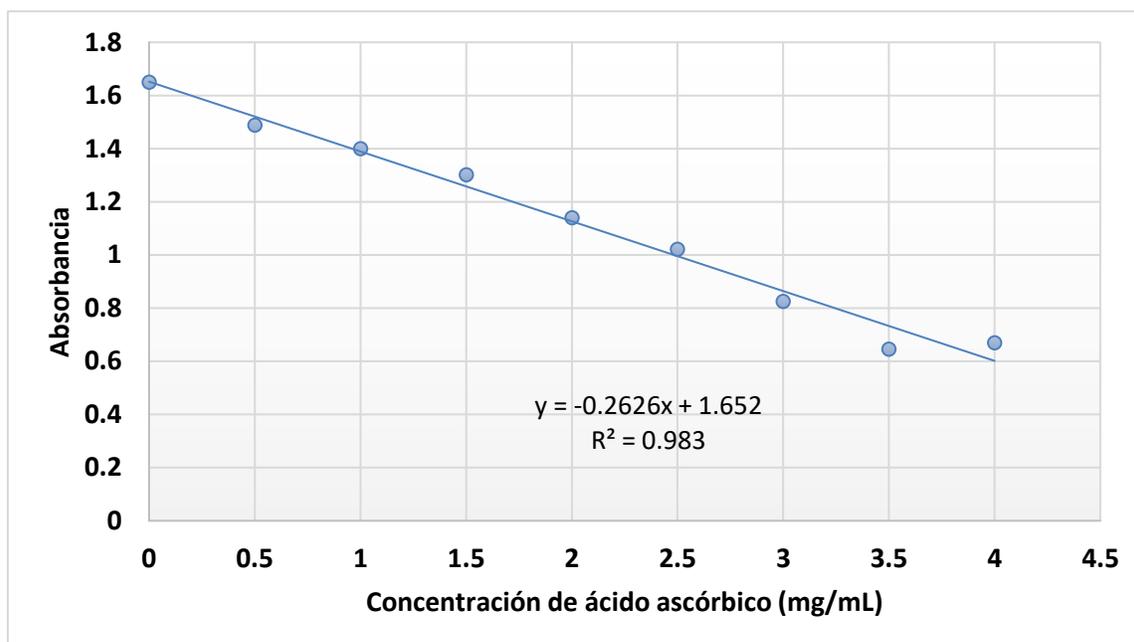


Figura 3.7. Curva de calibración de ácido ascórbico para determinar la actividad antioxidante

Los resultados obtenidos de este análisis se describen en la Tabla 3.5 para las fracciones < 3 KDa obtenidas por *B. subtilis* y termolisina durante el proceso de hidrólisis.

Tabla 3.5. Actividad antioxidante expresada en VCEAC de las fracciones < 3 KDa obtenidas con *B. subtilis* (50 °C y pH de 7) y termolisina (70 °C y pH de 8)

Tiempo	<i>B. SUBTILIS</i>		TERMOLISINA	
	GH (%)	AA Fracción < 3 KDa (mg/mL)	GH (%)	AA Fracción < 3 KDa (mg/mL)
0	0	1.6	0	1.6
2	30	1.9	40	1.5
4	53	1.8	84	3.0
6	71	2.9	97	3.2
8	87	1.6	88	2.7

En la Tabla 3.5 se puede observar que a las 6 h se obtienen los mayores valores de actividad antioxidante, siendo de 3.2 mg/mL para la termolisina y 2.9 mg/mL para el *B. subtilis*, por lo que las fracciones obtenidas a este tiempo serán las seleccionadas para su encapsulamiento debido a que proporcionan valores de actividad aceptables en un menor tiempo.

Los valores de AA obtenidos son resultado de la formación de secuencias peptídicas de menor tamaño causadas por la hidrólisis de las proteínas de origen, a estas fracciones se les atribuye una mayor actividad biológica, sin embargo, no solo el tamaño de éstas determinara su actividad sino también la secuencia de aminoácidos que forman.

Los resultados obtenidos con *B. subtilis* muestran que un mayor grado de hidrólisis, no siempre está relacionado con una mayor AA, ya que sus fracciones alcanzan un valor máximo de actividad a las 6 h y no a las 8 h, esto puede deberse a que un mayor grado de hidrólisis implica una proteólisis extensiva de las proteínas, lo que resulta en la formación de aminoácidos libres que no son efectivos como antioxidantes (Smaranayaka & Li-Chan, 2011; Sarmadi & Ismail, 2010). Este comportamiento también lo observaron Kamau y Lu (2011) con la enzima tripsina al investigar la relación entre el GH y la actividad antioxidante por el método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), concluyendo que no hubo correlación entre ambos.

El *B. subtilis*, al ser una bacteria ácido láctica produce varias enzimas, entre ellas: neutrasa, subtilisina y corolasa, que actúan a diferentes condiciones óptimas y tienen diferente especificidad, por lo que liberan péptidos de diversos tamaños y secuencia de aminoácidos, lo que podría ser una desventaja ya que, para ciertas secuencias de aminoácidos, la presencia de otros aminoácidos puede conducir a efectos antagonistas entre ellos, reduciendo su propia actividad de eliminación de radicales (Hernández *et al.*, 2005).

En el caso de la termolisina, se observa que a las 6 h las fracciones < 3 kDa obtienen el mayor grado de hidrólisis (97%), con un valor de AA de 3.2 mg/mL, estos resultados ligeramente superiores a los de *B. subtilis* se relacionan con la especificidad que tiene la termolisina ya que ésta hidroliza los enlaces proteicos en el lado N-terminal de los residuos de aminoácidos hidrofóbicos, con una división preferencial como la siguiente: X- (sitio de división)-Y-Z, donde:

X = Cualquier aminoácido

Y = Leucina (Leu), fenilalanina (Phe), isoleucina (Ile), valina (Val), metionina (Met), alanina (Ala)

Z = Cualquier aminoácido que no sea prolina (Pro)

La división N-terminal a Leu es preferida sobre la división N-terminal a Phe, que a su vez es preferido sobre la división N-terminal a los otros aminoácidos.

De lo anterior se observa que la actividad antioxidante obtenida en las fracciones de hidrolizados dependerá de la especificidad de la enzima utilizada para hidrolizar ciertos enlaces proteicos. Autores como Gallegos *et al.* (2013), reportan que la mayor actividad de los péptidos comparada con la de los aminoácidos libres se debe a las propiedades fisicoquímicas conferidas por sus secuencias, así para que un péptido tenga actividad antioxidante deberá incluir en su estructura restos de aminoácidos hidrofóbicos como valina o leucina en el amino terminal, así como prolina, histidina, tirosina, triptófano, metionina y cisteína en sus secuencias. Otros autores como Saito *et al.* (2003) encontraron que los tripéptidos que contienen

residuos de triptófano o tirosina en el carbono terminal presentan una fuerte actividad de captación de radicales libres

Hernández *et al.* (2005) investigaron la actividad antioxidante de hidrolizados de proteínas de suero bovino a partir de las dos proteínas principales del suero, α -lactoalbúmina (α -La) y β -lactoglobulina (β -Lg), encontrando que la Termolisina y la Corolasa PP fueron las enzimas más adecuadas para obtener hidrolizados antioxidantes. Otros autores que han estudiado la capacidad de obtener hidrolizados con actividad antioxidante usando termolisina son Contreras *et al.* (2011), quienes reportan que los hidrolizados de concentrado de proteína de suero obtenidos con termolisina muestran una potente actividad de eliminación de radicales, obteniendo la mayor actividad antioxidante (2.57 mmol Trolox/mg proteína) en un concentrado de proteína de suero después de 8 h de hidrólisis a 80 °C y una relación enzima/sustrato de 0.10 (p/p).

3.7 Encapsulamiento de fracciones activas

Las fracciones obtenidas con mayor actividad fueron encapsuladas en un sistema polimérico compuesto. Los encapsulados obtenidos se muestran en la Figura 3.8.



Figura 3.8 Fracciones activas encapsuladas a) PG-T, b) PC-T, c) PG-S, d) PC-S

Las técnicas SEM y FT-IR permiten analizar las características de las partículas cargadas PC-T, PC-S, PG-T y PG-S. La técnica de SEM se utilizó con el fin de analizar la morfología de los materiales y poder identificar la presencia de péptidos en las partículas. La Figura 3.9 muestra micrografías de las partículas obtenidas, en

ellas se observa una superficie homogénea con presencia de péptidos de suero, que corresponden a los puntos o depósitos blancos, mostrando un mayor contenido en PC-T, PC-S y PG-S, revelando una gran capacidad de éstos para atrapar péptidos. Estos resultados se deben a la heterogeneidad estructural de las mezclas de péptidos del material y las fracciones peptídicas.

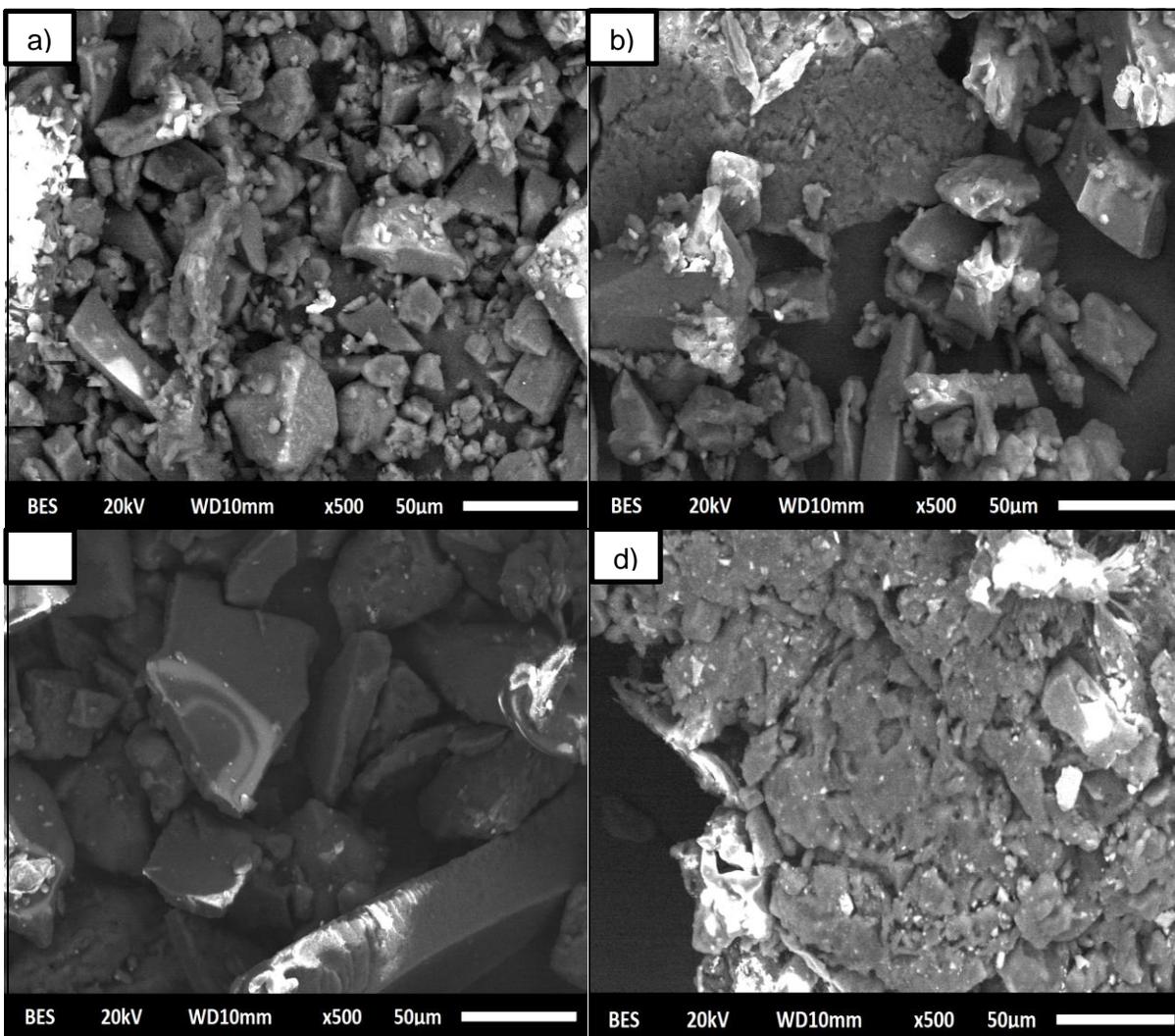


Figura 3.9 Imágenes SEM de partículas cargadas a 500x. a) PC-T, b) PC-S, c) PG-T y d) PG-S

Los espectros FT-IR de las partículas cargadas se muestra en la Figura 3.10, en ellos se muestran las bandas principales de los materiales de encapsulamiento, junto con las bandas de las fracciones encapsuladas.

bandas características a 3246 cm^{-1} (O-H), 1728 cm^{-1} (C=O), 1611 cm^{-1} (C=O), $1428\text{-}1330\text{ cm}^{-1}$ (C—O—H) y $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ (C-O).

Por otro lado, dada la naturaleza proteica de los encapsulados (PC-T, PC-S, PG-T y PG-S), su espectro mostró bandas similares a la gelatina y el colágeno, aunque centradas en números de onda ligeramente diferentes y en algunos casos se presentó una superposición de las bandas espectrales en las regiones de la amina I (3300), amida I ($1625\text{-}1645$) y amida II ($1530\text{-}1550$), mostrando un ligero ensanchamiento y disminución de la intensidad de los picos, lo que se atribuye a las interacciones entre los péptidos de las fracciones y las matrices de encapsulamiento (Gómez *et al.*, 2016). Por otro lado algunas de las bandas que se encuentran en la región entre $1740\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$ (C=O) correspondientes a los grupos carboxilo de la pectina se ven cubiertas por otras las bandas más intensas cercanas a ellas, en este caso las de la región de $1625\text{-}1645\text{ cm}^{-1}$ que también corresponde al grupo (C=O) lo que indica que hubo una superposición de las bandas, debida a la contribución de los materiales presentes.

Otra banda característica de la pectina, que disminuye su intensidad en los espectros FT-IR de las muestras es la que se localiza a 1010 cm^{-1} correspondiente al enlace C-O, la cual, a pesar de disminuir su tamaño, sigue presente en la región de $1300\text{-}1000$.

La información proporcionada por el análisis FT-IR mostró que existen interacciones entre los péptidos del hidrolizado y las matrices de encapsulamiento durante el proceso de encapsulación, como se infiere. a partir de los cambios espectrales en las bandas del encapsulado, resultados que coinciden con la investigación desarrollada por Gómez *et al.* (2016).

3.8 Determinación de la capacidad de liberación del sistema de encapsulamiento en simulación de condiciones gastrointestinales.

En la Tabla 3.6, se exponen los datos obtenidos en mg/mL de actividad antioxidante (AA) de péptidos liberados por las partículas PC-T, PC-P, PG-T y PG-P no digeridas y digeridas, péptidos libres de termolisina (FT) y péptidos libres de proteinasa (FP), ya que estas muestras se utilizaron como control de ensayo y las matrices de encapsulamiento sin fracciones peptídicas.

Tabla 3.6. Actividad antioxidante (mg/mL) obtenida en partículas cargadas digeridas, no digeridas y péptidos libres

Muestra	AA de muestras no digeridas (mg/mL)	AA (Digestión gástrica)	AA (Digestión gastrointestinal)
FT	3.151	1.378	1.992
FS	2.930	0.468	0.929
PC-T	1.135	1.614	1.966
PC-S	1.350	1.787	2.226
PG-T	0.493	0.541	1.4656
PG-S	0.473	0.662	1.479
PC	0.715	0.265	1.928
PG	0.243	0.084	2.416

En la columna final, se expresan los valores de AA, de las fracciones libres (FT y FS), fracciones encapsuladas (PC-T, PC-S, PG-T y PG-S) y materiales de encapsulamiento (PC y PG). En los datos presentados para las fracciones encapsuladas, se realizó un ajuste a los valores finales, en los cuales, no se toma en cuenta el valor de la matriz de encapsulamiento, esto con el fin de ver el comportamiento de las fracciones, sin la contribución de los materiales

La capacidad de liberación de los sistemas de encapsulamiento se evaluó en base a los valores de actividad antioxidante, medidos en mg/mL obtenidos en cada etapa

de la simulación *in vitro*, mostrando que, durante la etapa final de la simulación, las fracciones libres reducen su AA inicial, siendo de 3.151 a 1.992 para el caso de la termolisina y de 2.930 a 0.929 para las obtenidas con *B. subtilis*, en ambos casos se observa que la AA de las fracciones libres, fue afectada por la agresividad de las condiciones gástricas (pH, enzimas), siendo las obtenidas con *B. subtilis* las que tuvieron una disminución mayor de sus valores de AA.

Por el contrario, las fracciones encapsuladas (PC-T, PC-S, PG-T, PG-S) mostraron un comportamiento distinto; para verificar que el encapsulamiento de los péptidos activos, con los materiales propuestos, presentó alguna ventaja contra aquellos que se utilizaron de forma libre, se comparó los valores de las fracciones libres con las fracciones encapsuladas sin tomar en cuenta el valor de AA que añade el material, lo que muestra que las fracciones encapsuladas PCS y PGS, permiten mantener valores de actividad mayores que su contraparte no inmovilizada, las cuales pierden gran parte de su AA. Por otro lado, se observa que las fracciones PCT y PGT, no aportan ninguna protección ya que mantienen los valores de actividad que tendrían las fracciones libres de termolisina. Lo anterior puede atribuirse a interacciones entre los diferentes péptidos producidos por la degradación de los materiales y aquellos que se encuentran en las fracciones libres, siendo los de *B. Subtilis* los que además de mantener su actividad, logran una mejor adaptación con el material y su estructura, logrando con ello un aumento en su AA.

Estos resultados son consistentes con las investigaciones de Korhonen & Pihlanto (2006); Vioque *et al.* (2006) y Sarmadi *et al.* (2010) quienes mencionan que independientemente de la presencia de aminoácidos tales como prolina, cisteína, histidina, lisina, triptófano, tirosina y metionina, característicos de péptidos antioxidantes, la secuencia que presenten es la que delimita la actividad antioxidante, siendo la secuencia Pro-His-His la que hasta el momento ha presentado la mayor actividad.

Otra observación importante es que en las fracciones peptídicas encapsuladas (PC y PG), el material de encapsulamiento utilizado influyó en los valores de AA

obtenidos y no la fuente de obtención de las fracciones, lo cual se verifica en cada una de las etapas de la simulación, donde, para todas ellas, los valores entre las fracciones de PC serán muy similares, siendo el mismo caso para las fracciones de PG, lo cual puede deberse a las semejanzas en la composición de la gelatina y el colágeno.

De lo anterior puede concluirse que en el encapsulamiento de fracciones peptídicas, no solo es importante considerar los materiales encapsulantes, sino también las secuencias peptídicas que forman ya que al ser sometidas a una simulación gastrointestinal *in vitro*, sufren cambios en su estructura, interactuando químicamente con las fracciones peptídicas de los materiales utilizados (en el caso de ser proteínas), lo que formara nuevas secuencias peptídicas de diferentes tamaños con mayor o menor bioactividad (Erdmann *et al.*, 2008; Korhonen & Pihlanto 2006; Vioque *et al.*, 2006 y Sarmadi *et al.*, 2010).

Autores como Erdmann *et al.* (2008) llegaron a la conclusión de que la biofuncionalidad de los péptidos bioactivos depende de sus propiedades estructurales; así los péptidos de cadena larga (10-51 aminoácidos) pueden ser absorbidos intactos a través del intestino y producir alguno de los efectos fisiológicos, disminuyendo su potencia entre más grande sea la longitud de la cadena; a diferencia de los péptidos cortos (2-3 aminoácidos), los cuales son absorbidos más rápidamente que los aminoácidos libres.

En cuanto a los materiales de encapsulamiento utilizados, se sabe que el colágeno y la gelatina también han demostrado ser una buena fuente de péptidos, exhibiendo numerosas bioactividades como: actividad antioxidante, antihipertensiva/inhibidora de la ECA (enzima convertidora de angiotensina), antimicrobiana, capacidad de unión a minerales, efecto reductor de lípidos, actividad inmunomoduladora entre otras (Hou *et al.*, 2009; Guillén *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010), sin embargo no han sido tan ampliamente estudiados como otras fuentes proteicas.

Mohan *et al.* (2015) menciona que una matriz basada en proteínas es un sistema beneficioso para la nutrición, pues tiene propiedades funcionales, tales como

capacidad de formación de geles, emulsificación y solubilidad; sin embargo, el encapsulamiento de una sustancia de núcleo bioactivo con un material químicamente similar es un desafío debido a la similitud estructural, ya que el material con el que se encapsula enfrentará problemas de inestabilidad similares al compuesto bioactivo. Debido a esto los polisacáridos se pueden combinar con proteínas para proporcionar estabilidad estructural al encapsulado. Algunos estudios que demuestran la eficiencia del uso de sistemas poliméricos proteína-polisacárido, son los realizados por He *et al.* (2016); Li (1998); Li *et al.* (2015) quienes han demostrado que las proteínas, los péptidos o los hidrolizados de proteínas, pueden ser liberados efectivamente a partir de gelatina y estructuras de encapsulación basadas en quitosano, en sistemas acuosos.

Tamm *et al.* (2016) evaluaron las propiedades funcionales y antioxidantes de un hidrolizado de proteína de suero-complejo de pectina en emulsiones, observando que los complejos interfaciales de β -Lg/pectina pueden reducir la formación de hidroperóxidos en el aceite de pescado microencapsulado mediante secado por pulverización, con eficiencias de encapsulación de $\geq 95.2\%$. por lo que las emulsiones bicapa que contienen dos biopolímeros con carga opuesta (pectina y β -Lg) son sistemas potenciales para estabilizar química y físicamente los ingredientes lipófilos sensibles.

CONCLUSIONES

La caracterización del efluente analizado mostró que éste se encuentra compuesto en mayor proporción por suero lácteo con un pH que lo coloca dentro de la clasificación de suero dulce y un contenido de proteínas que lo convierte en una fuente potencial para la recuperación de éstas. En cuanto a sus demás parámetros (acidez, calcio, azúcares reductores y cenizas) se observa que todos los valores obtenidos del efluente se encuentran dentro de los rangos reportados por los autores con excepción del de sólidos totales, lo que se atribuye a la elevada carga orgánica presente en el efluente y se ve reflejado en la disminución del porcentaje de cenizas.

Los rendimientos obtenidos durante el proceso de ultrafiltración muestran la eficiencia de los procesos de membrana en la recuperación de proteínas, logrando un incremento de éstas en el concentrado de 11.67 a 14.03 con un rendimiento del 60% y una disminución significativa de la concentración de sus componentes de menor peso molecular

Como resultado de la hidrólisis del concentrado de proteína se encontró que el tiempo adecuado para que ésta se lleve a cabo fue a las 6 h ya que a este tiempo se obtuvieron valores significativos de GH, 96 % para la termolisina y 71 % para el *B. subtilis*, descartándose el uso de la proteinasa.

La determinación de la actividad antioxidante mostró que a las 6 h las fracciones de hidrolizado obtuvieron los mayores valores de AA por ambos medios, lo que se debe a la formación de fracciones de menor tamaño con secuencias específicas que se relacionan con una mayor actividad, esto se ve confirmado por la determinación de los pesos moleculares, donde se observó la presencia de fracciones de menor tamaño.

El valor mayor de actividad obtenido por la termolisina se debe a la especificidad que tiene para hidrolizar ciertos enlaces proteicos, generando péptidos con residuos de aminoácidos hidrofóbicos como Val o Leu, así como Met en su secuencia; los

cuales se relacionan con la generación de péptidos antioxidantes. El *B. subtilis* por el contrario al ser una bacteria proteolítica, libera distintos tipos de enzimas con diferente especificidad, sin embargo, esto no limita su capacidad para formar productos antioxidantes, por lo que ambos medios resultan adecuados en la formación de fracciones con actividad biológica.

La simulación gastrointestinal de los péptidos libres obtenidos con termolisina (FT) y *B. Subtilis* (FS) mostró una disminución considerable de su AA que se atribuye a una hidrólisis extensiva de las proteínas durante el proceso de digestión, lo que lleva a la formación de fracciones con secuencias de aminoácidos de menor actividad o bien a la formación de aminoácidos libres que no son efectivos como antioxidantes.

Por el contrario, las fracciones encapsuladas (PC-T, PC-S, PG-T, PG-S) mostraron un comportamiento distinto, para el caso de las fracciones PC-S y PG-S, se observó que ambos encapsulados aumentaron su AA al final de la simulación con respecto a su contraparte no inmovilizada, mientras que las fracciones encapsuladas PC-T y PG-T, mantuvieron o disminuyeron su AA con respecto a las fracciones libres, por lo que el encapsulamiento para éstas, no represento alguna protección o beneficio.

La diferencia de resultados entre las fracciones encapsuladas que aumentaron su actividad y aquellas que la disminuyeron se debe a que durante el encapsulamiento de éstas y su digestión, la estructura de las fracciones peptídicas se vio modificada por interacciones químicas entre las fracciones peptídicas encapsuladas y los materiales de encapsulamiento, formando nuevas secuencias como lo describen los autores (Hernández *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2016), siendo las obtenidas con *B. Subtilis* aquellas que favorecen la formación de péptidos con secuencias de aminoácidos con mayor AA.

De lo anterior puede decirse que el trabajo de investigación realizado cumplió con el objetivo de obtener encapsulados de fracciones activas a partir de hidrolizados de proteínas de suero, provenientes de efluentes de la industria láctea, siendo PCS y PGS, aquellos que lograron mantener o aumentar su actividad en comparación con las fracciones libres.

FUENTES DE CONSULTA

Abaigar, A., (2009). El lactosuero en la alimentación del ganado porcino. ITG Ganadero: p. 13-17.

Alting, L., Hauschild, M., & Wenzel, H. (1997). Environmental assessment in product development. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 355(1728), 1373-1388.

Alvarado C., Guerra M. (2010) Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *Anales Venezolanos de Nutrición* 23(1): 42-49.

Alvarado, Y.; Muro, C.; Illescas, J.; Díaz, C., & Riera, F. (2016). Functionalized Polymers for Enhance Oral Bioavailability of Sensitive Molecules. *Polymers*, 8(6), 214.

Alvarado, Y. (2017). Aprovechamiento del suero lácteo para la obtención de péptidos antihipertensivos encapsulados en sistemas poliméricos biodegradables. (Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Ingeniería Ambiental). Instituto Tecnológico de Toluca.

Andrades, J.A. (2008). Contaminación de las aguas. Sector Lácteo. Master Profesional en Ingeniería y Gestión Medio Ambiental. Escuela Organización Industrial. Sevilla.

Ariyaratna, R.I. & Karunaratne N. D. (2015). Use of chickpea protein for encapsulation of folate to enhance nutritional potency and stability. *Foods and bioproducts processing*, 95, 76-82.

Baldasso, C.; Barros, T.; Tessaro, I. (2011). Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination* 278, 381 - 386.

Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 42(2), 227-236.

Bylund, G. (2003). *Manual de industrias lácteas*. España. Mundi Prensa Libros SA.

Callejas, J., Prieto, F., Reyes, V., Marmolejo, Y., & Méndez, M. (2012). Caracterización fisicoquímica de un lactosuero: potencialidad de recuperación de fósforo. *Acta Universitaria*, 22 (1), 11-18.

Carvalho, F., Prazeres, A. R., & Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Science of the total environment*, 445, 385-396.

Chan, K. M., Decker, E. A., & Feustman, C. (1994). Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 34(4), 403-426.

Contreras, M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P. J., & Recio, I. (2011). Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 44(1), 9-15.

Dai, C., Wang, B., & Zhao, H. (2005). Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 41(2), 117-120.

Das, B., Sarkar, S., Sarkar, A., Bhattacharjee, S., & Bhattacharjee, C. (2016). Recovery of whey proteins and lactose from dairy waste: A step towards green waste management. *Process Safety and Environmental Protection*, 101, 27-33.

Desai, K.G., & Park, H.J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23, 1361-1394.

Dissanayake, M.; Vasiljevic, T. (2009). Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic high-pressure shearing. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1387–1397.

Erdmann, K., Cheung, B. W., & Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of nutritional biochemistry*, 19(10), 643-654.

Freiberg, S., & Zhu, X. X. (2004). Polymer microspheres for controlled drug release. *International journal of pharmaceutics*, 282(1-2), 1-18.

Gallegos Tintoré, S., Chel Guerrero, L., Corzo Ríos, L.J., Matínez Ayala, A.L. (2013). Péptidos con actividad antioxidante de proteínas vegetales. En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero & D. Betancur Ancona (Eds.), *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 111-122). Barcelona: OmniaScience.

Gil, H. A. *Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*. Edit. Médica Panamericana, 30 de junio de 2010, 820 p. ISBN 978-84-9835-347-1.

Giroux, H. J., Robitaille, G., & Britten, M. (2016). Controlled release of casein-derived peptides in the gastrointestinal environment by encapsulation in water-in-oil-in-water double emulsions. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 225-232.

Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., & Di Cagno, R. (2002). Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical reviews in food science and nutrition*, 42(3), 223-239.

Gobbetti, M., Minervini, F., & Rizzello, C. G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 173-188.

Gómez-Mascaraque, L. G., Miralles, B., Recio, I., & López-Rubio, A. (2016). Microencapsulation of a whey protein hydrolysate within micro-hydrogels: Impact on gastrointestinal stability and potential for functional yoghurt development. *Journal of Functional Foods*, 26, 290-300.

Guadix, A., Guadix, E. M., Dueñas, M. P., González-Tello, P., & Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79-89.

Guillén, G., López Caballero, M. E., Alemán, A., López de Lacey, A., Giménez, B., & Montero García, P. (2010). Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin.

Gutiérrez, H. (2013). Obtención de derivados lácteos por ultrafiltración. *Alimentaria*, 51-54.

Hannibal, B., Antonio, S., Mercy, A., Evelyn, R., Paola, V., & Adriana, R. (2015). Aprovechamiento del suero de leche como bebida energizante para minimizar el impacto ambiental. *European Scientific Journal, ESJ*, 11(26).

Harriman, A., Morais, P.C., Silvestre, V., Silva, M., Silva, A. C., Simoes S., 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.

He, S., Mao, X., Zhang, T., Guo, X., Ge, Y., Ma, C., & Zhang, X. (2016). Separation and nanoencapsulation of antitumor peptides from Chinese three-striped box turtle (*Cuora trifasciata*). *Journal of microencapsulation*, 33(4), 344-354.

Hernández-Ledesma, B., Davalos, A., Bartolome, B., & Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 588-593.

Jovanovic, S., Barac, M. & Macej, O. (2005). Whey proteins-Properties and Possibility of application. *Mljekarstvo*, 55(3), 215-233.

Kamau, S. M., & Lu, R. R. (2011). The effect of enzymes and hydrolysis conditions on degree of hydrolysis and DPPH radical scavenging activity of whey protein hydrolysates. *Curr. Res. Dairy Sci*, 3, 25-35.

Koolman J., Klausenrich., (2004). Bioquímica Texto y Atlas. Editorial Médica Panamericana. 3ra edición en español. p 176.

Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International dairy journal*, 16(9), 945-960

Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40(1), 43-81.

Krzeminski, A.; Großhable, K.; Hinrichs, J. (2011). Structural properties of stirred yogurt as influenced by whey proteins. *Food Science and Technology* 44, 2134 – 2140

Li, J. K., Wang, N., & Wu, X. S. (1998). Gelatin nanoencapsulation of protein/peptide drugs using an emulsifier-free emulsion method. *Journal of microencapsulation*, 15(2), 163-172.

Li, M., Rouaud, O., & Poncelet, D. (2008). Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of pharmaceuticals*, 363(1-2), 26-39.

Li, Z., Paulson, A. T., & Gill, T. A. (2015). Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. *Journal of functional foods*, 19, 733-743.

Livney, Y. D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1-2), 73-83.

Ma, J. J., Mao, X. Y., Wang, Q., Yang, S., Zhang, D., Chen, S. W., & Li, Y. H. (2014). Effect of spray drying and freeze drying on the immunomodulatory activity, bitter taste and hygroscopicity of hydrolysate derived from whey protein concentrate. *LWT – Food Science and Technology*, 56(2), 296–302.

Madureira A., Tavares T, Gomes AMP, Pintado ME, Malcata FX. (2010) Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science* 93: 437-455.

Matar, C., LeBlanc, J. G., Martin, L., & Perdigon, G. (2003). Biologically active peptides released in fermented milk: role and functions. *Handbook of fermented functional foods*, 177-201.

Matté, G. M., & Rosa, S. A. (2013). A tecnologia da microencapsulação através das microesferas de quitosana. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 14(5), 206-218.

- Miranda, O., Ponce, I., Fonseca, P.L., Cutiño, M., Díaz, R. M., Cedeño, C. (2009). Características Fisicoquímicas de Sueros de Queso Dulce y Acido Producidos en el Combinado de Quesos de Bayamo. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*; 19(1):21-25
- Mohan, A., Rajendran, S. R., He, Q. S., Bazinet, L., & Udenigwe, C. C. (2015). Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. *RSC Advances*, 5(97), 79270-79278.
- Mohan, A., McClements, D. J., & Udenigwe, C. C. (2016). Encapsulation of bioactive whey peptides in soy lecithin-derived nanoliposomes: influence of peptide molecular weight. *Food Chemistry*, 213, 143-148.
- Muñi, A., & Páez, G., & Faría, J., & Ferrer, J., & Ramones, E. (2005). Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. *Revista Científica*, XV (4), 361-367.
- Muro-Urista, C., Díaz-Nava, C., García-Gaitán, B., Zavala-Arce, R. E., Ortega-Aguilar, R. E., Álvarez-Fernández, R., & Riera-Rodríguez, F. (2010). Recuperación de los componentes del lactosuero residual de una industria elaboradora de queso utilizando membranas. *Afinidad*, 67(547).
- Muro C, Álvarez F., Riera R, Arana C., Téllez J. (2011). Production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International* 17: 293-317.
- Muro, U. C., Riera, R. F., Alvarado, P. Y. (2014). Encapsulation of whey proteins. In *Whey Proteins functional Properties Production and Health Benefits*; Wyatt, M., Nova publishers: New York, NY, USA. pp. 75-116.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815.

Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., & Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, 668–676.

NMX-F-066-S-1978. Determinación de cenizas en alimentos. Investigación en línea el día 23/06/2017. <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-066-S-1978.PDF>

NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos. Investigación en línea el día 23/06/2017. <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-317-S1978.PDF>

NMX-F-420-1982. Determinación de acidez en leche fluida. Investigación en línea el día 23/06/2017 <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-420-S-1982.PDF>

NMX-F-426-1982. Determinación de sólidos totales en leche fluida. Investigación en línea el 23/06/2017 <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-426-1982.PDF>

Palatnik, D. R., Porcel, M. V. O., González, U., Zaritzky, N., & Campderrós, M. E. (2015). Recovery of caprine whey protein and its application in a food protein formulation. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 331-338

Pan, K., Song, Q., Wang, L., & Cao, B. (2011). A study of demineralization of whey by nanofiltration membrane. *Desalination*, 267, 217–221.

Paredes, P., Chávez, A., Rodríguez, J., Aguilar, N., Rentería, A., & Rodríguez, G. (2014). Características fisicoquímicas y microbiológicas de suero de leche de queso Chihuahua. *Investigación y Ciencia*, 22 (62), 11-16.

Parra, H.R. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 5669-5689.

Parra, R. (2009). Lactosuero: Importancia en la industria de alimentos. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 62(1), 4967 – 4982

Picot, A., & Lacroix, C. (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*, 14(6), 505-515.

Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T., & Korhonen, H. (1998). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*, 8(4), 325-331.

Rao, P. S., Bajaj, R. K., Mann, B., Arora, S., & Tomar, S. K. (2016). Encapsulation of antioxidant peptide enriched casein hydrolysate using maltodextrin–gum arabic blend. *Journal of food science and technology*, 53(10), 3834-3843.

Reid, A. A., Vuilleumard, J. C., Britten, M., Arcand, Y., Farnworth, E., & Champagne, C. P. (2005). Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca²⁺-induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. *Journal of Microencapsulation*, 22(6), 603-619.

Rivas, J., Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Beltran, F. (2010). Treatment of cheese whey wastewater: Combined coagulation– flocculation and aerobic biodegradation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(13), 7871-7877.

Romeo de la Cruz A. (2014). Aprovechamiento de suero lácteo para la obtención de productos enriquecidos en aminoácidos biológicamente activos. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Toluca.

Ruano, M. (2013). Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas. (Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias). Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas

Saez, V., Hernández, J. R., & Peniche, C. (2007). Las Microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas. *Biotecnol Apl*, 24, 98-107.

Saez Martinez, V. M. (2012). Microesferas de copolímeros de ácido láctico y glicólico cargadas con interferón alfa 2b y factor de crecimiento epidérmico: obtención, caracterización y estudios de liberación. (Doctoral dissertation, Universidad de La Habana).

- Saiga, A. I., Tanabe, S., & Nishimura, T. (2003). Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(12), 3661-3667.
- Saito, K., Jin, D. H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T., & Nokihara, K. (2003). Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3668-3674.
- Sarmadi, B.H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31, 1949–1956.
- Samaranayaka, A. G., & Li-Chan, E. C. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of functional foods*, 3(4), 229-254
- Spellman, D., McEvoy, E., O’cuinn, G., & FitzGerald, R. J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13(6), 447-453.
- Tamm, F., Härter, C., Brodkorb, A., & Drusch, S. (2016). Functional and antioxidant properties of whey protein hydrolysate/pectin complexes in emulsions and spray-dried microcapsules. *LWT-Food Science and Technology*, 73, 524-527.
- Torruco-Uco, J. G., Domínguez-Magaña, M. A., Davila-Ortiz, G., Martínez-Ayala, A., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2008). Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión antihypertensive peptides, an alternative for treatment of natural origin: a review. *CYTA-Journal of Food*, 6(2), 158-168.
- Tovar Jiménez, X., Arana Cuenca, A., Téllez Jurado, A., Abreu Corona, A., & Muro Urista, C. R. (2012). Traditional methods for whey protein isolation and concentration: effects on nutritional properties and biological activity. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56(4), 369-377.

Valencia D., Ramírez C. (2009). La industria de la leche y la contaminación del agua. *Ciencia y Cultura*, 16(73), 27-31.

Van de Weert, M., Hennink, W. E., & Jiskoot, W. (2000). Protein instability in poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles. *Pharmaceutical research*, 17(10), 1159-1167.

Vilaplana, M. (2007). Antioxidantes presentes en los alimentos: vitaminas, minerales y suplementos. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 26(10), 79-86.

Vioque, J., Predoche, J., Yust, M. M., Lqari, H., Megías, C., Girón-Calle, J., Alaiz M., & Millan, F. (2006). Peptídeos bioativos em proteínas vegetais de reserva. Rio de Janeiro, Brasil. *Brazilian Journal of Food Technology III JIPCA*, 1, 99-102.

Weinbreck, F., Bodnár, I., & Marco, M. L. (2010). Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *International journal of food microbiology*, 136(3), 364-367.

Xiao, Y., Xing, G., Rui, X., Li, W., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M. (2014). Enhancement of the antioxidant capacity of chickpeas by solid state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18. *Journal of Functional Foods*, 10, 210–222.

Zhang, J., Zhang, H., Wang, L., Guo, X., Wang, X., & Yao, H. (2009). Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: Identification of the active peptide. *European Food Research and Technology*, 229, 709–719

Zhang, Y., Kouguchi, T., Shimizu, K., Sato, M., Takahata, Y., & MORIMATSU, F. (2010). Chicken collagen hydrolysate reduces proinflammatory cytokine production in C57BL/6. KOR-ApoEshl mice. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 56(3), 208-210.

Zhou, D. Y., Zhu, B. W., Qiao, L., Wu, H. T., Li, D. M., Yang, J. F., & Murata, Y. (2012). In vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera. *Food and Bioproducts Processing*, 90(2), 148-154

ANEXOS

(Artículo publicado como resultado del proyecto de investigación)

MRS Advances © 2019 Materials Research Society
 DOI: 10.1557/adv.2019.33



Encapsulation of active fractions of whey proteins with antioxidant potential in pectin-collagen and pectin-gelatin microparticles

Jazmin Castillo Sanabria¹, Claudia Rosario Muro Urista^{1*}, Rosa Elena Ortega Aguilar¹, Javier Illescas¹, María del Carmen Díaz Nava¹, Guillermo Carbajal Franco¹

¹ *Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Toluca, División de Estudios de Postgrado e Investigación, México*

ABSTRACT

*The aim of the present research was to evaluate pectin-gelatin and pectin-collagen polymeric compounds as encapsulating and releasing matrices for whey active peptides with antioxidant properties. Active peptides were obtained by hydrolysis of whey proteins with thermolysin and proteinase enzymes from *B. subtilis*. The hydrolysates were fractioned and encapsulated in the pectin composite matrices to obtain particles loaded with active whey peptides. The composite particles were analysed by SEM and IR techniques. In addition, they were also tested under simulated gastric conditions to evaluate the encapsulation efficiency and delivering power of the composite materials. The results showed that both encapsulation particles were excellent supports, because they retained to-the peptides and maintained their antioxidant activity during the simulated gastric process (120 min). However, the pectin gelatin particles were digested faster than those of pectin-collagen. The peptides from-encapsulated in pectin-gelatin were released within this time, showing an increment in the-antioxidant activity. Peptides from gelatin protein were also released by the gastric enzymes, and thus also they contributed to the antioxidant activity; in addition to the whey peptides.*

1. INTRODUCTION

Since decades, many researchers have focused on the study of whey proteins and its-their derived peptides, because they are considered bioactive molecules with specific health benefits. Due to their functional and therapeutic properties, there are several reports in the literature on the activity of peptides in animal model systems, such as antihypertensive activity, immunomodulatory, antithrombotic and antibacterial

activity, which are of great interest to the pharmaceutical, food and cosmetic areas-industries [11].

In this perspective, bioactive peptides have mainly been incorporated as ingredients in functional foods, nutraceuticals, and they are currently also studied as pharmaceutical molecules to assist in the control and prevention of diseases [2]. However, serum molecules are considered complex substances, as they are susceptible to degradation and instability. In particular, it has been demonstrated, that when they are oral delivering, their instability is increased and they are degraded by the gastric enzymes; thus, these molecules reach the gastrointestinal tract without activity, and consequently, the effects in the body are null. Accordingly, various enhancements strategies have been studied as alternatives to increase their stability and oral bioavailability.

The encapsulation of active molecules is an option to retained activity in protective on systems to safeguard them from the gastric enzymes attack, control their release rate and ensure their benefits to health. The materials most widely studied for the release of active substances and the protection of unstable therapeutic agents are biopolymers; they are utilized either alone or combined [2, 3]. However, few studies have been carried out on their application in the encapsulation of whey molecules with biological activity [4, 5].

The objective of this work was to evaluate polymeric composite materials based on pectin-gelatine and pectin-collagen as encapsulation matrices for fractions with antioxidant activity obtained from whey protein hydrolysates, and their release in a simulated gastric environment.

2. EXPERIMENTAL DETAILS

2.1 Whey protein hydrolysis and fractionation of hydrolysate products

Bovine cheese whey was supplied by a dairy industry from Mexico. The whey samples were previously degreased and filtered. Samples of 250 mL of whey were concentrated by ultrafiltration processes (UF), to obtain whey protein concentrate (WPC). UF was performed by cross-flow polymeric membranes (15 kDa cut-off and 0.020 m² effective membrane areas). The inlet and outlet pressures were adjusted and controlled to 0.5 bar and 0.8 bar respectively, reducing the original sample volume in-by 80-85% [6]. The protein composition analysis of WPC was determined by Biuret colorimetric method.

WPC hydrolysates were obtained by two enzymatic processes using; thermolysin (70° C, pH 8) or proteinase enzyme from *B. subtilis* (50° C, at pH 7) at enzyme/substrate ratio of 0.003 % (w/v). Both hydrolysis processes were carried out in Erlenmeyer flasks under orbital stirring at 200 rpm, for hydrolysis times of 2, 4, 6 and 8 h to obtain hydrolysate products with different hydrolysis percentages (DH %). The proteolytic action was stopped by heating; the samples were then centrifuged and the supernatants were separated and identified as WPC hydrolysate products. The DH % was measured by quantifying the protein concentration in the supernatant sample before and after hydrolysis. Biuret method was utilized to measure the protein concentration in all cases.

The hydrolysate products were fractionated with a 3 kDa membrane to obtain the peptide fractions < 3 kDa. The antioxidant activity (AA) of the fractions was measured according ABTS^{•+} method. The AA results were expressed in VCEAC (antioxidant activity equivalent to ascorbic acid) as mg ascorbic acid per mL of sample. The Biuret and ABTS^{•+} methods are described in [7].

2.2 Encapsulation of whey peptide fractions

The fractions with the highest antioxidant activity were encapsulated in composite matrices of pectin-gelatine (PG) and pectin-collagen (PC) (0.1-0.5 % p/v). The fractions were dispersed in the composite matrices at a weight ratio of 15% v/v; the samples were dried by spraying dry, to obtain loaded solid particles in each case. The particles were identified as PG-T (from thermolysin), PG-P (from proteinase), PC-T (from thermolysin) and PC-P (from proteinase). These particles were characterized by SEM and FT-IR analysis.

2.3 Gastrointestinal digestion of encapsulated peptide fractions in simulate conditions

The loaded PG and PC particles were subjected to a digestion process, using simulated gastric fluid. The gastric fluid was prepared according the method reported by Altung et al. [8], with some modifications. The gastric fluid was prepared with 10 mL of aqueous solution at pH=2 and 0.06 mg/mL of pepsin enzyme. The weight of loaded particles in-added to the gastric fluids was 0.16 g. The digestion experiments were performed at a constant temperature of 37°C with agitation at 200 rpm for 120 min. After this time, the amount of released peptides was measured, by the Biuret method. The antioxidant activity of the released peptides was measured by the ABTS^{•+} method. Free (non-encapsulated) peptide fractions were utilized as sample controls.

RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Whey protein hydrolysis and fractionation of hydrolysate products

The proteolytic action of thermolysin and proteinase enzymes on WPC is represented in Fig. 1, showing the hydrolysis kinetic for each process. The kinetics of the proteolytic activity are described as the DH%, by quantifying of protein concentration in the supernatant over the 8 h of the hydrolysis procedure.

The data indicate that WPC hydrolysis by proteinase and thermolysin reached DH% values of 30 and 40% in 2 h, respectively. Afterwards, thermolysin produced gradual increment in DH% until a maximum hydrolysis of 97% was reached after 6 h. However, loss of activity of this enzyme was seen in the next hours. In contrast, proteinase produced linear increments of DH % reaching 75 and 87% after 6 and 8 h, respectively. These results indicated that both processes were adequate for WPC hydrolysis.

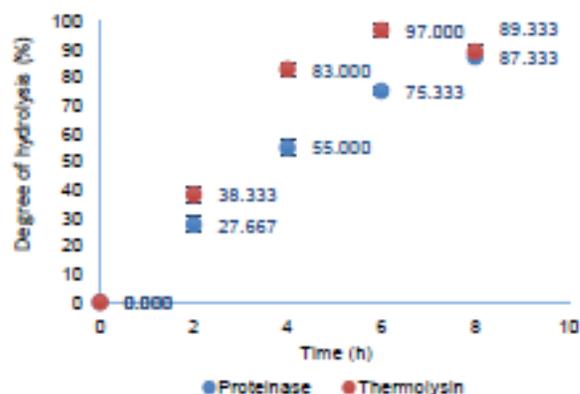


Figure 1. Degree of hydrolysis (DH%) of WPC obtained by two enzymatic processes

Regarding peptide fractionation, Table 1, provides the antioxidant activity (AA%) from the released peptides with a molecular size < 3 kDa for hydrolysis times of 2, 4, 6 and 8 h. Both enzymes produced peptide fractions with high antioxidant activities; but the maximum AA% value was observed for the peptide released after 6 h of hydrolysis. After this time, the AA decreased, indicating a loss of activity, possibly due to further degradation of the peptide fractions. On the basis of the above results, the 6 h hydrolysed products were used in the encapsulation procedure.

Table 1. Antioxidant activity (AA) from released peptides < 3 kDa in WPC hydrolysis with thermolysin and proteinase.

Enzyme	Proteinase		Thermolysin	
	DH%	AA%	DH%	AA%
Hydrolysis time				
0	0	18.93	0	18.93
2	30	25.78	40	17.97
4	53	23.17	84	42.34
6	71	29.27	96	50.14
8	90	29.39	88	37.49

3.2 Characteristics of loaded particles with whey peptide fractions

The appearance and composition of loaded particles PC-T, PC-P, PG-T and PG-P are showed in micrographs SEM images and FT-IR spectra. Micrographs corresponding to PC-T (a), PC-P (b), PG-T (c) and PG-P (d) are provided in Figure 2.

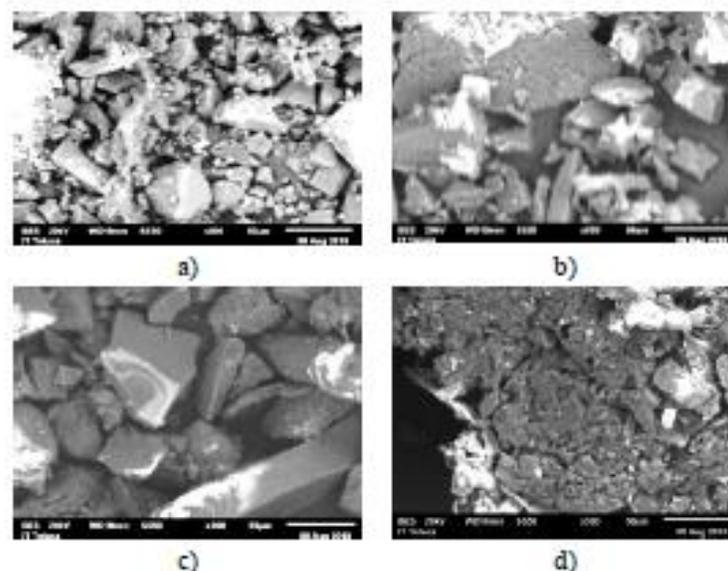


Figure 2. SEM images for loaded particles at 500X magnification. a) PC-T, b) PC-P, c) PG-T and d) PG-P.

The surface of the composite particles revealed the presence of whey peptides (as points or white deposits); a great contained in PC was notorious, revealing a partial homogenization of the mixtures of composite material and peptides. Whereas PG exhibited lower peptides content, attributing this event to complete mixture. This result was attributed to PG interaction with whey peptides, forming complex structures with possible increment of particle size or agglomerations.

IR spectra for the loaded particles are provided in Figure 3. The spectra show an overlap of most of the spectral bands due to the materials present in the loaded particles, namely gelatine, collagen and the peptides. The regions corresponding to secondary amine (3300 cm^{-1}), amide I (1640 cm^{-1}) and amide II (1540 cm^{-1}) show changes more visible in the spectra. The variations can be attributed to interactions between the peptides of the fractions and the encapsulation matrices [9].

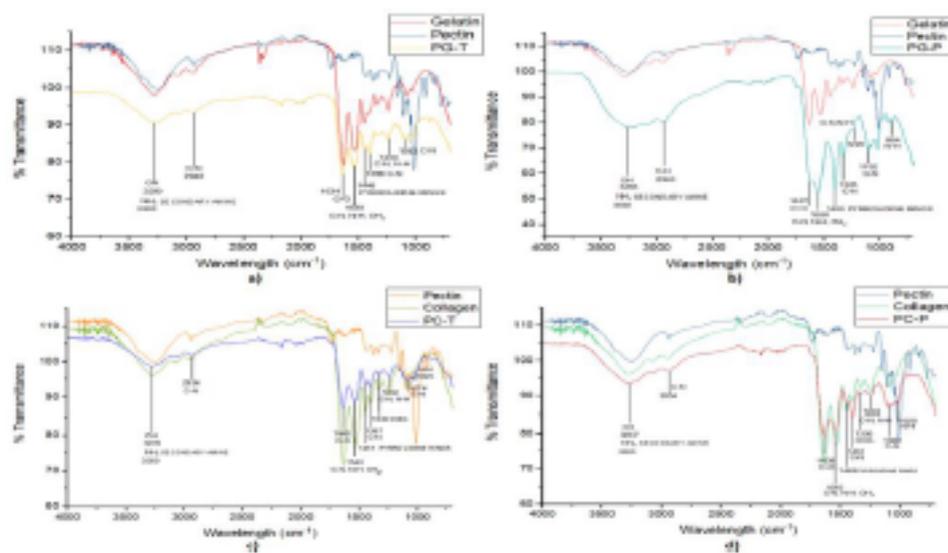


Figure 3. FT-IR spectra for the loaded particles with whey peptide fractions a) PG-T, b) PG-P, c) PC-T, d) PC-P.

3.3 Gastrointestinal digestion of encapsulated peptide fractions in simulate conditions

Data for the AA% of peptides released from undigested and digested loaded particles PC-T, PC-P, PG-T and PG-P are presented in Table 2. The AA% for the free peptides from thermolysin (FT) and from proteinase (FP) are also included, because these samples were utilized as trial-controls.

Table 2. AA% for peptides released from digested and undigested loaded particles and for free peptide controls.

Sample identification	AA% Undigested peptides	AA% Digested peptides
FT	50.14	29.67
FP	29.27	25.68
PC-T	44.79	42.81
PC-P	22.13	35.75
PG-T	50.49	54.32
PG-P	21.32	75.42

The data reported in Table 2 reveals that the antioxidant activity of the free peptides FP and FT was affected by digestive fluid, as expected, because the gastric enzymes degrade the peptides quickly. It is also clear that the composite PC and PG protected the peptides, because, the antioxidant activity from peptides released was maintained until the end of the-digestion. The increment of AA% from peptides PG-T, PG-P and PC-P was attributed to an additional contribution from the encapsulation materials, which were also digested by the gastric fluid.

CONCLUSIONS

The hydrolysis of WPC by thermolysin and proteinase enzymes reached the highest DH % during 6 h. Fractions < 3 kDa from WPC hydrolysates revealed the highest antioxidant activity; thus these fractions were encapsulated into composite materials of PC and PG to obtain loaded particles of antioxidant peptides from whey proteins.

SEM images revealed that the particles of PC showed the highest entrapment of peptides, whereas the particles of PG interacted possibly with the whey peptides.

The particles digestion revealed that free fractions were attacked by the gastric environment, releasing peptides with low antioxidant activity. On the contrary, it was observed, that the encapsulated peptides were released in controlled form. In addition, the released peptides showed an antioxidant activity very close to those of the free undigested fractions. Therefore the encapsulating materials PC and PG protected the active peptides fractions of the attack of gastric enzymes and aggressive pH. Also, some released fractions from PC and PG increased their activity with respect to the undigested free fractions. This last result was due to, the digestion of PC and PG released active peptides, adding more antioxidant activity to digested fractions of whey peptides.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Tecnológico Nacional de México for financial support (TECNM, projects 6354.17-P and 6834.18-P. Jazmin Castillo thanks at Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the Master's Degree scholarship awarded. Also thanks the Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología for the support for her participation in the XXVII International Material Research Congress.

REFERENCES

- [1] Muro Urista, C., Álvarez Fernández, R., Riera Rodríguez, F., Arana Cuenca, A., & Téllez Jurado, A. (2011). Production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International*, 17(4), 293-317.
- [2] Neira-Carrillo, A., Muñoz, D. Y., Zazzali, P. A., Marini, Y. A., Vilches, S. V., & Palma, R. E. (2013). Encapsulación de biomoléculas usando polímeros naturales: "un nuevo enfoque en la entrega de fármacos en medicina". *Avances en Ciencias Veterinarias*, 28(2), ág-31.
- [3] Pérez, Y. A., Urista, C. M., Martínez, J. I., Nava, M. D. C. D., & Rodríguez, F. A. R. (2016). Functionalized polymers for enhance oral bioavailability of sensitive molecules. *Polymers*, 8(6), 214.
- [4] Tamm, F., Härter, C., Brodtkorb, A., & Drusch, S. (2016). Functional and antioxidant properties of whey protein hydrolysate/pectin complexes in emulsions and spray-dried microcapsules. *LWT-Food Science and Technology*, 73, 524-527.
- [5] Rao, P. S., Bajaj, R. K., Mann, B., Arora, S., & Tomar, S. K. (2016). Encapsulation of antioxidant peptide enriched casein hydrolysate using maltodextrin-gum arabic blend. *Journal of food science and technology*, 53(10), 3834-3843.
- [6] Tovar Jimenez, X., Arana Cuenca, A., Tellez Jurado, A., Abreu Corona, A., & Muro Urista, C. R. (2012). Traditional methods for whey protein isolation and concentration: effects on nutritional properties and biological activity. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56(4), 369-377.
- [7] Alvarado, Y., Muro, C., Maciel, A., Álvarez, J., & Riera, F. (2018). Antihypertensive and antioxidant properties from whey Protein hydrolysates produced by encapsulated *Bacillus subtilis* Cells. *International Journal of Peptides Research and Therapeutics*, 1-9.
- [8] Altig, L., Hauschild, M., & Wenzel, H. (1997). Environmental assessment in product development. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 353(1728), 1373-1388.
- [9] Gómez-Mascaraque, L. G., Miralles, B., Recio, I., & López-Rubio, A. (2016). Microencapsulation of a whey protein hydrolysate within micro-hydrogels: Impact on