

# Efectos de la sal sobre la solubilidad y las propiedades emulsionantes de la caseína y sus hidrolizados trípticos

*Effect of salt on the solubility and emulsifying properties of casein and its tryptic hydrolysates*

VIEIRA CR, BIASUTTI EAB, CAPOBIANGO M, AFONSO WO, SILVESTRE MPC\*

Depto. de Alimentos/Fac. de Farmácia/UFMG- sala 3070-B3, Av. Antônio Carlos 6627- cep. 31270-901 – Belo Horizonte, MG, Brasil

\*Autor de contacto para correspondencia: (malice@farmacia.ufmg.br)

Tel.: + 55 (31) 3499-6928 ó 6919 – Fax: 3499-6988 ó 6730

## RESUMEN

En este trabajo se presentan los resultados de una investigación sobre los efectos de la adición de NaCl (0,02 mol/L) sobre algunas propiedades funcionales de la caseína (CA) y de sus hidrolizados trípticos (TH). Se determinaron la solubilidad, la capacidad emulsionante (CE), el índice de actividad emulsionante (IAE) y la estabilidad de la emulsión (EE) con dos valores de pH (4,0 y 5,0). Los resultados demostraron que el procedimiento era beneficioso para la solubilidad de CA y TH, siendo más intensa con pH 5,0 y 4,0, respectivamente. También se observó un efecto positivo de la adición de NaCl en CA y TH, con ambos valores de pH, consiguiéndose los mejores resultados con pH 5,0. La EE se vio ligeramente afectada por la presencia de sal, y sólo aumentó en algunas muestras de CA y TH. Por el contrario, los valores del IAE de la caseína se redujeron al añadir NaCl con pH 4,0 y 5,0, mientras que las de TH se vieron afectadas positivamente por este tratamiento con ambos valores de pH.

PALABRAS CLAVE: Caseína. Propiedades funcionales. Efecto de la sal. Hidrolizados trípticos.

## ABSTRACT

*This work reports an investigation about the effect of NaCl addition (0.02 mol/L) on some functional properties of casein (CA) and its tryptic hydrolysates (TH). The solubility, the emulsifying capacity (EC), the emulsifying activity index (EAI) and the emulsion stability (ES) were determined at two pH values (4.0 and 5.0). The results showed that this procedure was beneficial for the solubility of CA and TH, being more intense at pH 5.0 and 4.0, respectively. Also, a positive effect of NaCl addition was observed for CA and TH, at both pH values, and the best results for both samples were achieved at pH 5.0. The ES was slightly affected by the presence of salt and only for some samples of CA and TH it was increased. Contrarily, the EAI values of casein were reduced with the addition of NaCl at pH 4.0 and 5.0, while those of TH were positively affected by this treatment at both pH values.*

KEY WORDS: Casein. Functional properties. Salt effect. Tryptic hydrolysates.

Recepción: 22-V-2006

Aceptación: 04-VII-2006

## INTRODUCCIÓN

Últimamente, ha aumentado el interés en sustituir ingredientes artificiales por otros naturales, en parte debido al mayor grado de conocimiento de los consumidores. En este sentido, el uso de

## INTRODUCTION

The interest in replacing artificial ingredients by natural ones has been increasing lately due in part to the higher understanding of consumers. In this way, the use of proteins as functional agents

proteínas como agentes funcionales podría ser muy favorable para la industria alimentaria. Las proteínas son uno de los polímeros más importantes utilizados como ingredientes en emulsiones alimentarias, ya que tienen la propiedad de estabilizar las emulsiones<sup>1</sup>.

Varios trabajos han demostrado que las proteínas alimentarias, así como sus hidrolizados enzimáticos, pueden desempeñar un papel importante en la formación y estabilización de emulsiones<sup>2-8</sup>. Esto tiene gran importancia, ya que muchos alimentos naturales y procesados consisten en parte o en su totalidad de emulsiones o han estado en estado de emulsión en algún momento durante su producción<sup>1</sup>.

La capacidad de las proteínas para actuar como surfactantes y estabilizar emulsiones depende de su capacidad para absorber en las interfases, reducir en gran medida la tensión interfacial y formar una película cohesiva. Como todas las proteínas son anfifílicas, tienen tendencia a adsorber en las interfases<sup>9</sup>.

Es bien conocido que las sales pueden influir en la solubilidad y, por tanto, en las propiedades emulsionantes de las proteínas<sup>10</sup>. El proceso de precipitación por sales se debe probablemente a la unión de los cationes positivos a las cadenas con carga negativa del dominio hidrofílico de las proteínas, lo que ocasiona la minimización de la carga de las proteínas y el término de repulsión electrostática proteína-proteína<sup>11</sup>. El proceso de solubilización por sales se puede describir como la unión adicional de la sal al dominio hidrofílico de las proteínas, permitiendo la resolubilización al aumentar la carga de las proteínas, lo que ocasiona un término de repulsión electrostática proteína-proteína elevado.

Teniendo en cuenta el amplio uso de las sales en la industria alimentaria para mejorar la adsorción de agua y el sabor de diversos alimentos<sup>8</sup>, es importante investigar el efecto de este ingrediente en las propiedades funcionales y la solubilidad de las proteínas, especialmente la caseína, que tiene gran valor como materia desde el punto de vista de la industria alimentaria<sup>11</sup>.

En este sentido, se desarrolló este trabajo para verificar la acción del NaCl sobre la solubilidad y las propiedades emulsionantes de la caseína y sus hidrolizados tripticos, con pH 4,0 y 5,0.

could be very favorable to the food industries. Proteins are one of the most important biopolymers used as ingredients in food emulsions, since they have the ability to stabilize emulsions<sup>1</sup>.

Several works have been showing that food proteins, as well as their enzymatic hydrolysates, can have an important role in the formation and stabilization of emulsions<sup>2-8</sup>. This is of great relevance since many natural and processed foods consist either partly or wholly as emulsions or have been in an emulsified state at some time during their production<sup>1</sup>.

The ability of proteins to act as surfactants and stabilize emulsions depends upon their ability to adsorb at interfaces, greatly reduce the interfacial tension, and form a cohesive film. Since all proteins are amphiphilic, they show a tendency to adsorb at interfaces<sup>9</sup>.

It is well known that salts may influence the solubility and hence the emulsifying properties of proteins<sup>10</sup>. The salting-out process is most likely caused by binding of the positive cations to the negative charged side chains on the hydrophilic domain of proteins resulting in the minimization of protein charge and the protein-protein electrostatic repulsion term<sup>11</sup>. The salting-in process can be described as further salt binding by the protein's hydrophilic domain allowing resolubilization by increased protein charge, resulting in a large protein-protein electrostatic repulsion term.

Considering that salts have been extensively used in food industries to improve water adsorption as well as the flavor of several foods<sup>8</sup>, it is important to investigate the effect of this ingredient on the solubility and functional properties of proteins, especially casein, which has a great value as commodity from the point of view of food industry<sup>11</sup>.

In this way, this work was developed to verify the action of NaCl on the solubility and the emulsifying properties of casein and its tryptic hydrolysates, at pH 4.0 and 5.0.

## MATERIAL AND METHODS

### *Material*

The casein, the bovine serum albumin (BSA), the sodium dodecyl sulfate and the trypsin (bovine pancreas, XIII type, TPCCK treated) were

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material

La caseína, la albúmina de suero bovino (ASB), el dodecil sulfato sódico y la tripsina (páncreas bovino, tipo XIII, tratado con TPCK) se adquirieron a Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, EE. UU.). El filtro de papel procedía de Quanty (modelo JP42, Curitiba, PR, Brasil). El centrifugador procedía de Jouan (modelo Br4i, Francia). El liofilizador (modelo Freezone<sup>7</sup> 4.5) procedía de Labconco (Kansas City, MI, EE. UU.). El espectrofotómetro (UV-VIS) procedía de Cecil (modelo CE2041, Reino Unido). El mezclador procedía de Fisher (modelo 14057-5, Hayward, EE. UU.).

### Métodos

#### Hidrólisis trípica de la caseína

Mediante la técnica descrita anteriormente<sup>12</sup>, se solubilizó la caseína en una solución tampón (fosfato sódico 0,2 mol/L y ácido cítrico 0,1 mol/L), pH 8,0, hasta alcanzar una concentración proteínica de 5,0 g/100 mL. A continuación, se agregó tripsina solubilizada en el mismo tampón, hasta obtener una proporción de enzima:sustrato de 0,1%. La mezcla se mantuvo en un baño de agua a 37 °C, agitándose durante 5, 10, 15, 30 y 60 minutos, originando los hidrolizados T1, T2, T3, T4 y T5, respectivamente. En todos los ensayos, la reacción hidrolítica se interrumpió reduciendo el pH a 2,0, para lo que se utilizó ácido clorhídrico (HCl). Seguidamente, se liofilizaron los hidrolizados y se almacenaron a - 18 °C hasta su uso.

#### Preparación de la muestra

La caseína y sus hidrolizados trípticos se solubilizaron la caseína y sus hidrolizados tríp-ticos en una solución tampón (fosfato sódico 0,2 mol/L y ácido cítrico 0,1 mol/L), con pH 4,0 y 5,0, hasta conseguir una concentración de 0,1 g de proteína/100 mL de solución. Después de 30 min. en un baño de agua a 35 °C, las soluciones se centrifugaron a 6.500 g durante 10 min. y, a continuación, se filtraron a través del filtro

purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). The paper filter was from Quanty (JP42 model, Curitiba, PR, Brazil). The centrifuge was from Jouan (Br4i model, France). The freeze-dryer (Freezone<sup>7</sup> 4.5 model) was from Labconco (Kansas City, MI, USA). The spectrophotometer (UV-VIS) was from Cecil (CE2041 model, UK). The mixer was from Fisher (14057-5 model, Hayward, USA).

### Methods

#### Tryptic hydrolysis of casein

Using a technique described before<sup>12</sup>, the casein was solubilized in a buffer solution (0.2 mol/L sodium phosphate and 0.1 mol/L citric acid), pH 8.0, to a protein concentration of 5.0 g/100 mL. Then, the trypsin, solubilized in the same buffer, was added to obtain a 0.1% enzyme: substrate ratio. The mixture was held in a water bath at 37°C, with stirring for 5, 10, 15, 30 and 60 min, giving rise to hydrolysates T1, T2, T3, T4 and T5, respectively. In all assays, the hydrolytic reaction was stopped by reducing the pH to 2.0, using hydrochloric acid (HCl). The hydrolysates were then freeze-dried and stored at - 18°C until the moment of use.

#### Sample preparation

The casein and its tryptic hydrolysates were solubilized in a buffer solution (0.2 mol/L sodium phosphate and 0.1 mol/L citric acid), at pH 4.0 and 5.0, to a concentration of 0.1 g of protein/100 mL of solution. After 30 min in a water bath at 35°C, the solutions were centrifuged at 6,500 g for 10 min and then filtered through paper filter. The filtrates were stored at - 18°C until the moment of use.

#### Determination of solubility

The soluble protein content was determined following a traditional method<sup>13,14</sup>, using BSA as standard. Filtrate aliquots of 200 µL were used. The absorbance was read at 650 nm in a spectrophotometer and the solubility was calculated in terms of percentage of total nitrogen

de papel. La filtración se almacenó a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### Determinación de la solubilidad

Para determinar el contenido de proteína soluble se utilizó un método tradicional<sup>13,14</sup>, utilizando ASB como estándar. Se utilizaron alícuotas de filtrado de 200  $\mu\text{L}$ . La adsorbancia se leyó a 650 nm en un espectrofotómetro, y la solubilidad se calculó en términos de porcentaje de nitrógeno total expresada en g de proteína soluble por 100 mL de solución.

#### Determinación de la capacidad emulsionante (CE)

Para determinar la CE se utilizó un método basado en la medición de la inversión de emulsión<sup>15</sup>. Inicialmente, la temperatura del filtrado, preparado como se ha descrito en la parte de preparación de la muestra, se ajustó a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un baño de hielo. A continuación, se homogeneizaron 50 mL utilizando un mezclador a máxima velocidad. Se agregó aceite de maíz de manera continuada (25 mL/min.) hasta que se produjo la inversión de la emulsión, indicada mediante la interrupción de la corriente eléctrica detectada por una lámpara de 120 V. La CE se calculó mediante la ecuación 1:

$$(1) \quad CE = \frac{AE(g) - AB(g)}{\text{proteína}(mg)}$$

donde AE y AB son la cantidad de aceite emulsionado en la muestra y en el blanco, respectivamente. El blanco es la solución tampón sin agente emulsionante.

#### Determinación del índice de actividad emulsionante (IAE)

El IAE se determinó mediante un método espectrométrico<sup>16</sup>. Para preparar las emulsiones, después de ajustar la temperatura a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se agitaron juntos en el mismo mezclador mencionado anteriormente durante un minuto 30 mL del filtrado de la muestra y 10 mL de aceite de maíz. Los alícuotas (1 mL) de la emulsión se diluyeron (1/100) en una solución que contenía 0,1%

and expressed in g of soluble protein per 100 mL of solution

#### Determination of emulsifying capacity (EC)

A method based on the measurement of the emulsion inversion was used for determining the EC<sup>15</sup>. Initially, the temperature of the filtrate, prepared as described in the sample preparation item, was adjusted to  $10^{\circ}\text{C}$  in an ice bath. Then, fifty mL were homogenized using a mixer at the highest speed. Corn oil was added continuously (25 mL/min) until the inversion of the emulsion occurred, as indicated by the interruption of the electric current detected by a 120 V lamp. The EC was calculated using Eq. 1:

$$(1) \quad EC = \frac{EO(g) - BO(g)}{\text{protein}(mg)}$$

where EO and BO are the amount of emulsified oil in the sample and in the blank, respectively. Blank is the buffer solution with no emulsifying agent.

#### Determination of emulsifying activity index (EAI)

The EAI was determined by a spectrophotometric method<sup>16</sup>. For preparing the emulsions, after adjustment of the temperature to  $20^{\circ}\text{C}$ , a volume of 30 mL of the sample filtrate and 10 mL of corn oil were shaken together in the same mixer cited above, at the highest speed for one minute. Aliquots (1 mL) of the emulsion were diluted (1/100) in a solution containing 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate) and 0.1 M NaCl, homogenized and the absorbance was read at 550 nm. The EAI values were calculated using Eq. 2<sup>17</sup>:

$$(2) \quad EAI = \frac{2T}{(1-\theta) \cdot C}$$

where T is turbidity,  $\theta$  is the volume fraction of the oil, and C is the initial protein concentration (0.1 g /100 mL). The turbidity was calculated by multiplying the absorbance by 2.203 and by the dilution factor (100) and then dividing this result by the optical path length of the cuvette (0.01 m).

SDS (dodecil sulfato sódico) y 0,1 M NaCl, se homogeneizaron y se leyó la adsorbancia a 550 nm. Los valores del IAE se calcularon mediante la ecuación 2 <sup>17</sup>:

$$(2) \quad IAE = \frac{2 T}{(1 - \theta) \cdot C}$$

donde T es la turbidez,  $\theta$  es la fracción del volumen del aceite y C es la concentración de proteína inicial (0,1 g /100 mL). Para el cálculo de la turbidez se multiplicó la adsorbancia por 2,203 y por el factor de dilución (100) y, a continuación, se dividió este resultado por la longitud de la distancia óptica de la cubeta (0,01 m).

#### Determinación de la estabilidad de la emulsión (EE)

Para evaluar la EE se eligió la técnica del calor como agente acelerador para perturbar las emulsiones<sup>12</sup>. En primer lugar, las soluciones madre preparadas anteriormente se mantuvieron a 20 °C durante 24 h. Después de la agitación, se diluyeron los alícuotas 100 veces con 0,1% SDS y se midió la turbidez como se ha descrito anteriormente (IAE, 20 °C). Seguidamente, las emulsiones de 24 h se calentaron a 80 °C durante 30 min. Después de enfriar a temperatura ambiente y agitar los alícuotas, se volvió a medir la turbidez de la manera descrita anteriormente (IAE, 80 °C). El valor  $\Delta IAE\%$  se calculó mediante la ecuación 3:

$$(3) \quad \Delta EAI \% = \frac{(EAI \text{ max} - EAI \text{ min}) 100}{EAI \text{ máx.}}$$

donde IAE máx. es el valor máximo obtenido justo después de la formación de la emulsión e IAE mín. es el valor más bajo obtenido para los alícuotas después de 24 h de almacenamiento y calentamiento a 80 °C. Los valores del EE se calcularon mediante la ecuación 4:

$$(4) \quad EE = \frac{1}{\Delta IAE \%}$$

#### Evaluación de la adición de NaCl

Para este estudio, se añadió un volumen de NaCl 0,2 mol/L a la solución tampón (pH 4,0 y 5,0) para poder obtener una concentración de cloruro sódico de 0,02 mol/L. Teniendo en

#### Determination of the emulsion stability (ES)

The employment of heat as an accelerating agent for disrupting emulsions was the technique chosen for evaluating the ES <sup>12</sup>. First, the stock emulsions prepared above were held at 20°C for 24 h. After stirring, aliquots were diluted 100 times with 0.1% SDS and turbidity was measured as described above (EAI, 20°C). The 24 h - old emulsions were then heated at 80°C for 30 min. After the aliquots were cooled to room temperature and stirred, the turbidity was again measured as described above (EAI, 80°C). The  $\Delta EAI\%$  was calculated by the Eq. 3:

$$(3) \quad \Delta EAI \% = \frac{(EAI \text{ max} - EAI \text{ min}) 100}{EAI \text{ max}}$$

where EAI max is the maximum value obtained just after emulsion formation, and EAI min is the lowest value obtained for the aliquots after 24h-storage and 80°C heating. ES values were calculated using Eq. 4:

$$(4) \quad ES = \frac{1}{\Delta EAI \%}$$

#### Evaluation of NaCl addition

For this study, a volume of a 0.2 mol/L NaCl was added to the buffer solution (pH 4.0 and 5.0) in order to obtain a sodium chloride concentration of 0.02 mol/L. Considering the buffer used for preparing the samples, the total salt concentration corresponded to 0.44 mol/L. After that, the casein and its tryptic hydrolysates were treated as described above.

#### Statistical analysis

All experiments were replicated three times. The study of the effect of sodium chloride addition on the emulsifying properties and on solubility was analysed by split-split plot design (in which the main plots were hydrolysis times, the pH values the subplots and the presence or absence of salt the sub-subdivided plots). Analysis of variance for each property ( $p < 0.05$ ) and then the Duncan test was applied to compare means <sup>18</sup>.



cuenta el tampón utilizado para la preparación de las muestras, la concentración total de sal correspondía a 0,44 mol/L. Después, se trataron la caseína y sus hidrolizados trópticos de la forma descrita anteriormente.

#### Análisis estadístico

Todos los experimentos se reprodujeron tres veces. El análisis de los efectos de la adición de cloruro sódico sobre las propiedades emulsionantes y sobre la solubilidad se efectuó mediante un diseño de método de parcelas subdivididas (en el que las parcelas principales eran los tiempos de hidrolizado, los valores de pH eran las subparcelas y la presencia o ausencia de sal las parcelas sub-subdivididas). Para comparar las medias se aplicó el análisis de varianza de cada propiedad ( $p < 0,05$ ) y, a continuación, el test de Duncan<sup>18</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Efectos de la sal sobre la solubilidad*

Como muestra la Figura 1, la adición de NaCl aumentó la solubilidad de la caseína y sus hidrolizados trópticos con ambos valores de pH. En el caso de la proteína este efecto fue más importante con pH 5,0, mientras que en el de la mayoría de los hidrolizados esto ocurrió con pH 4,0. De hecho, es bien sabido que con poca fuerza iónica (0,5 M) el efecto beneficioso de la sal se asocia a la neutralización de las cargas de la superficie de las proteínas. Este tamizado de carga aumenta la solubilidad de las proteínas que contienen una baja incidencia de manchas apolares<sup>19</sup>.

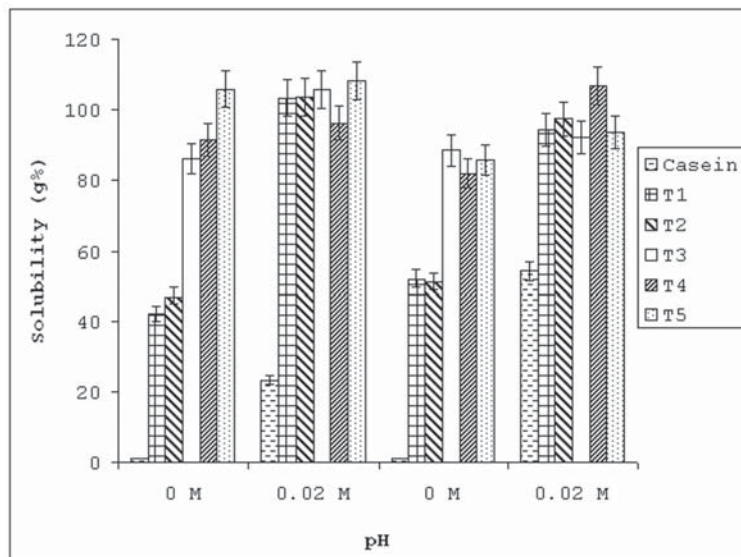
## RESULTS AND DISCUSSION

### *Effect of salt on the solubility*

As shown in Figure 1, the NaCl addition increased the solubility of casein and its tryptic hydrolysates at both pH values. For the protein, this effect was more prominent at pH 5.0 while for most of the hydrolysates this happened at pH 4.0. In fact, it is well known that at low ionic strength (0.5 M), the beneficial effect of salt is associated to the neutralization of charges at the surface of proteins. This charge screening increases the solubility of proteins that contain a low incidence of nonpolar patches<sup>19</sup>.

**FIGURE 1:** Efectos de la adición del NaCl (0.02 mol/L) en la solubilidad de la caseína y sus hidrolizados trópticos. T1, T2, T3, T4, T5: hidrolizados de la caseína obtenidos tras 5, 10, 15, 30 y 60 minutos de reacción, respectivamente. Cada valor representa la media de la determinación triples.  
 ± Error de estándar (barras verticales).

**FIGURE 1:** Effect of NaCl addition (0.02 mol/L) on the solubility of casein and its tryptic hydrolysates. T1, T2, T3, T4, T5: casein hydrolysates obtained after 5, 10, 15, 30 and 60 min of reaction, respectively. Each value represents the mean of triple determination. ± Standard error (vertical bars).



Otros autores también han evaluado la influencia de la adición de sal sobre la solubilidad de la caseína. En ellos, se ha comunicado un aumento de la solubilidad de la  $\beta$ -caseína en presencia de NaCl 0,1 M con pH 5,0, mientras que ocurrió lo contrario con pH 2,0 y 8,0<sup>20</sup>. Este procedimiento ha demostrado ser favorable para la solubilidad de la caseína en soluciones con un contenido de NaCl 0,15 M con pH 5,0 y 4,0<sup>8</sup>. Por el contrario, la misma sal en una concentración de 7,59 g/L no ha tenido ninguna influencia sobre la solubilidad del caseinato sódico con pH 4,0 ó 5,0<sup>21</sup>.

Nuestros datos para plasma y globina bovina, en contraposición a la caseína, indican que la adición de NaCl reduce la solubilidad de las proteínas con los dos valores de pH estudiados. No obstante, algunos de los parámetros empleados en estos estudios eran bastante distintos a los utilizados aquí. En estos casos, los valores de pH fueron 5,0 y 6,0 para el plasma y sólo 6,0 para la globina. Además, las concentraciones totales de sal fueron de 0,67 mol/L para la globina y 0,035 mol/L para plasma<sup>22,23</sup>.

Other authors also evaluated the influence of salt addition on the solubility of casein. Thus, an increase of the solubility of  $\beta$ -casein in the presence of 0.1M of NaCl at pH 5.0 was reported, while the opposite happened at pH 2.0 and 8.0<sup>20</sup>. This procedure was shown to be favourable to the solubility of casein in solutions containing 0.15 M de NaCl at pH 5.0 and 4.0<sup>8</sup>. Contrarily, this same salt in a concentration of 7.59 g/L had no influence on the solubility of sodium caseinate at pH 4.0 or 5.0<sup>21</sup>.

Our data for bovine globin and plasma, contrarily to casein, showed that the addition of NaCl reduced the solubility of proteins in the two studied pH values. However, some parameters employed in these studies were quite different from those used here. Thus, in these cases the pH values were 5.0 and 6.0 for plasma and only 6.0 for globin. Moreover, the total salt concentrations were 0.67 mol/L for globin and 0.035 mol/L for plasma<sup>22,23</sup>.

### Efectos del NaCl sobre la capacidad emulsio- nante

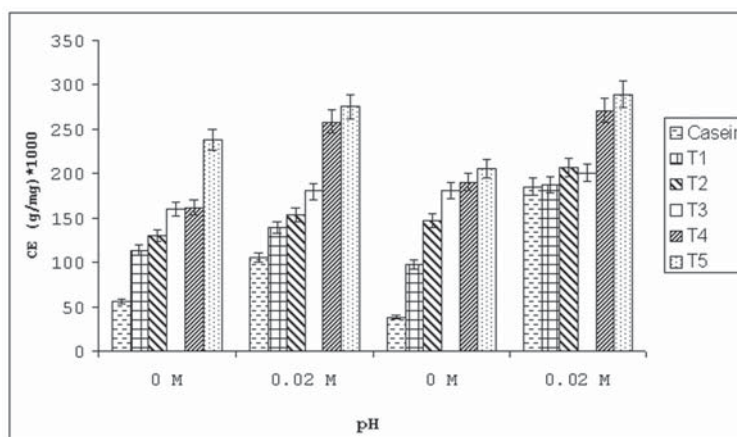
La adición de sal ha tenido un efecto positivo sobre la CE de la caseína y sus hidrolizados con ambos valores de pH (Figura 2), y en todas las muestras este efecto positivo fue superior con pH 5,0. Según la literatura<sup>4</sup>, la CE mide la capacidad de las proteínas para migrar a la interfase aceite-agua. Por tanto, como la adición de sal aumentaba la solubilidad, la caseína probablemente tenía una mayor facilidad para migrar, ocasionando un aumento de su CE.

### Effect of NaCl on the emulsifying capacity

The salt addition had a positive effect on the EC of casein and its hydrolysates at both pH values (Figure 2), and for all samples this benefit was higher at pH 5.0. According to the literature<sup>4</sup>, EC measures the protein capacity to migrate to the oil-water interface. Therefore, as the addition of salt enhanced the solubility, the casein probably showed greater facility to migrate leading to an increase of its EC.

**FIGURA 2:** Efectos de la adición de NaCl (0,02 mol/L) sobre la capacidad emulsionante (CE) de la caseína y sus hidrolizados trópticos. T1, T2, T3, T4, T5: hidrolizados de caseína obtenidos tras 5, 10, 15, 30 y 60 min. de reacción, respectivamente. Cada valor representa la media de la determinación triple.  $\pm$  error estándar (barras verticales).

**FIGURE 2:** Effect of NaCl addition (0.02 mol/L) on the Emulsifying Capacity (EC) of casein and its tryptic hydrolysates. T1, T2, T3, T4, T5: casein hydrolysates obtained after 5, 10, 15, 30 and 60 min of reaction, respectively. Each value represents the mean of triple determination.  $\pm$  Standard error (vertical bars).



Se han encontrado en la literatura otros datos relativos al efecto de la sal en la CE de la caseína. En ellos, aumentar la fuerza iónica de 0,05 a 0,3 utilizando KCl suponía una ventaja para la CE del caseinato potásico con pH ácido o próximo a la zona neutra<sup>24</sup>. La CE del caseinato sódico (pH 7,0) aumentó tras la adición de NaCl hasta 1000 mM, mientras que la de la caseína ácida (pH 2,5) presentó el mismo comportamiento sólo hasta 5 mM<sup>25</sup>. En otro artículo<sup>26</sup>, la CE del caseinato sódico, con pH 7,0, se redujo al aumentar la fuerza iónica de la solución de 0,1 a 0,2.

En el caso de la globina bovina<sup>22</sup> y el plasma<sup>23</sup>, se observó una disminución de la CE tras añadir sal con el pH estudiado, como ha descrito nuestro grupo.

Some other data were found in the literature concerning the effect of salt on the EC of casein. Thus, increasing the ionic strength from 0.05 to 0.3 using KCl was advantageous to the EC of potassium caseinate at acid pH or near neutral region<sup>24</sup>. The EC of sodium caseinate (pH 7.0) increased after the addition of NaCl up to 1000 mM, while that of acid casein (pH 2.5) showed the same behavior only up to 5 mM<sup>25</sup>. In another report<sup>26</sup>, the EC of sodium caseinate, at pH 7.0, was reduced when the ionic force of the solution increased from 0.1 to 0.2.

In the case bovine globin<sup>22</sup> and plasma<sup>23</sup>, a decrease of EC was observed after salt addition at the pH studied, as described by our group.



*Efectos de la sal sobre el índice de actividad emulsionante (IAE)*

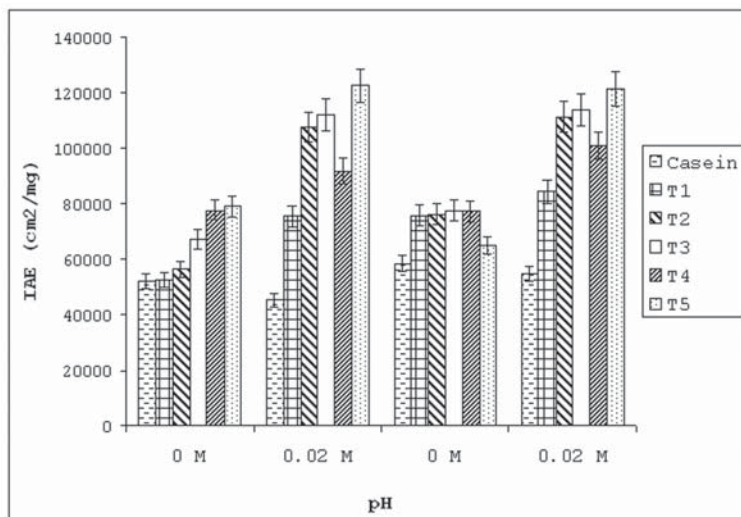
En contraposición a lo que ocurre con la solubilidad y la CE, la adición de sal redujo el IAE de la caseína con ambos valores de pH estudiados (Figura 3). Este resultado negativo se puede explicar, al menos en parte, por el hecho de que el IAE mide la capacidad de las proteínas para permanecer en la interfase agua/aceite tras la formación de la emulsión, y la adición de sal podría aumentar el paso de proteína de esa interfase a la fase acuosa, disminuyendo por tanto el IAE<sup>4</sup>. Por otra parte, para los hidrolizados trópticos los resultados fueron los mismos que los observados para el resto de las propiedades, es decir, se produjo un aumento del IAE en presencia de NaCl con ambos valores de pH.

*Effect of salt on the emulsifying activity index (EAI)*

Contrarily to the solubility and EC, the salt addition decreased the EAI of casein at both pH studied (Figure 3). This negative result could be explained, at least in part, by the fact that EAI measures the capacity of protein to remain in water/oil interface after the emulsion formation, and the salt addition could increase the passage of protein from that interface to the water phase, thus decreasing the EAI<sup>4</sup>. On the other hand, for the tryptic hydrolysates the results were the same as those observed for the other properties, *i.e.*, an increase of EAI occurred after in the presence of NaCl at both pH values.

**FIGURA 3:** Efectos de la adición de NaCl (0,02 mol/L) sobre el índice de actividad emulsionante (IAE) de la caseína y sus hidrolizados trópticos. T1, T2, T3, T4, T5: hidrolizados de caseína obtenidos tras 5, 10, 15, 30 y 60 min. de reacción, respectivamente. Cada valor representa la media de la determinación triple. ± error estándar (barras verticales).

**FIGURE 3:** Effect of NaCl addition (0.02 mol/L) on the Emulsifying Activity Index (EAI) of casein and its tryptic hydrolysates. T1, T2, T3, T4, T5: casein hydrolysates obtained after 5, 10, 15, 30 and 60 min of reaction, respectively. Each value represents the mean of triple determination. ± Standard error (vertical bars).



La influencia de la sal en el IAE de la caseína también ha sido investigada por otros autores. En esos estudios, se observó que la adición de NaCl 1M apenas incrementó el IAE de la caseína con pH 6,5 y 8,0<sup>16</sup>. En algunos estudios con caseína ácida extrudida, caseína extraída de la nata de la leche y caseinato sódico, se observó que su IAE se reducía cuando la fuerza iónica pasaba de 0,05 a 0,3, pero no se indicaba el pH utilizado<sup>26</sup>.

The influence of salt on the EAI of casein was also investigated by other authors. Thus, it was shown that the addition of 1M NaCl barely increased the EAI of casein at pH 6.5 and 8.0<sup>16</sup>. Working with acid extruded casein, casein extracted from skim milk and sodium caseinate, some studies showed that their EAI reduced when the ionic force passed from 0.05 to 0.3, but the pH of this study was not indicated<sup>26</sup>.

Este tratamiento, como demuestra nuestro grupo, ha provocado una considerable reducción del IAE de la globina y el plasma con pH 6.0. Sin embargo, con pH 5,0 la adición de sal aumentó el IAE del plasma<sup>22,23</sup>.

#### *Efectos de la sal sobre la estabilidad de la emulsión*

Como se muestra en la Figura 4, los efectos de la sal en la caseína sólo se observaron con pH 5,0, con el que se produjo un ligero aumento de la EE, y con pH 4.0 la EE se mantuvo inalterada después de añadir NaCl. En los hidrolizados tripticos, la acción beneficiosa de la sal se observó en tan sólo algunas muestras, mientras que en la mayoría la EE no se vio afectada por este tratamiento.

This treatment, as shown by our group, caused a considerable reduction of EAI of globin and plasma at pH 6.0. However, at pH 5.0 the salt addition increased the EAI of plasma<sup>22,23</sup>.

#### *Effect of salt on the emulsion stability*

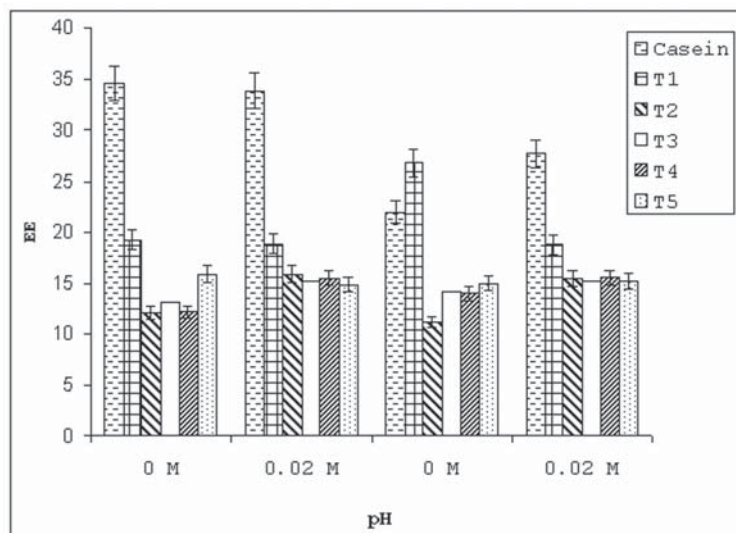
As shown in Figure 4, the effect of salt for casein was just observed at pH 5.0, where a small increase of ES occurred, and at pH 4.0 the ES kept unaltered after NaCl addition. For the tryptic hydrolysates the beneficial action of salt was observed for just few samples, while for most of them the ES was not affected by this treatment.

**FIGURA 4:** Efectos de la adición de NaCl (0,02 mol/L) sobre la estabilidad emulsionante (EE) de la caseína y sus hidrolizados tripticos. T1, T2, T3, T4, T5: hidrolizados de caseína obtenidos tras 5, 10, 15, 30 y 60 min. de reacción, respectivamente. Cada valor representa la media de la determinación triple.

± error estándar (barras verticales).  $EE = 1/\Delta IAE\% \times 10^3$

**FIGURE 4:** Effect of NaCl addition (0.02 mol/L) on the Emulsifying Stability (ES) of casein and its tryptic hydrolysates. T1, T2, T3, T4, T5: casein hydrolysates obtained after 5, 10, 15, 30 and 60 min of reaction, respectively. Each value represents the mean of triple determination.

± Standard error (vertical bars).  $ES = 1/\Delta EAI\% \times 10^3$



Nuestros estudios anteriores muestran resultados similares para la globina con pH 6,0<sup>23</sup> y para el plasma con pH 5,0 y 6,0, ya que el NaCl no tuvo ningún efecto en su EE.

Según la literatura, la adición de sal puede reducir la estabilidad de las emulsiones de agua/

Our previous studies showed similar results for globin at pH 6.0<sup>23</sup> and for plasma at pH 5.0 and 6.0, since NaCl had no effect on their ES.

According to the literature, salt addition may reduce the stability of water/oil emulsions due to the two-layer deposition of ions that decreases

aceite debido a la deposición en dos capas de los iones, lo que reduce las fuerzas de repulsión entre las gotitas de grasa<sup>1,27</sup>. Considerando que esto no se ha observado en nuestros estudios, se puede sugerir que la concentración de sal utilizada en estos estudios no era suficiente para producir este efecto negativo.

En algunos otros estudios, la adición de sal demostró ser ventajosa para la estabilidad de las emulsiones formadas por caseína. En ellos, efectuados con caseinato potásico, se observó que las emulsiones eran más estables tras la adición de KCl ( $\mu= 0,3$ ) a las soluciones que en ausencia de sal<sup>24</sup>. Además, la adición de NaCl en concentraciones superiores a 0,1 M aumentó la estabilidad de las emulsiones de caseína con pH 6,5<sup>16</sup>. De la misma forma, cuando la fuerza iónica pasó de 0,05 a 0,3 se observó un aumento de la estabilidad de las emulsiones formadas por caseína ácida extrudida, caseína extraída de la nata de la leche y caseinato sódico<sup>26</sup>.

Por último, se puede concluir que, en general, la adición de NaCl fue ventajosa para las propiedades funcionales de la caseína estudiadas (CA) y sus hidrolizados tripticos (TH). Este procedimiento incrementó la solubilidad y la CE de todas las muestras de CA y TH con pH 4,0 y 5,0 y la EE de algunas muestras. Los valores de IAE del TH también se vieron positivamente afectados y el único efecto negativo observado fue en el IAE de la caseína.

## RECONOCIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a CNPq y FAPEMIG, de Brasil, por su apoyo en este trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

01. McClements D. Food emulsions – Principles, Practice and Techniques. New York: CRC Press LCC (1999).
02. Britten M, Giroux HJ, Jean Y and Rodrigue N. Composite blends from heat. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1994; 40: 263-73.
03. Jost R. Functional characteristics of dairy proteins. *Trends in Food Science Tecnology* 1993; 4: 283-88.
04. Mangino ME. Protein interactions in emulsions: protein-lipid interactions. In Hettiarachchy, N.S. and Ziegler, G.R. (Ed.). *Protein functionality in food systems*. New York: Marcel Dekker (1994).
05. Murad AL, Gomes JC, Coelho DT and Sant`Anna R. Desenvolvimento e caracterização química e funcional de um isolado protéico de soja modificado. *Arquivos de Biologia y Tecnologia* 1993; 36: 695-707.
06. Orban E, Casini I, Caproni R and Quaglia GB. Caratteristiche funzionali-tecnologiche di un sottoprodotto da siero di latte ovino. *Il Latte* 1993; 35: 92-3.
07. Shimidt K and McNeil V. Effects of heat treatments on the functional properties of caseinate and whey protein isolate solutions. *Milkwissenschaft* 1993; 48: 3-6.

the repulsion forces among fat droplets<sup>1,27</sup>. Considering that this was not observed in our studies, one can suggest that the salt concentration used in these studies were not sufficient to produce this negative effect.

In some other studies, the salt addition showed to be advantageous to the stability of emulsions formed by casein. Thus, working with potassium caseinate, it was reported that the emulsions were more stable after KCl addition ( $\mu= 0.3$ ) to the solutions than in the absence of salt<sup>24</sup>. Also, the addition of NaCl higher than 0.1M increased the stability of casein emulsions at pH 6.5<sup>16</sup>. In the same way, when the ionic force passed from 0.05 to 0.3, it was observed an increase of the stability of the emulsions formed by acid extruded casein, casein extracted from skim milk and sodium caseinate<sup>26</sup>.

Finally, one can conclude that, in general, the addition of NaCl was advantageous for the studied functional properties of casein (CA) and its tryptic hydrolysates (TH). This procedure increased the solubility and EC of all samples of CA and TH at pH 4.0 and 5.0 and the ES of some samples. The EAI values of TH were also positively affected and the only negative effect observed was for the EAI of casein.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CNPq and FAPEMIG, in Brazil, for the support of this work.

08. Van Hekken DL and Strange ED. Functional properties of dephosphorilated bovine whole casein. *Journal of Dairy Science* 1993; 76: 3384-91.
09. Damoradan S. Structure-function relationship of food proteins. In: Hettiarachchy SN and Ziegler GR. *Protein functionality in food systems*. New York: Marcel Dekker (1994).
10. Cheftel JC, Cuq JL and Lorient D. *Proteinas Alimentarias*. Zaragoza: Editorial Acibia S.A. (1989).
11. Kumosinski TF and Farrell HM. Solubility of proteins: protein-salt-water interactions. In: Hettiarachchy, S.N. and Ziegler, G. R. (Ed). *Protein functionality in food systems*. New York: Marcel Dekker (1994).
12. Chobert JM, Bertrand-Harb C and Nicolas MG. Soluble and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1988; 36: 883-92.
13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951; 193: 265-75.
14. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anlytical Biocheistry* 1972; 45: 422-27.
15. Vuilleumard JC, Gauthier SF, Richard JP and Paquin P. Development of a method for the measurement of the maximum value of emulsifying capacity of milk proteins. *Milchwissenschaft* 1990; 45: 572-75.
16. Pearce KN and Kinsella JE. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1978; 26: 716-23.
17. Cameron DR, Weber ME, Idziak ES, Neufeld RJ and Cooper DG. Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: correction of the formula for emulsifying activity index. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1991; 39: 655-59.
18. Pimentel-Gomes F. *Curso de estatística experimental*. Piracicaba: Nobel (2000).
19. Damoradan S. Amino acids, peptides and proteins. In: Fenema O.R. *Food Chemistry*. New York: Marcel Dekker (1996).
20. Cayot P, Courthaudon JL and Lorient D. Emulsifying properties of pure and mixed  $\alpha_1$  and  $\beta$ -casein fractions: effects of chemical glycosylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1991; 39: 1369-73.
21. Foley J and O'Connell C. Comparative emulsifying properties of sodium caseinate and whey protein isolate in 18% oil in aqueous systems. *Journal of Dairy Research* 1990; 57: 377-91.
22. Silva JG, Morais HA, Silvestre MPC. Comparative study of the functional properties of bovine globin isolates and sodium caseinate. *Food Research International* 2003; 36 (1): 73-80.
23. Silva VDM and Silvestre MPC. Functional properties of bovine plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *Food Science and Technology* 2003; 37(6): 709-18.
24. Pearson AM, Spooner ME, Hegarty GR and Bratzler LJ. The emulsifying capacity and stability of soy sodium proteinate, potassium caseinate, and nonfat dry milk. *Food Technology* 1965; 1841: 103-7.
25. Mohanty B, Mulvihill DM and Fox PF. Emulsifying and foaming properties of acidic caseins and sodium caseinate. *Food Chemistry* 1988; 28: 17-30.
26. Barrachio VL, Van de Voort, FR. Sodium caseinate from skim milk powder by extrusion processing: physicochemical and functional properties. *J. Food Sci.* 1991; 56: 1552-56.
26. Klemaszewski JL, Das KP and Kinsella JE. Formation and coalescence stability of emulsions stabilized by different milk proteins. *Journal Food* 1992; 57: 366-71.
27. Das KP and Kinsella JE. Stability of food emulsions: physicochemical role of protein and non protein emulsifiers. *Advanced in Food and Nutrition Research* 1990; 34:81-129.