



# UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA

## DISEÑO Y ESTABILIZACIÓN DE LÍPIDOS FUNCIONALES

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

**TESIS DOCTORAL**

**2021**

**MARTA PADIAL DOMÍNGUEZ**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Marta Padial Domínguez  
ISBN: 978-84-1306-850-3  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/68160>



El doctorando / The *doctoral candidate* [ **Marta M<sup>a</sup> Padial Domínguez** ] y los directores de la tesis / and the thesis supervisor/s: [ **Dra. Emilia M<sup>a</sup> Guadix Escobar y Dr. Francisco Javier Espejo Carpio** ]

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

/

*Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor/s and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.*

Lugar y fecha / Place and date:

Granada, 15 de Marzo de 2021

Director/es de la Tesis / *Thesis supervisor/s*;

Doctorando / *Doctoral candidate*:

Firma / Signed

Firma / Signed



## **AGRADECIMIENTOS**

*Quisiera dedicar esta tesis doctoral a mis hijos Marta y Alfonso, el motor más potente de mi vida y mi tesoro más preciado. Os quiero muchísimo. También a Pochi, la persona que me complementa y siempre está ahí, gracias.*

*Gracias a Dios he llegado hasta aquí.*

*Mi reconocimiento y agradecimiento a la doctora Emilia María Guadix Escobar por la oportunidad que me ha brindado para iniciarme en la investigación y por su orientación y apoyo durante este tiempo. Gracias a ella comenzó esta “aventura”.*

*Mi profundo agradecimiento al doctor Javier Espejo Carpio porque ha sido mucho más que un director. Gran compañero, amigo y “sufridor” junto a mí de esta tesis doctoral. Gracias por sus ánimos, apoyo y colaboración.*

*Quisiera agradecer también a los doctores Pedro J. García Moreno y Charlotte Jacobsen su inestimable colaboración en la cuantificación e identificación de productos de oxidación secundarios volátiles. Agradecer también al doctor Raúl Pérez Gálvez su apoyo constante, sus consejos y su valiosa colaboración en una de las publicaciones derivadas de esta tesis doctoral. Gracias de corazón a los tres.*

*No puedo olvidarme de mis compañeros de laboratorio con los que comencé, que ya no forman parte de él, y de los que aún continúan. Gracias por sus ánimos y apoyo en los momentos más tensos. Especialmente gracias a Fernando. Con él ha sido todo este proceso más fácil, ameno y divertido.*

*Gracias a mis amigos que han estado al pie del cañón dando fuerza y ánimo.*

*Gracias también, a los que me lo han puesto difícil porque por ellos ahora siento que puedo conseguir cualquier cosa por complicada que sea.*

*Por último, quisiera agradecer el apoyo constante que me han brindado Antonio, Ángela, Noemí y Lucía.*



# ÍNDICE



ÍNDICE.....	7
1. RESUMEN.....	15
2. INTRODUCCIÓN.....	23
2.1. Ácidos grasos.....	25
2.2. Acilglicéridos .....	31
2.3. Fosfolípidos .....	33
2.4. Esfingolípidos.....	34
2.5. Glucolípidos .....	35
2.6. Policéticos.....	36
2.7. Esteroles .....	36
2.8. Isoprenoides.....	38
3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS .....	39
3.1. Ingesta de lípidos .....	41
3.1.1. Recomendaciones nutricionales sobre ingesta de lípidos.....	41
3.1.2. Fuentes de ácidos grasos Omega-6 y Omega-3.....	47
3.1.2.1. Principales fuentes de ácidos grasos Omega-6 .....	47
3.1.2.2. Principales fuentes de ácidos grasos Omega-3 .....	48
3.1.3. Lípidos funcionales y diseño de productos.....	51
3.2. Estabilidad oxidativa de los AGPI Omega-3.....	56
3.2.1. Antioxidantes.....	58
3.2.1.1. Antioxidantes sintéticos .....	60
3.2.1.2. Antioxidantes de origen natural .....	62
3.2.2. Técnicas de estabilización de AGPI Omega-3 .....	74
3.2.2.1. Adición directa de antioxidantes .....	74
3.2.2.2. Procesos de emulsionado .....	78
3.2.2.3. Procesos de microencapsulación .....	83
3.2.2.3.1. Técnicas electrodinámicas .....	84

3.2.2.3.2.	Coacervación compleja.....	85
3.2.2.3.3.	Secado por atomización .....	86
4.	OBJETIVOS .....	91
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	95
5.1.	Materiales .....	97
5.1.1.	Sustratos proteicos.....	97
5.1.2.	Enzimas .....	98
5.1.3.	Aceite.....	99
5.2.	Metodología.....	99
5.2.1.	Hidrólisis enzimática de sustratos proteicos.....	99
5.2.2.	Caracterización de hidrolizados.....	101
5.2.2.1.	Determinación de las propiedades emulsificantes .....	101
5.2.2.2.	Análisis de las propiedades antioxidantes.....	102
5.2.2.2.1.	Determinación de la actividad inhibidora de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	102
5.2.2.2.2.	Determinación de poder reductor de Fe <sup>3+</sup> .....	103
5.2.2.2.3.	Determinación de la actividad quelante de Fe <sup>2+</sup> .....	103
5.2.2.3.	Determinación del perfil de aminoácidos.....	104
5.2.2.4.	Distribución de tamaño molecular .....	105
5.2.3.	Emulsionado .....	105
5.2.4.	Determinación de las propiedades físicas de las emulsiones .....	106
5.2.4.1.	Potencial zeta.....	106
5.2.4.2.	Determinación del tamaño de gota de las emulsiones.....	106
5.2.4.3.	Test de creaming y caracterización cualitativa de la estructura .....	107
5.2.5.	Evaluación de la estabilidad oxidativa de las emulsiones .....	107
5.2.5.1.	Determinación del contenido de peróxidos (PV) de las emulsiones	107
5.2.5.2.	Determinación del índice de anisidina (AI) de las emulsiones .....	108

5.2.5.3.	Cuantificación e identificación de productos de oxidación secundarios volátiles (Dynamic Headspace GC-MS) .....	108
5.2.6.	Microencapsulación mediante secado por atomización .....	109
5.2.7.	Caracterización física de los microencapsulados .....	110
5.2.7.1.	Humedad .....	110
5.2.7.2.	Actividad de agua.....	110
5.2.7.3.	Eficiencia de microencapsulación (EM) .....	111
5.2.7.4.	Distribución del tamaño de emulsión reconstituida .....	111
5.2.8.	Evaluación de la estabilidad oxidativa de los microencapsulados .....	111
5.2.9.	Análisis estadístico .....	112
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	113
6.1.	Obtención de hidrolizados de proteínas alimentarias con actividad emulsificante y antioxidante.....	115
6.1.1.	Objetivos y tareas .....	115
6.1.2.	Procedimiento experimental.....	115
6.1.2.1.	Hidrólisis enzimática.....	116
6.1.2.2.	Evaluación de las propiedades emulsificantes de los hidrolizados. 116	
6.1.2.2.1.	Determinación de la actividad y estabilidad emulsificante.....	116
6.1.2.2.2.	Modelo estadístico y optimización de las propiedades emulsificantes .....	116
6.1.2.2.3.	Producción de la emulsión estabilizada con el hidrolizado con mejor capacidad emulsificante .....	119
6.1.2.2.4.	Estudio de estabilidad física y oxidativa de la emulsión estabilizada con el hidrolizado con mejor capacidad emulsificante.....	120
6.1.2.2.4.1.	Evaluación de la estabilidad física.....	120
6.1.2.2.4.1.1.	Potencial zeta.....	120
6.1.2.2.4.1.2.	Distribución del tamaño de gota.....	120
6.1.2.2.4.2.	Evaluación de la estabilidad oxidativa.....	121

6.1.2.2.4.2.1. Determinación del contenido de peróxidos (PV) y del índice de anisidina (AI) de las emulsiones.....	121
6.1.2.2.4.2.2. Valor de oxidación total (TOTOX) .....	121
6.1.2.3. Análisis de la capacidad antioxidante de los hidrolizados .....	121
6.1.3. Resultados y discusión .....	121
6.1.3.1. Estudio de las propiedades emulsificantes .....	122
6.1.3.2. Optimización de las propiedades emulsificantes .....	128
6.1.3.3. Estudio de estabilidad física y oxidativa de la emulsión estabilizada con el hidrolizado con capacidad emulsificante óptima .....	133
6.1.3.3.1. Estabilidad física de la emulsión.....	134
6.1.3.3.2. Estabilidad oxidativa de la emulsión .....	139
6.1.3.4. Estudio de las propiedades antioxidantes.....	143
6.1.3.4.1. Actividad inhibidora de radicales libres .....	143
6.1.3.4.2. Poder reductor de Fe <sup>3+</sup> .....	146
6.1.3.4.3. Poder quelante de Fe <sup>2+</sup> .....	148
6.1.3.5. Selección de los hidrolizados con mejor capacidad emulsificante y antioxidante .....	150
6.1.3.5.1. Hidrolizados procedentes de concentrado de proteína de lactosuero.....	150
6.1.3.5.2. Hidrolizados procedentes de aislado de proteína de soja.....	152
6.1.3.5.3. Hidrolizados procedentes de proteína de bacaladilla de descarte.....	153
6.1.4. Conclusiones.....	154
6.2. Estudio de la estabilidad física y oxidativa de emulsiones de aceites ricos en ácidos grasos Omega-3 con hidrolizados de proteínas alimentarias .....	157
6.2.1. Objetivos y tareas .....	157
6.2.2. Procedimiento experimental.....	157
6.2.2.1. Determinación del perfil de aminoácidos, tamaño molecular y análisis proximal de WPH10, SPH2 y BPH4.....	157

6.2.2.2.	Producción de las emulsiones .....	158
6.2.2.3.	Caracterización física de las emulsiones .....	159
6.2.2.3.1.	Potencial zeta .....	159
6.2.2.3.2.	Distribución del tamaño de partícula .....	159
6.2.2.3.3.	Test de creaming y caracterización cualitativa de la estructura de las emulsiones.....	159
6.2.2.4.	Estabilidad oxidativa de las emulsiones.....	160
6.2.2.4.1.	Determinación del valor de peróxidos (PV) e índice de anisidina (AV).....	160
6.2.2.4.2.	Cuantificación e identificación de productos de oxidación secundarios volátiles (Dynamic Headspace GC-MS) .....	160
6.2.3.	Resultados y discusión .....	160
6.2.3.1.	Análisis proximal, perfil de aminoácidos y tamaño molecular de los hidrolizados .....	160
6.2.3.2.	Caracterización y estabilidad física de las emulsiones de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 .....	164
6.2.3.3.	Estabilidad oxidativa de las emulsiones de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 .....	169
6.2.3.3.1.	Determinación del contenido en peróxidos (PV).....	169
6.2.3.3.2.	Productos de oxidación secundaria.....	171
6.2.4.	Conclusiones.....	177
6.3.	Microencapsulación de emulsiones de aceites ricos en ácidos grasos Omega-3 estabilizadas con hidrolizados de proteínas alimentarias mediante secado por atomización.....	179
6.3.1.	Objetivos y tareas .....	179
6.3.2.	Procedimiento experimental.....	179
6.3.2.1.	Producción de microencapsulados .....	179
6.3.2.2.	Caracterización de los microencapsulados.....	181
6.3.2.3.	Estabilidad oxidativa.....	181

6.3.3.	Resultados y discusión .....	181
6.3.3.1.	Caracterización de los microencapsulados.....	182
6.3.3.1.1.	Contenido en humedad y actividad de agua .....	182
6.3.3.1.2.	Análisis del tamaño de emulsión reconstituida.....	183
6.3.3.1.3.	Eficiencia de encapsulación y grasa superficial.....	186
6.3.3.1.4.	Contenido de peróxidos del aceite de rico en ácidos grasos Omega-3 microencapsulado .....	188
6.3.3.2.	Estabilidad oxidativa de los microencapsulados .....	190
6.3.4.	Conclusiones.....	192
7.	CONCLUSIONES.....	193
8.	ANEXOS .....	199
8.1.	Ácidos grasos más comunes en la dieta humana.....	201
8.2.	Rutas metabólicas de los ácidos grasos Omega-6 y Omega-3 .....	202
8.3.	Principales componentes de los fosfoglicéridos más importantes de la membrana celular en el organismo humano .....	203
9.	BIBLIOGRAFÍA .....	205

# **1. RESUMEN**



Los lípidos constituyen los macronutrientes fundamentales para el organismo humano junto con los glúcidos y proteínas. Moléculas lipídicas como los ácidos grasos poliinsaturados son capaces de formar una amplia gama de estructuras químicas con funciones metabólicas fundamentales. Sin embargo, el organismo humano no es capaz de sintetizar todos los ácidos grasos requeridos para realizar determinadas funciones biológicas y es necesaria su ingesta a través de la alimentación. Por este motivo, esos ácidos grasos que no se sintetizan de manera endógena se denominan ácidos grasos esenciales. Los ácidos grasos poliinsaturados de las series Omega-3 y Omega-6 son esenciales y están involucrados tanto en la estructura de la membrana celular como en el desarrollo y funcionamiento del sistema cerebral y del sistema nervioso. Los ácidos grasos más importantes de la serie Omega-3 son los ácidos eicosapentaenoico (EPA, C20:5n-3) y docosahexaenoico (DHA, C22:6n-3). Existen evidencias reales contrastadas de los efectos beneficiosos sobre la salud humana de estos dos ácidos grasos poliinsaturados. El EPA y DHA refuerzan el sistema cardiovascular debido a su efecto antiinflamatorio y antitrombótico, y favorecen el correcto desarrollo y funcionamiento de los sistemas nervioso central y ocular. Sin embargo, la población en diferentes partes del mundo tiene una ingesta demasiado baja de estos ácidos grasos Omega-3. Así, los alimentos enriquecidos en ácidos grasos Omega-3 son una de las categorías de productos alimentarios de más rápido crecimiento en la industria alimentaria para paliar ese déficit.

Por su naturaleza poliinsaturada, los ácidos grasos Omega-3, son inestables y tienden a oxidarse. Esto lleva a la formación de sabores desagradables e incluso a la pérdida de sus propiedades beneficiosas. Desde un punto de vista tecnológico, fortificar alimentos con aceites que contengan alta proporción de EPA y DHA es un desafío. Es fundamental prevenir la oxidación de lípidos en este tipo de productos. Son numerosos y diversos los factores que pueden afectar a la oxidación de lípidos en matrices alimentarias complejas. Por este motivo, son necesarias diferentes técnicas para reducir o prevenir la oxidación lipídica. Generalmente, los aceites ricos en ácidos grasos Omega-3 se incorporan a matrices líquidas y semilíquidas en forma de emulsión y en matrices sólidas en forma de microencapsulados. De este modo, los resultados obtenidos en un sistema alimentario, no pueden ser extrapolados a otro sistema alimentario distinto y la técnica empleada para la incorporación de estos ingredientes

funcionales a un producto alimenticio debe considerarse cuidadosamente. En estas técnicas de estabilización es necesaria la adición de emulsificantes y antioxidantes que estabilizan físicamente el sistema alimentario y retrasan, controlan y previenen los procesos oxidativos a través de diferentes mecanismos como la eliminación de radicales libres, quelación y poder reductor de iones metálicos. Los emulsificantes y antioxidantes derivados de la hidrólisis enzimática de proteínas alimentarias son una alternativa de origen natural, preferible frente otras de origen sintético. De esta manera, es un reto científico y técnico encontrar péptidos procedentes de la hidrólisis enzimática de proteínas alimentarias con propiedades tanto emulsificantes como antioxidantes, a un nivel adecuado, para estabilizar física y oxidativamente emulsiones y microcápsulas de aceites ricos en ácidos grasos Omega-3 que servirán de vehículo para la incorporación a matrices alimentarias. Candidatos para testar en estos alimentos, por su procedencia natural y sostenible, son los hidrolizados de proteínas como la soja y subproductos de la industria alimentaria como el lactosuero, y los descartes de pesca.

Así, el objetivo de esta tesis doctoral es desarrollar procesos de estabilización de ácidos grasos Omega-3 mediante técnicas de emulsión y microencapsulado, empleando para ello agentes emulsificantes-antioxidantes de naturaleza peptídica, procedentes de la hidrólisis enzimática de proteínas alimentarias tales como lactosuero, soja y bacaladilla.

Para ello, esta investigación cuenta con los siguientes objetivos específicos que dividen este trabajo en tres secciones diferenciadas:

1. Obtención de hidrolizados de proteínas alimentarias con actividad emulsificante y antioxidante.
2. Estudio de la estabilidad física y oxidativa de emulsiones de aceites ricos en ácidos grasos Omega-3 estabilizadas con hidrolizados de proteínas alimentarias.
3. Microencapsulación de emulsiones de aceites ricos en ácidos grasos Omega-3 estabilizadas con hidrolizados de proteínas alimentarias mediante secado por atomización.

En la primera sección se llevan a cabo las reacciones de hidrólisis de los sustratos proteicos: concentrado de proteína de lactosuero, aislado de proteína de soja y proteína

de bacaladilla. Estas proteínas se hidrolizan con las enzimas subtilisina (EC 3.4.21.62) y tripsina (EC 3.4.21.4) a grados de hidrólisis comprendidos entre DH 2 y 14%. Posteriormente, se determinan las propiedades emulsificantes, índices de actividad (IAE) y estabilidad emulsionante (IEE), de cada hidrolizado y se desarrollan modelos matemáticos con cada enzima para optimizar estas propiedades en función del sustrato, grado de hidrólisis de los hidrolizados y pH de la emulsión (pH 2, 4, 6, 8). Los coeficientes de correlación de los modelos son  $R^2=81.55\%$  y  $83.54\%$  para IAE e IEE respectivamente con subtilisina y  $R^2=72.30\%$  para IAE y  $83.55\%$  para IEE con tripsina. Por tanto, los modelos matemáticos ajustan bien los datos experimentales. De forma general, grados de hidrólisis bajos y condiciones de pH alejadas del punto isoeléctrico de las proteínas mejoran las propiedades emulsificantes. El hidrolizado de aislado de proteína de soja obtenido con la enzima tripsina ( $50^\circ\text{C}$ , pH 8) a DH 6.5% y pH de emulsión igual a 8, es el hidrolizado que, según el procedimiento de optimización, presenta los índices de actividad y estabilidad emulsionante máximos. Además, para determinar la capacidad de estabilizar emulsiones de estos hidrolizados, se evalúa la estabilidad física y oxidativa de una emulsión producida con el hidrolizado de propiedades emulsificantes optimizadas, acelerando la oxidación y durante un periodo de almacenamiento de 10 días a una temperatura de  $20^\circ\text{C}$ . La emulsión estabilizada con el hidrolizado de aislado de proteína de soja bajo condiciones óptimas (DH 6.5% obtenido con tripsina y pH de emulsión 8) es física y oxidativamente estable. Sin embargo, cabe esperar una mejora de la estabilidad oxidativa si los hidrolizados con propiedades emulsificantes presentan buena capacidad antioxidante. Así, el estudio se completa con la determinación de las propiedades antioxidantes de los hidrolizados de proteína de lactosuero, soja y bacaladilla. Se estudia la influencia del grado de hidrólisis, el tipo de enzima utilizada y sustrato proteico sobre la capacidad quelante y reductora de iones metálicos y sobre la actividad inhibidora de radicales libres de los hidrolizados. En general, los hidrolizados procedentes de los tres sustratos proteicos estudiados muestran una buena capacidad para actuar como quelantes de iones metálicos. Los hidrolizados de aislado de proteína de soja y proteína de bacaladilla muestran una mayor capacidad para inhibir al radical DPPH en comparación con los de concentrado de proteína de lactosuero. Respecto al poder reductor, los hidrolizados de proteína de bacaladilla y concentrado de proteína de lactosuero presentan mejor

capacidad que los hidrolizados de aislado de proteína de soja. De forma general, los hidrolizados obtenidos con la enzima subtilisina presentan mejores propiedades antioxidantes que los hidrolizados obtenidos con la enzima tripsina.

Finalmente, en esta sección, se seleccionan los hidrolizados de cada sustrato con mejores propiedades emulsificantes y antioxidantes en conjunto. Los hidrolizados de concentrado de proteína de lactosuero con mejor capacidad antioxidante se encuentran a grados de hidrólisis entre 10 y 14% obtenidos con la enzima subtilisina a una temperatura de reacción de hidrólisis de 50°C y pH 8. Con los modelos matemáticos obtenidos se optimizan las propiedades emulsificantes en el rango de DH 10-14% en el que los hidrolizados con subtilisina muestran las capacidades antioxidantes mayores. Los valores máximos en las propiedades emulsificantes se obtienen con el hidrolizado de concentrado de proteína de lactosuero obtenido con la enzima subtilisina (50°C, pH 8) a DH 10 y con pH de emulsión igual a 8. Este hidrolizado, por tanto se selecciona como uno de los candidatos para el siguiente estudio. Los mejores valores en las propiedades antioxidantes de los hidrolizados de aislado de proteína de soja se obtienen a DH 2% con la enzima subtilisina a una temperatura de la reacción de hidrólisis de 50 °C y pH 8. Al igual que con los hidrolizados de concentrado de proteína de lactosuero, se optimizan las propiedades emulsificantes para los hidrolizados de aislado de proteína de soja con subtilisina que presentan mayor capacidad antioxidante. El hidrolizado a DH 2% obtenido con la enzima subtilisina (50°C, pH 8) también es el que presenta mejor capacidad emulsificante a un pH de emulsión igual a 8. Por otro lado, en el estudio de las propiedades emulsificantes, los hidrolizados de proteína de bacaladilla solamente emulsifican a pH 2 para los DH 2, 4 y 6%. A otros pH, 4, 6 y 8, la emulsión se desestabiliza e incluso ni llega a emulsificar. Por este motivo no es posible su ajuste a un modelo matemático. Para ese sustrato en concreto, el hidrolizado de proteína de bacaladilla a DH 4% obtenido con tripsina a una temperatura de reacción de hidrólisis de 50°C y pH 8 presenta los mejores valores de antioxidante y emulsificante en conjunto.

Por tanto, en base a los resultados obtenidos, se eligen los tres hidrolizados candidatos con las características necesarias para lograr la estabilización de lípidos en matrices

alimentarias como son las emulsiones de aceites enriquecidos en ácidos grasos Omega-3:

- El hidrolizado de concentrado de proteína de lactosuero a DH 10% obtenido mediante hidrólisis enzimática a una temperatura de 50°C y pH 8 con la enzima subtilisina.
- El hidrolizado de aislado de proteína de soja a DH 2% obtenido mediante hidrólisis enzimática a una temperatura de 50°C y pH 8 con la enzima subtilisina.
- El hidrolizado de proteína de bacaladilla a DH 4% obtenido mediante hidrólisis enzimática a una temperatura de 50°C y pH 8 con la enzima tripsina.

En la segunda sección, se realiza un estudio acelerado de la estabilidad física y oxidativa de emulsiones de aceite rico en ácidos grasos Omega-3, estabilizadas con los tres hidrolizados de proteínas seleccionados anteriormente, donde se comprueba su eficacia durante un periodo de almacenamiento de 10 días a una temperatura de 20°C. El contenido de peróxidos en las emulsiones durante el periodo de almacenamiento varía significativamente dependiendo del hidrolizado empleado. La emulsión a pH 2 estabilizada con proteína de bacaladilla a DH 4% hidrolizada con tripsina (BPH4), sufre una oxidación intensa en los primeros días de almacenamiento reflejada en el incremento de peróxidos. En la emulsión a pH 8 estabilizada con el hidrolizado de aislado de proteína de soja al 2% con subtilisina (SPH2), el aumento es más leve y constante a lo largo del tiempo de almacenamiento. La emulsión a pH 8 estabilizada con el hidrolizado de concentrado de proteína de lactosuero a DH 10% con subtilisina (WPH10), presenta los valores de peróxidos más bajos y se mantiene constante durante todo el periodo de almacenamiento. En los productos de oxidación secundarios se confirma que la emulsión estabilizada con el hidrolizado de proteína de bacaladilla es la más oxidada seguida de la estabilizada con el hidrolizado de soja y la del hidrolizado de lactosuero. Por otro lado, la emulsión preparada con el hidrolizado de proteína de lactosuero hidrolizada al 10% con subtilisina (WPH10) presenta una excelente estabilidad física en comparación con las emulsiones estabilizadas con los hidrolizados de proteína de soja (SPH2) y bacaladilla (BPH4). La distribución monomodal inicial de tamaño de gota de la emulsión de lactosuero (WPH10) permanece inalterada hasta el

final del periodo de almacenamiento. Así, la estabilidad física y oxidativa de las emulsiones varía según  $BPH4 < SPH2 < WPH10$ . Por tanto, los resultados reflejan que la estabilidad física de las emulsiones juega un papel importante en su estabilidad oxidativa, ya que, la emulsión estabilizada con el hidrolizado de proteína de lactosuero, DH 10% hidrolizado con subtilisina y a pH de emulsión igual a 8, que proporciona la mayor estabilidad física, también proporciona significativamente la mayor estabilidad oxidativa. La emulsión estabilizada con el hidrolizado de proteína de lactosuero se mantiene estable durante un periodo de 10 días a una temperatura de 20°C en oscuridad.

Un paso más en la estabilización de aceites ricos en ácidos grasos Omega-3 son los procesos de microencapsulación. En la tercera sección de esta investigación, se emplean técnicas de microencapsulación mediante secado por atomización, para microencapsular emulsiones de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 estabilizadas a pH 8 con el hidrolizado de proteína de lactosuero a DH 10% obtenido con la enzima subtilisina (50°C y pH8). En este estudio se producen microencapsulados diferentes que se caracterizan física y oxidativamente para evaluar el efecto de la concentración de aceite y de distintos ratios de aceite/hidrolizado en la emulsión a encapsular, 2/0.5, 4/1, 8/2, 3/0.5, 6/1, 12/2, 4/0.5, 8/1, 16/2. Posteriormente, se evalúa la estabilidad oxidativa de los microencapsulados con más carga de aceite (19, 26 y 32%) durante un periodo de almacenamiento de 6 semanas a una temperatura de 25°C. Durante el proceso de secado por atomización no se degrada el aceite y las microcápsulas son físicamente estables a todos los ratios de aceite/hidrolizado testados. Con estos estudios se comprueba que el hidrolizado de proteína de lactosuero es un buen emulsificante y antioxidante para la estabilización de microcápsulas de aceite rico en ácidos grasos Omega-3. El hidrolizado de concentrado de proteína de lactosuero a DH 10% con subtilisina es efectivo en un amplio rango de concentraciones de aceite microencapsulado. Junto con encapsulantes como el jarabe de glucosa, produce microencapsulados con altas eficiencias de encapsulación. Además, ayuda a ralentizar los procesos de oxidación del aceite rico en ácidos grasos Omega-3 microencapsulado durante un periodo de almacenamiento de 6 semanas a una temperatura de 25°.

## **2. INTRODUCCIÓN**



## 2.1. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son cadenas hidrocarbonadas de entre 4 y 36 carbonos con un grupo carboxilo en su extremo. Su fórmula general es R-COOH, donde R representa la cadena hidrocarbonada que identifica a cada ácido graso concreto. Pueden clasificarse atendiendo a su longitud de cadena siendo de cadena corta los que poseen menos de seis carbonos en su estructura, media cuando contienen entre siete y doce carbonos y de cadena larga si tienen más de doce carbonos. Cuando los ácidos grasos poseen únicamente enlaces simples entre los átomos de carbono de su estructura se denominan ácidos grasos saturados (AGS). Si presentan dobles enlaces carbono-carbono son ácidos grasos insaturados (AGI), denominándose monoinsaturados (AGMI) si solo presentan un único doble enlace y poliinsaturados (AGPI), si contienen dos o más dobles enlaces carbono-carbono (Figura 2.1).

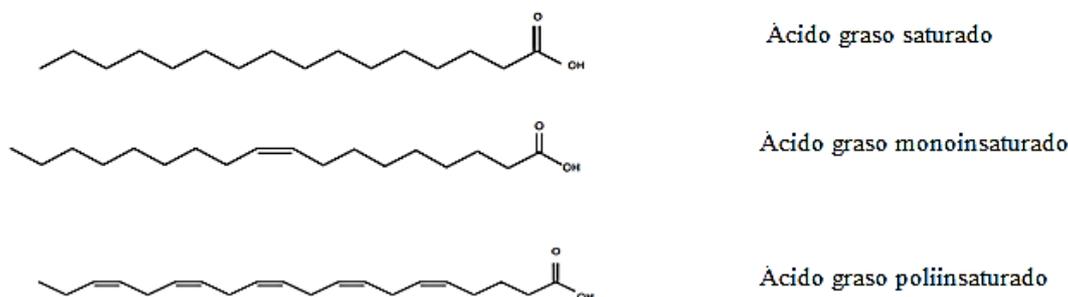


Figura 2.1 Ejemplo de ácido graso saturado, monoinsaturado y poliinsaturado.

Los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados que existen en la naturaleza son normalmente de orientación “cis”. Una configuración “cis” significa que los átomos de hidrógeno unidos a los dobles enlaces se encuentran en el mismo plano geométrico. Si los átomos de hidrógeno se encuentran en planos opuestos, la configuración se denomina “trans” (Figura 2.2).

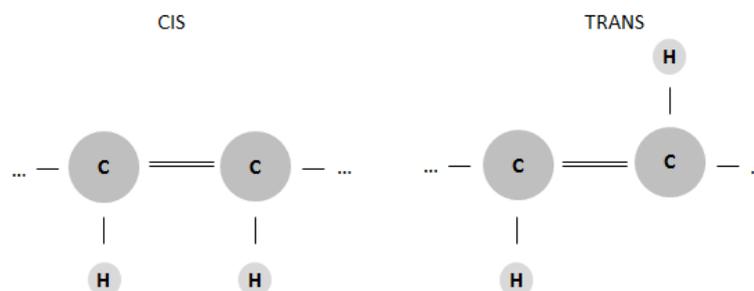


Figura 2.2 Esquema de configuración “cis” y configuración “trans”.

Los ácidos grasos poliinsaturados se clasifican en función de la posición del primer doble enlace comenzando por el metilo final, denominándose con la letra griega Omega ( $\omega$ ) o bien con la letra “n”. De esta manera, un ácido graso denominado Omega-3 ( $\omega$ -3 ó n-3), tiene su primer doble enlace entre los carbonos 3 y 4, un ácido graso Omega-6 ( $\omega$ -6 ó n-6) tiene el primer doble enlace entre los carbonos 6 y 7, y un ácido graso Omega-9 ( $\omega$ -9 ó n-9) entre los carbonos 9 y 10. En el Anexo 8.1., se muestran ejemplos de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados más comunes en la dieta humana, su nomenclatura sistemática según la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada), su fórmula y abreviatura habitual que se refiere a la longitud de cadena seguida del número de insaturaciones y posición de la primera insaturación.

Los ácidos grasos tienen un papel determinante en el organismo humano al ser los constituyentes principales de lípidos con funciones estructurales y moduladoras de las propiedades de la membrana celular (fosfolípidos, esfingolípidos)(De Carvalho and Caramujo, 2018). Los ácidos grasos insaturados y particularmente los ácidos grasos poliinsaturados pueden formar una amplia gama de estructuras químicas que cumplen con unas funciones únicas (Watkins and German, 2008). De esta manera, los ácidos grasos poliinsaturados están involucrados en procesos de transmisión celular, como se detalla más adelante.

Por otro lado, los ácidos grasos están implicados en el almacenamiento y suministro de energía para las células ya que son combustibles metabólicos muy energéticos (Sánchez and Ortega de la Torre, 2017). Así, los ácidos grasos se acumulan generalmente en forma de triglicéridos (TAG) que son acilglicéridos procedentes de una molécula de

glicerol esterificada con tres ácidos grasos como se muestra en la Figura 2.3. En ella, se identifican las tres posiciones que los ácidos grasos pueden ocupar en el TAG (extremas sn-1-3 y central sn-2). Estos ácidos grasos de los TAG son utilizados como material de reserva de energía en las células adiposas. Los lípidos de almacenamiento o depósito contienen un alto porcentaje de ácidos grasos, sobre todo saturados, y mayoritariamente, de ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0). Estos lípidos que actúan como productores de energía para las células pueden ser exógenos, derivados de la dieta, o endógenos derivados directamente de los tejidos del organismo (Gil and Sánchez de Medina, 2017).

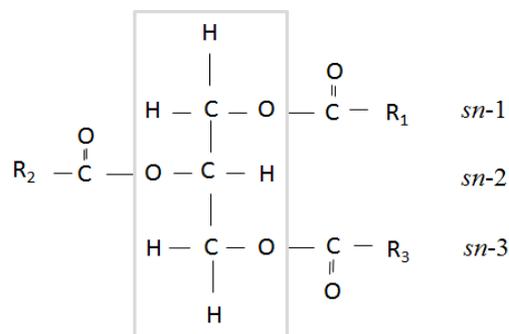


Figura 2.3 Esquema general de un triglicérido con las tres posiciones de los ácidos grasos (sn-1, sn-2 y sn-3) en el esqueleto del glicerol, las extremas (sn-1 y sn-3) y la posición central (sn-2). R1, R2 y R3 representan las cadenas hidrocarbonadas que identifican a cada ácido graso.

El organismo humano, no es capaz de sintetizar todos los ácidos grasos requeridos para realizar determinadas funciones biológicas. Por este motivo, es necesaria la ingesta a través de la dieta de los ácidos grasos que no se sintetizan de manera endógena. La capacidad del organismo para producir un ácido graso específico se basa en un mecanismo de desaturación de los ácidos grasos saturados o la ingestión de un precursor convertible (Watkins and German, 2008). La tasa de conversión de los ácidos grasos saturados a otras formas depende del tipo de ácido graso y de la especificidad de las enzimas desaturasas y elongasas hacia un ácido graso en particular (Kadegowda and Yu, 2015). Una vez absorbidos por las células, pueden sufrir desaturación y/o elongación por estas enzimas localizadas en el retículo endoplasmático (Guillou et al., 2010) produciendo una gran variedad de especies con distintas propiedades físicas y químicas.

Los ácidos grasos en la dieta se ingieren en forma de TAG concretamente en forma de grasas. Aproximadamente el 95% de la grasa de la dieta está compuesta por TAG (Shahidi and Zhong, 2010). La digestión de los ácidos grasos como tal, comienza en el estómago, con la actuación de una lipasa gástrica y de una esterasa inespecífica presente en los alimentos (Levy et al., 2004). No obstante, la lipasa lingual hidroliza previamente algunos ácidos grasos de cadena corta y media. A continuación, las sales biliares presentes en el duodeno inhiben la actuación de la lipasa emulsionando la fracción lipídica y formando pequeñas gotas. Para evitar la inhibición de la lipasa, esta se une a la colipasa desplazando las sales biliares y permitiendo la hidrólisis de los TAG (Martínez de la Victoria et al., 2017). Los ácidos grasos de cadena corta son altamente solubles por lo que son transportados del estómago al hígado, se absorben y son utilizados como una fuente inmediata de energía a las células (Small, 1991; Willis et al., 2011). En el páncreas, la lipasa pancreática hidroliza los enlaces de las posiciones sn-1 y sn-3 del triglicérido generando 2-monoglicéridos (2-MAG) y ácidos grasos libres que son absorbidos por las células epiteliales de la mucosa intestinal. Esta lipasa pancreática, además de su especificidad hacia posiciones externas del TAG, tiene cierta selectividad hacia ácidos grasos de cadena media en detrimento de los de cadena larga (Akoh, 2006). Una vez dentro de las células epiteliales, los 2-MAG y ácidos grasos libres son transportados al retículo endoplasmático liso donde se resintetizan los TAG, fosfolípidos y ésteres de colesterol y son modificados. En el aparato de Golgi forman los quilomicrones, lipoproteínas que transportan esos TAG, que migran por el sistema linfático y sanguíneo hasta alcanzar los músculos y el tejido adiposo.

Aproximadamente, el 80% de la grasa ingerida sigue la vía 2-MAG por lo que la composición de los ácidos grasos en la posición sn-2 de los TAG de los quilomicrones es similar a la de los TAG ingeridos. Por tanto, la absorción está influenciada por la estructura intramolecular y por la composición de los ácidos grasos (Small, 1991).

Los ácidos grasos saturados en la dieta se consideran menos deseables para la salud que los ácidos grasos insaturados, ya que, se han asociado con una mayor incidencia de aterosclerosis (Jakobsen et al., 2004). Aunque existen estudios en los que ácidos grasos saturados como el esteárico (C18:0) son neutrales o incluso protectores en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Crupkin and Zambelli, 2008). Los efectos

fisiológicos y bioquímicos de los ácidos grasos saturados de la dieta dependen de la cantidad ingerida y la forma final que adquieren en los tejidos del organismo (Kadegowda and Yu, 2015).

Por otro lado, los ácidos grasos insaturados desempeñan un importante papel en funciones metabólicas que no producen energía (Watkins and German, 2008). En concreto, los ácidos grasos poliinsaturados de las series Omega-3 y Omega-6 están involucrados tanto en la estructura de la membrana celular como en el desarrollo y funcionamiento del sistema cerebral y del sistema nervioso (Koletzko et al., 2008). Sin embargo, el organismo humano no puede desaturar en las posiciones 3 y 6 a partir de ácidos grasos de menor insaturación por lo que no le es posible sintetizar estos ácidos grasos poliinsaturados y deben ser ingeridos en la dieta. Por este motivo, se denominan ácidos grasos esenciales. Estos ácidos grasos esenciales son precursores de una gran variedad de mediadores bioactivos que actúan sobre una gran familia de receptores selectivos. La gran mayoría de las células y tejidos del cuerpo humano expresan al menos uno de estos receptores, lo que implica que los ácidos grasos esenciales influyan en casi todos los aspectos de la fisiología humana (Lands, 2012). Entre los mediadores bioactivos de los que son precursores, destacan los eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos), por su implicación en el control de la coagulación sanguínea, en la respuesta inmune y en procesos inflamatorios. De esta manera, los eicosanoides están implicados, en muchas alteraciones patológicas.

El principal componente de la serie Omega-6 es el ácido linoleico (C18:2n-6) y en la serie Omega-3 el ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3n-3). Estos ácidos son elongados y desaturados por el mismo sistema enzimático microsomal que los transforma en derivados de mayor tamaño de cadena y mayor grado de insaturación (Valenzuela and Dagach-Imbarack, 2017). Dado que son metabolizados por el mismo sistema enzimático, entre ellos existe una competencia de manera que con un exceso de uno se causa una disminución en el metabolismo del otro (Wall et al., 2010). Las principales enzimas en estos procesos son la 5-desaturasa y la 6-desaturasa. La enzima 6-desaturasa presenta mayor afinidad hacia el  $\alpha$ -linolénico, por tanto, si el aporte nutricional de este ácido graso es muy elevado se va a dificultar el metabolismo del ácido linoleico (Valenzuela and Dagach-Imbarack, 2017). Pero si, como suele ocurrir en dietas

occidentales, el aporte nutricional del ácido linoleico es muy alto, la transformación en los derivados del  $\alpha$ -linolénico será marginal. En el Anexo 8.2. se muestra un esquema de las rutas metabólicas de ambos ácidos grasos. Los ácidos grasos más importantes, principalmente por ser precursores de los eicosanoides, derivados del metabolismo del ácido linoleico y  $\alpha$ -linolénico son el ácido araquidónico (AA, C20:4n-6) de la serie Omega-6 y los ácidos grasos eicosapentaenoico (EPA, C20:5n-3) y docosahexaenoico (DHA, C22:6n-3) de la serie Omega-3 (Figura 2.4).

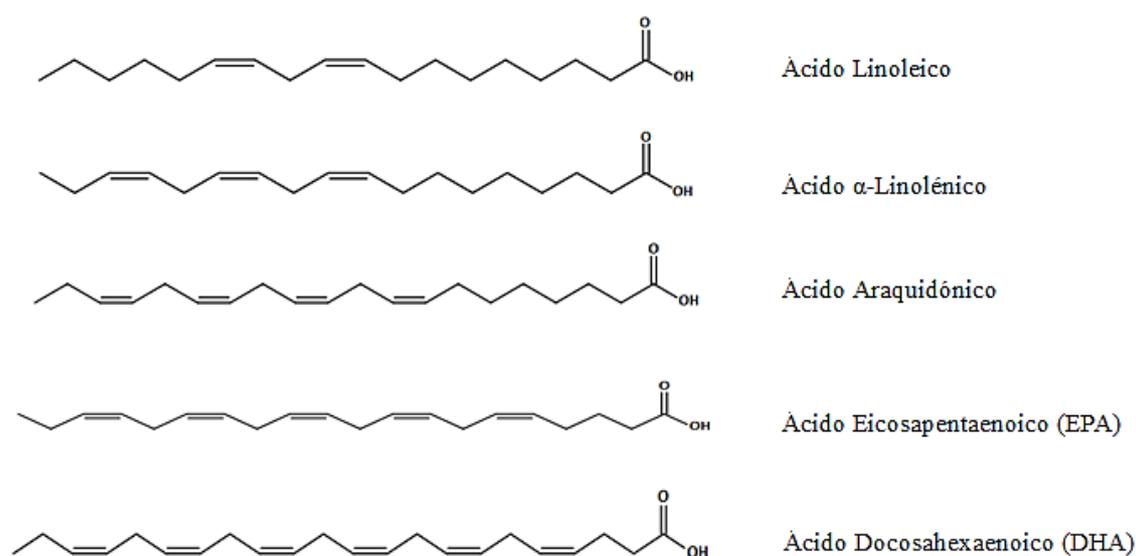


Figura 2.4 Estructura química de los principales ácidos grasos poliinsaturados de las series Omega-6 y Omega-3.

Durante décadas los beneficios sobre la salud del EPA y DHA cuando son ingeridos en la dieta han sido ampliamente estudiados. Estos ácidos grasos poliinsaturados están implicados en la producción de moléculas antiinflamatorias (Calder, 2015). El consumo de EPA y DHA está asociado con la prevención de enfermedades coronarias, debido a su efecto antiinflamatorio y antitrombótico. Regulan la presión sanguínea y los niveles de TAG en sangre (EFSA, 2016; Wall et al., 2010; Weichselbaum et al., 2013). Los efectos cardioprotectores del EPA y DHA incluyen la prevención de arritmias, disminución de la agregación plaquetaria, mejora de la variabilidad de la frecuencia cardíaca y disminución de respuesta inflamatoria arterial (Jump et al., 2012; Shahidi and Ambigaipalan, 2018). En relación a los beneficios sobre la enfermedad cardiovascular de estos dos ácidos grasos, existe una evidencia real contrastada en estas tres últimas

décadas de investigación, estudios observacionales y de cohorte, experimentos *in vitro* e *in vivo* y ensayos clínicos (Elagizi et al., 2018; Rangel-Huerta and Gil, 2018; Vas Dias, 2015).

El DHA y el AA son fundamentales para el desarrollo temprano del sistema nervioso central. Además, el DHA es un componente esencial en la estructura de la retina ocular (Koletzko et al., 2008). Existen numerosos estudios sobre lactantes y niños con alimentación suplementada en DHA que indican un claro beneficio sobre su sistema nervioso y visual (Li et al., 2013; Uauya et al., 2001; Weichselbaum et al., 2013). Hay estudios clínicos que han demostrado que el DHA tiene efectos preventivos en la demencia e incluso existen estudios preclínicos y clínicos que indican que protege contra el Alzheimer (Canhada et al., 2018; Larsen et al., 2011).

Los beneficios del EPA y DHA contra el cáncer, de manera general, son difíciles de establecer debido a las variedades que presenta la enfermedad. Es necesario evaluar el efecto que provocan estos ácidos grasos desde diferentes perspectivas, según el tipo de cáncer, para obtener evidencias reales de su beneficio. Numerosos estudios evalúan los efectos de los ácidos grasos Omega-3 en el cáncer de mama, colon, leucemia, estómago, páncreas, próstata y pulmón. Nabavi et al. (2015), realizaron una revisión exhaustiva sobre estos estudios y concluyen que el efecto beneficioso de los ácidos grasos Omega-3 en ciertos tipos de cáncer, está relacionado con su capacidad para modular la transducción de señales asociada a la membrana plasmática y la expresión de genes asociados al cáncer, además de su implicación en procesos inflamatorios relacionados con la enfermedad. Sin embargo, son necesarios más ensayos clínicos que determinen de manera más evidente el papel terapéutico del EPA y DHA en el tratamiento de determinados tipos de cáncer (Nabavi et al., 2015).

## **2.2. Acilglicéridos**

Los glicerolípidos o acilglicéridos engloban a los lípidos que contienen una molécula de glicerol esterificada con uno, dos o tres ácidos grasos, mono-, di- y triglicéridos respectivamente (Figura 2.5). Las posiciones en la cadena de glicerol donde se esterifican los ácidos grasos libres, como se ha descrito anteriormente en la Figura 2.3,

en el esquema general de un TAG, se denominan sn-1 y sn-3 para las posiciones de los extremos y sn-2 para la posición central.

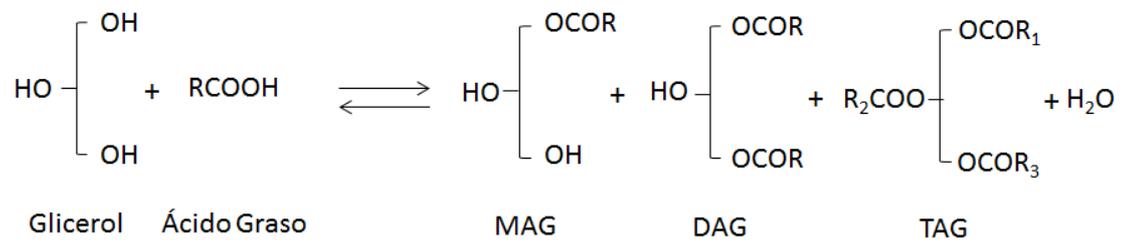


Figura 2.5 Esquema de la reacción de esterificación de la que se obtienen monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos (MAG, DAG, TAG respectivamente).

Los acilglicéridos, en forma de TAG, tienen una función fundamental como sustancias de almacenamiento de energía en el organismo. Además, estos lípidos desempeñan una función importante en la lubricación y en el acondicionamiento de las superficies corporales, ejemplo de ello, son la mayoría de las glándulas sebáceas que segregan un líquido compuesto por TAG, isoprenoides como el escualeno y ceras (Gil and Sánchez de Medina, 2017). Son vehículo de transporte de vitaminas liposolubles A, D, E, K y sirven como fuente de agentes emulsionantes. Asimismo, determinados diglicéridos y moléculas derivadas de los fosfolípidos y esfingolípidos están implicados en la regulación de la expresión génica en el núcleo celular (Gil and Sánchez de Medina, 2017).

Los acilglicéridos en la dieta, en forma de grasas y aceites, también son fuente de ácidos grasos y ácidos grasos esenciales. Además, aportan a los alimentos propiedades sensoriales y tecnológicas que los hacen más aceptables para el consumidor. Estos lípidos también suelen ir acompañados de pequeñas cantidades de fosfolípidos y esteroides que se encuentran en los tejidos de origen animal o vegetal según la procedencia del alimento.

Como se ha tratado en el Apartado 2.1., los ácidos grasos y por extensión, los TAG se absorberán y tendrán una funcionalidad específica según su estructura y tipo de ácidos grasos. Al ingerir un TAG las lipasas lingual, gástrica y la pancreática poseen alta selectividad a hidrolizar en las posiciones externas del TAG (sn-1 y sn-3) dando lugar a ácidos grasos libres y 2-MAG (Porsgaard, 2006). La naturaleza de los ácidos grasos en

la molécula del TAG determina la velocidad de su hidrólisis. Los ácidos grasos de cadena corta y media se hidrolizan más rápidamente que los ácidos grasos de cadena larga, especialmente ácidos grasos poliinsaturados que presentan una velocidad de hidrólisis más lenta (Mu and Porsgaard, 2005). Además, cuando los ácidos grasos de cadena corta y media se sitúan en las posiciones externas del TAG, se liberan al medio como ácidos grasos libres, se absorben rápidamente y se transportan por la vena porta hepática. Mientras que los 2-MAG que se producen tras la hidrólisis del TAG se absorben por el sistema linfático. Por tanto, para que los ácidos grasos esenciales ingeridos, como el EPA y DHA, puedan cumplir con su función en los procesos metabólicos de formación de los eicosanoides, tienen que ser absorbidos correctamente, por lo que deben estar situados en las posiciones centrales (sn-2) de los TAG de la dieta (Åkesson et al., 1978).

### 2.3. Fosfolípidos

Los glicerofosfolípidos o fosfolípidos contienen dos ácidos grasos en el esqueleto del glicerol y un grupo fosfato (Figura 2.6 A). Generalmente un ácido graso saturado se esterifica en la posición sn-1 y un ácido graso poliinsaturado en la posición central sn-2. El grupo polar X de la posición sn-3, que contiene un aminoalcohol (colina, serina etc.), proporciona al fosfolípido su región hidrófila. Sus estructuras muestran por tanto una parte polar y otra apolar. Los fosfoglicéridos se nombran según el alcohol polar en el grupo de cabeza, así por ejemplo, la fosfatidilcolina tiene colina en su grupo polar.

Los fosfolípidos forman parte de la estructura de las membranas celulares al orientarse en el entorno acuoso de la célula por agrupamiento de sus partes hidrofóbicas y forman bicapas que constituyen una barrera al paso de moléculas polares e iones (Ratnayake and Galli, 2009; Sánchez and Ortega de la Torre, 2017). El punto de partida para la síntesis de fosfolípidos es el ácido fosfatídico (Figura 2.6 B), sintetizado en el retículo endoplasmático y en la membrana mitocondrial externa a partir del glicerol fosfato y ácidos grasos. La pérdida del fosfato del ácido fosfatídico origina DAG que se utilizan para la síntesis de fosfolípidos junto con un alcohol. En el Anexo 8.3. se muestra una tabla con los principales componentes (alcoholes y ácidos grasos) de los fosfoglicéridos más importantes de la membrana celular en el organismo humano. Estos fosfolípidos

además contribuyen a la permeabilidad y fluidez de las membranas celulares (Erickson, 2008) y también son precursores de moléculas con un papel determinante en la señalización celular como los tromboxanos (Sánchez and Ortega de la Torre, 2017).

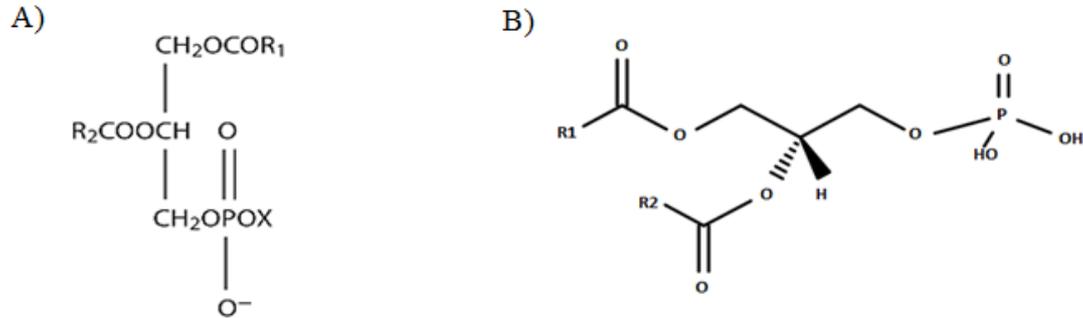


Figura 2.6 A) Esquema general de un fosfolípido. B) Estructura química del ácido fosfatídico.

La variabilidad en la composición de ácidos grasos que componen estos fosfolípidos de membrana puede verse influenciada por la dieta (Sánchez and Ortega de la Torre, 2017) y, por extensión, la composición de las membranas celulares dependerá de los alimentos ingeridos.

Además, los fosfolípidos, aprovechando su carácter anfifílico, se utilizan en alimentación para estabilización de emulsiones aceite/agua o agua/aceite, ya que, contribuyen a la disminución de la tensión interfacial. Ejemplo de ello, es el empleo de yema de huevo o lecitina de soja, cuyo contenido en fosfolípidos es del 10%, para estabilizar salsas, mayonesas, helados y en repostería (Erickson, 2008).

## 2.4. Esfingolípidos

Los esfingolípidos tienen como estructura central un aminoalcohol insaturado de cadena larga denominado esfingosina. La esfingosina deriva del ácido palmítico (C16:0) y la serina. Poseen en su estructura, como los fosfoglicéridos, una parte polar y otra apolar pero no contienen en su esqueleto glicerol (Figura 2.7).

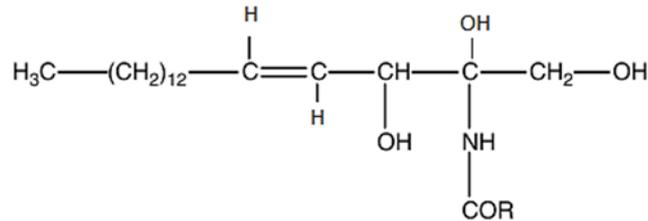


Figura 2.7 Esquema general de un esfingolípido.

Los esfingolípidos son una familia compleja de compuestos como las ceramidas que son la base de los esfingolípidos complejos, fosfoesfingolípidos y glicoesfingolípidos. Las ceramidas poseen además de la base esfingoide un ácido graso unido a una amida. Estos ácidos grasos son normalmente ácidos grasos saturados o monoinsaturados de cadena larga. Los fosfoesfingolípidos poseen en su estructura un grupo fosfato como la esfingomiélna y los glicoesfingolípidos contienen uno o más residuos de azúcares unidos a la base esfingoide como los cerebrósidos (Ratnayake and Galli, 2009).

Los esfingolípidos, al igual que los fosfolípidos, son componentes estructurales de la membrana celular y están implicados en su estabilidad y fluidez. Además, los metabolitos derivados de los esfingolípidos tienen un papel importante como segundos mensajeros celulares con funciones en un amplio espectro de procesos que regulan la proliferación y la muerte celular. Los esfingolípidos también son constituyentes minoritarios de los alimentos y aunque no son nutrientes esenciales pueden influir en la respuesta inmunológica del sistema linfático asociado a las mucosas del intestino (Gil and Chagoyán, 2017). También hay estudios recientes que sugieren su utilización en terapias complementarias para patologías relacionadas con la neurodegeneración o síndrome metabólico aunque son necesarios ensayos clínicos más exhaustivos (Castro-Gómez et al., 2015).

## 2.5. Glucolípidos

Los glucolípidos son lípidos en los que los ácidos grasos de su estructura se unen directamente a un glúcido. Es decir, en ellos el esqueleto del glicerol presente en glicerolípidos y glicerofosfolípidos, es sustituido por un azúcar (Fahy et al., 2009). Los glucolípidos también son denominados sacarolípidos por algunos autores. Aunque el

término glucolípido definido por la IUPAC considera en esta categoría a los glicosfingolípidos, en esta clasificación no se han incluido.

Algunos sacarolípidos, como la UDP-N-acetilglucosamina (Figura 2.8) forman polisacáridos que cumplen funciones biológicas importantes en el metabolismo celular. La UDP-N-acetilglucosamina actúa como sustrato para diferentes enzimas, permitiendo generalmente, la incorporación del N-acetilglucosamina a la cadena de oligosacáridos de las proteínas. Esta N-acetilglucosamina es un compuesto que forma parte de moléculas del organismo como los glicosaminoglicanos, componentes estructurales de los tejidos conjuntivos como el ácido hialurónico (Martínez, 2017).

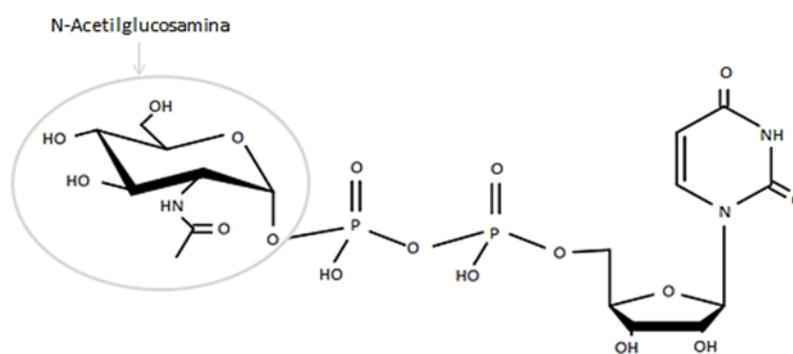


Figura 2.8 Estructura química de UDP-N-acetilglucosamina.

## 2.6. Policétidos

Los policétidos son metabolitos de origen vegetal, microbiano o animal sintetizados por complejos multienzimáticos, formados por un grupo de enzimas que comparten características con las enzimas que catalizan la biosíntesis de ácidos grasos. Estas enzimas que intervienen en la síntesis de policétidos generan diversos compuestos naturales, de los que un gran número tienen carácter lipídico, de ahí que se consideren una categoría más de lípidos.

## 2.7. Esteroles

Los esteroides o esteroides tanto de origen animal como vegetal derivan del núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano que posee una estructura hidrocarbonada con un anillo pentagonal y tres anillos hexagonales (Figura 2.9).

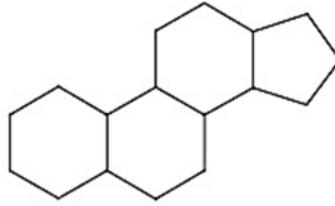


Figura 2.9 Estructura química del esterano.

El principal esteroide en los tejidos animales es el colesterol (Figura 2.10). Es una molécula anfifílica con una parte polar y una apolar. No es un nutriente esencial pero es fundamental en la membrana celular. Es precursor de otros esteroides como las hormonas de las glándulas suprarrenales, como el cortisol que interviene en el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y lípidos, o la aldosterona, que regula la excreción de sal y agua por los riñones. También es precursor de hormonas sexuales como los andrógenos y estrógenos y de la vitamina D. Además, del colesterol derivan los ácidos biliares, que actúan emulsionando las grasas de la dieta para su correcta absorción. El principal órgano que lo suministra es el hígado y de ahí va a los tejidos a través de las lipoproteínas. La tasa de formación de colesterol en el organismo depende de la dieta pero existe también cierta síntesis endógena (Gil and Sanchez de Medina, 2017; Panish et al., 2002). El colesterol es importante para la salud del organismo humano ya que anomalías en su síntesis o en el metabolismo de los ácidos biliares se asocian a las enfermedades cardiovasculares y cálculos renales (Chen et al., 1974; Leren, 1966).

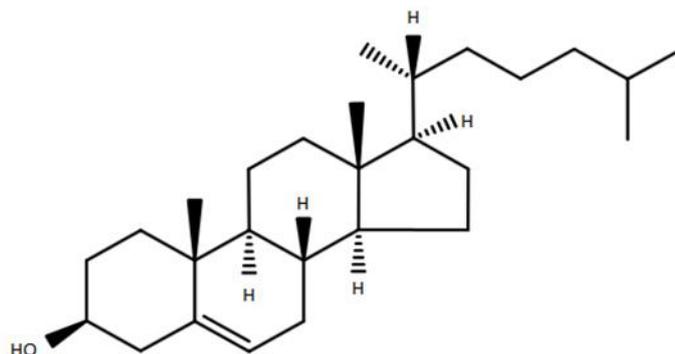


Figura 2.10 Estructura química del colesterol.

## 2.8. Isoprenoides

Los isoprenoides o terpenos son lípidos derivados del hidrocarburo de cinco carbonos 2-metil-1,3-butadieno también denominado isopreno (Figura 2.11). La mayoría de los terpenos en la naturaleza son de origen vegetal, fúngico o bacteriano y pueden contener de una a ocho unidades de isopreno.

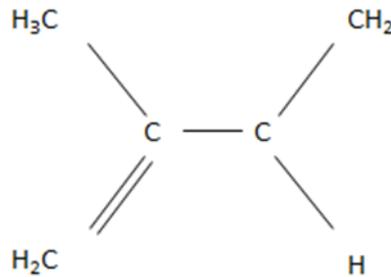


Figura 2.11 Esquema general de la molécula isopreno.

Ciertos terpenos como los carotenoides, son precursores de algunas vitaminas y esto hace que tengan un papel importante en el organismo humano cuando son ingeridos en la dieta. Los carotenoides son moléculas de origen vegetal sintetizados a partir de ocho unidades de isopreno, como el  $\beta$ -caroteno (Figura 2.12). Este compuesto es un poderoso antioxidante y es precursor de la vitamina A. Se encuentra en vegetales con pigmentos coloreados (rojo, naranja, amarillo) y en los tejidos grasos animales en forma de retinoides. Estos compuestos tienen repercusión en el funcionamiento de las células epiteliales, en la modulación del sistema inmunológico intestinal, regulación de los depósitos de grasa corporal, etc. Por otro lado, también hay carotenoides que no son precursores de la vitamina A como la luteína y astaxantina que cumple funciones relevantes en el organismo cuando son ingeridos. Así, la luteína protege los tejidos sensibles a la luz además de tener carácter antioxidante, y la astaxantina presenta efectos preventivos contra algunas enfermedades oculares (Ortega et al., 2017).

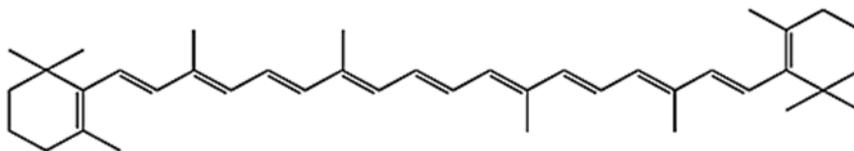


Figura 2.12 Estructura química del  $\beta$ -caroteno.

### **3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS**



### **3.1. Ingesta de lípidos**

En nutrición humana, los lípidos constituyen los macronutrientes fundamentales para el organismo junto con los glúcidos y proteínas. El efecto sobre la salud de los lípidos ingeridos en la dieta es de gran interés para la investigación científica desde hace décadas. Existen numerosos estudios publicados sobre recomendaciones de ingesta de lípidos con objeto de prevenir enfermedades crónicas y mantener una salud adecuada, ejemplo de ello, es la revisión realizada por Smit et al. (2009) sobre los requerimientos de grasas y ácidos grasos y los criterios para el desarrollo de pautas dietéticas.

#### **3.1.1. Recomendaciones nutricionales sobre ingesta de lípidos**

Las recomendaciones sobre la ingesta de lípidos varían, a veces sustancialmente, de unos países a otros. Para establecer unos valores de ingesta recomendada, los estudios publicados se refieren a la evidencia que exista en relación con la ingesta total de grasas y la obesidad, aumento de peso, enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico y cáncer fundamentalmente. Aun así, existen todavía controversias para establecer las recomendaciones nutricionales sobre lípidos (Aranceta and Pérez-Rodrigo, 2012). En general, existe una tendencia a limitar la ingesta total de grasas y en particular de determinados ácidos grasos.

La Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Salud (WHO) aportan a la comunidad internacional recomendaciones basadas en evidencias científicas en materia de alimentación y nutrición. En relación a grasas comestibles para nutrición humana la consulta de expertos FAO/WHO más reciente data de 2008. En esta consulta se identifican cuatro grados de evidencia para concluir que la grasa total y los ácidos grasos afectan de manera importante a la salud: convincente, probable, posible e insuficiente. Los criterios empleados en la consulta de 2008 para juzgar estos grados de evidencia son los acordados en el informe de la FAO/WHO de 2003 y revisados en 2007, “Dieta, Nutrición y Prevención de enfermedades crónicas” (WHO/FAO, 2003). Para que se formule una recomendación se necesita una evidencia de grado convincente o probable (FAO, 2008). La Tabla 3.1 y la Tabla 3.2 muestran un resumen de ingestas dietéticas

diarias recomendadas de grasa y ácidos grasos para lactantes (0-24 meses), niños (2-18 años) y adultos acordadas en esta consulta de expertos FAO/WHO.

Tabla 3.1 Ingestas dietéticas diarias recomendadas de grasa y ácidos grasos: Lactantes (0-24 meses) y niños (2-18 años)(FAO, 2008).

Grasa/AG	Grupo de edad	Cantidad	Grado de Evidencia
Grasa Total	0-6 meses	40-60%E. Basado en el % total de grasa en la leche humana	Convincente
	6-24 meses	Reducción gradual dependiendo de la actividad física hasta 35%E	Convincente
	2-18 años	25-35%E	Probable
AGS	2-18 años	8%E. Niños de familias con evidencia de dislipidemia familiar (LDL-C elevado) deben recibir cantidades de AGS menores pero no reducir la ingesta total de grasa	Probable
AGMI	2-18 años	$AGMI = GT (\%E) - AGS (E\%) - AGPI (E\%) - AGT (E\%)$	Probable
Total AGPI	6-24 meses	<15%E	Probable
	2-18 años	11%E	Probable
<b>ω-6 AGPI</b>			
AA	0-6 meses	0.2-0.3%E	Convincente
LA	0-24 meses	3.0-4.5%E, <10%E	Convincente, Probable
<b>ω-3 AGPI</b>			
ALA	0-6 meses	0.2-0.3%E	Convincente
	6-24 meses	<3%E	Probable
DHA	0-6 meses	0.1-0.18%E	Convincente
	6-24 meses	10-12mg/kg/día	Probable
EPA+DHA	2-4 años	100-150 mg/día	Probable
	4-6 años	150-200 mg/día	Probable
	6-10 años	200-250 mg/día	Probable
TFA	2-18 años	<1%E	Convincente

Tabla 3.2 Ingestas dietéticas diarias recomendadas de grasa y ácidos grasos: Adultos. <sup>a</sup> Colesterol de baja densidad. <sup>b</sup> Colesterol Total. <sup>c</sup> Ácidos Grasos Saturados (AGS) – Ácidos Grasos Insaturados (AGI) – Ácidos Grasos Trans (AGT) (%E) – Ácidos Grasos Saturados (AGS) – Ácidos Grasos Insaturados (AGI) – Ácidos Grasos Trans (AGT) (%E). <sup>d</sup> Ácidos Grasos Trans totales a partir de fuentes de rumiantes y de grasas industriales

Grasa/AG	Cantidad	Grado de Evidencia		
		Convincente	Probable	Posible
Grasa Total	15-35%E		No relación con accidentes cardiovasculares, cáncer o subtipos de cáncer	
AGS	<10%E	C12:0-16:0 ↑ LDL <sup>a</sup> y TC/HDL-C <sup>b</sup> en comparación con cis AGMI o AGPI; ↑ LDL pero sin efecto en TC/HDL en comparación con hidratos de carbono		↑ Riesgo de diabetes
AGMI	Por diferencia <sup>c</sup>	↓ LDL y total/HDL cuando sustituyen a AGS (C12:0-16:0)		↓ Riesgo de síndrome me
Total AGPI	6-11%E	Ver arriba, para intercambio de AGS por AGPI LA y ALA son esenciales ↓ Riesgo de accidentes cardiovasculares cuando los AGPI reemplazan a los AGS		↓ Riesgo de síndrome metabólico, diabetes ↑ Peroxidación lipídica con consumo elevado, especialmente cuando la ingesta de tocofeno es baja Mínimo específico para la deficiencia no claro
ω-6 AGPI	2.5-9%E	Ver arriba, para intercambio de AGS por AGPI LA es esencial	↓ Riesgo de síndrome metabólico, diabetes	Mínimo específico para la deficiencia no claro
ω-3 AGPI	0.5-2%E	↓ Riesgo de accidentes cardiovasculares cuando los AGPI reemplazan a los AGS ALA es esencial		
AGT <sup>d</sup>	<1%E	↓ HDL y ↑ TC/HDL-C en comparación con AGS (C 12:0-16:0), cis AGMI o AGPI ↑ Riesgo de accidentes cardiovasculares	↑ Riesgo de accidentes cardiovasculares fatales y de muerte súbita cardiaca ↑ Riesgo de síndrome metabólico, diabetes	

En la Tabla 3.1 y la Tabla 3.2 las ingestas recomendadas se han expresado en porcentaje de energía (E%), es decir, el porcentaje de la ingestión diaria de energía. Los requerimientos deben ajustarse a grupos poblacionales determinados, de ahí que se dividan para lactantes, niños y adultos fundamentalmente, ya que, las necesidades nutricionales varían según la edad y actividad física.

Los requerimientos de grasa total expresados en porcentaje de energía, % E, para un adulto sano establecen un mínimo entorno al 15-20% E y máximo de 30-35% E (Aranceta and Pérez-Rodrigo, 2012). Así, se establece un rango de entre un 15 y 35% E para adultos como se muestra en la Tabla 3.2. Para lactantes de 0 a 6 meses los requerimientos son superiores y se sitúan entre un 40-60% E y para niños entre un 25-35% E (Tabla 3.1).

Los criterios para establecer las recomendaciones sobre ingesta de grasas saturadas se basan en datos obtenidos de estudios epidemiológicos y ensayos clínicos relacionados con la enfermedad cardiovascular (Smit et al., 2009). Existen evidencias convincentes de que la sustitución de ácidos grasos saturados por ácidos grasos poliinsaturados disminuye el riesgo de enfermedad cardiovascular. Ejemplo de ello, son los estudios de cohorte sobre la relación de grasas en la dieta y la enfermedad cardiovascular realizados por Li et al.(2015). Los estudios se realizaron en adultos sanos y durante un periodo de seguimiento de 24-30 años y llegaron a la conclusión de que reemplazar el 5% de la ingesta de energía de grasas saturadas por una ingesta equivalente de AGPI, AGMI y/o carbohidratos integrales de alta calidad produce un menor riesgo de cardiopatía coronaria, concretamente un 25%, 15% y 9% menos respectivamente. Asimismo, en un meta-análisis realizado en adultos sanos y en un periodo de 2-4 años en el que se sustituye el 5% de la ingesta de energía procedente de grasas saturadas por el equivalente en AGPI, se reduce en un 27% la mortalidad por enfermedad coronaria (Wang et al., 2016a). Hay una evidencia posible, como se muestra en la Tabla 3.2, de que la ingesta elevada de AGS pueda aumentar el riesgo de diabetes. La sustitución de estos ácidos grasos por AGPI puede disminuir ese efecto negativo (Julibert et al., 2019).

Es necesario destacar que no todos los AGS afectan de la misma manera. Los ácidos láurico, mirístico y palmítico (C12:0, C14:0 y C16:0 respectivamente) son menos recomendables que el ácido esteárico (C18:0), ya que, este último no tiene el efecto

negativo sobre los niveles de colesterol que atribuyen a los primeros (Ohlsson, 2010). Los valores recomendados de ingesta de AGS, como se muestra en la Tabla 3.2, se sitúan por debajo del 10% E para adultos sanos (Aranceta and Pérez-Rodrigo, 2012). Asimismo, para niños y adolescentes se recomienda una dieta baja en AGS, 8% E, (Tabla 3.1), ya que reducir la ingesta de AGS desde una edad temprana puede ayudar a reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular y niveles elevados de colesterol en la edad adulta (Morenga and Montez, 2017).

Como ya se trató en el Apartado 2.1., los ácidos linoleico (C18:2n-6) y  $\alpha$ -linolénico (C18:3n-3) son necesarios para el desarrollo de numerosas funciones biológicas y esenciales en la dieta porque no pueden ser sintetizados por el organismo humano. En la Tabla 3.2, se muestran las recomendaciones sobre ingesta de AGPI totales (Omega-3 y Omega-6) que se sitúan entre el 6-11% E. La ingesta recomendada de ácidos grasos Omega-6 se sitúa en torno al 4% E con un máximo de 9% E y un mínimo del 2.5% (EFSA, 2016; FAO, 2008), y las recomendaciones de ingesta para los AGPI Omega-3 en un rango del 0.5-2% E (EFSA, 2010, 2012). En concreto, la ingesta para EPA y DHA se establece para adultos sanos en 250-500 mg/día (EFSA, 2012). Para niños se establece según edad en un rango de 100 a 250 mg/día (Tabla 3.1).

La mayor parte de las publicaciones científicas sobre ingestas de lípidos recomendadas se refieren también a la relación Omega-6/Omega-3. Los ácidos grasos Omega-6 y Omega-3 no son convertibles y compiten en su metabolismo ya que comparten el mismo sistema enzimático, tienen efectos fisiológicos opuestos siendo precursores de los eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, etc.), como se trató en el Apartado 2.1. Estas moléculas derivan principalmente del EPA y AA. La ingesta de AGPI Omega-3 está asociada a una menor producción de eicosanoides inflamatorios (Calder, 2015) y se asocian a la prevención de la enfermedad cardiovascular y otras patologías relacionadas con la inflamación crónica como determinadas enfermedades intestinales (Lands et al., 2018; Scaioli et al., 2017). Estudios recientes, siguen corroborando los beneficios que desde hace décadas se han asociado a su ingesta (Bäck and Hansson, 2019). Concretamente, Hu et al. (2019) han realizado un meta-análisis de 13 ensayos clínicos aleatorios sobre la suplementación con ácidos grasos Omega-3 de origen marino (EPA, DHA). Concluyen que las reducciones de riesgo de enfermedad

coronaria y muerte por enfermedad cardiovascular se asocian linealmente con la dosis diaria de suplementos de EPA y DHA e incluso se podrían lograr mayores beneficios con dosis más elevadas que las utilizadas en esos ensayos clínicos. Por otro lado, los eicosanoides derivados del AA son mediadores proinflamatorios también necesarios para el organismo humano y biológicamente activos en cantidades muy pequeñas (Calder, 2017; Simopoulos, 2016). Sin embargo, si se forman en grandes cantidades, contribuyen a la formación de trombos, trastornos alérgicos e inflamatorios (Simopoulos, 2016). Por este motivo, una dieta rica en ácidos grasos Omega-6 cambia el estado fisiológico a uno proinflamatorio y protrombótico, con aumentos en la viscosidad de la sangre, vasoconstricción y proliferación celular (Simopoulos, 2016). Para regular la producción de mediadores proinflamatorios, derivados de los ácidos grasos Omega-6, y antiinflamatorios, derivados de los ácidos grasos Omega-3, es necesario mantener en la dieta un equilibrio Omega-6/Omega-3 (Yang et al., 2016). La proporción óptima entre las dos especies se sitúa en 1-5/1 (Simopoulos, 2008; Yang et al., 2016). Son numerosos los estudios clínicos aleatorios en humanos que indican que una relación de los ácidos grasos Omega-6/Omega-3 baja reduce la agregación plaquetaria, la coagulación y el riesgo de trombosis y en general, la respuesta inflamatoria del organismo (Dinicolantonio and O'Keefe, 2018; Dinicolantonio and O'Keefe, 2019). Ejemplo de ello, es el estudio realizado por Nelson y Hickey (2004) en el que se reduce la ingesta de LA con ALA en adultos con peso normal y con sobrepeso y, en un periodo de tiempo de 4 días, se obtuvo para ambos grupos una reducción de los receptores proinflamatorios. También, en un estudio reciente sobre la incorporación de LA y ALA en células endoteliales y la producción de mediadores antiinflamatorios cuando se exponen a diferentes proporciones de los dos ácidos grasos, confirma que una relación LA/ALA baja ejerce efectos antiinflamatorios y, sugiere que el LA en ese modelo celular de inflamación endotelial puede no ser proinflamatorio (Bork et al., 2019).

Sin embargo, en dietas occidentales, la relación Omega-6/Omega-3 está en 15-20/1 (Simopoulos, 2016). El desequilibrio en la ingesta de estas familias de ácidos grasos es desmesurado debido a que la industria ha dado lugar a producciones excesivas de aceites y grasas ricas en ácidos grasos Omega-6 frente a una producción más reducida de aceites y grasas ricas en ácidos grasos Omega-3 (Simopoulos, 2002). El aumento en

el consumo de ácidos grasos Omega-6 se remonta a principios del siglo pasado debido al desarrollo de la tecnología de la industria del aceite vegetal, y al comienzo de la alimentación del ganado doméstico con granos que son ricos en ácidos grasos Omega-6 (Simopoulos, 2002). El desequilibrio Omega-6/Omega-3 repercute negativamente en la regulación de los procesos de inflamación del organismo y en consecuencia en el sistema cardiovascular como se ha tratado anteriormente. Además, ese desequilibrio LA/ALA prolongado en la ingesta, también se ha asociado a afecciones neurológicas por los cambios que puede ejercer en el sistema endocannabinoide cerebral encargado de la regulación de los procesos cognitivos y emocionales (Zamberletti et al., 2017).

De este modo, las tendencias actuales del mercado alimentario, están en consonancia con las conclusiones que se derivan de la investigación actual en esta materia y llevan a sustituir aceites alimentarios vegetales ricos en ácidos grasos Omega-6, como el de girasol, por aceites ricos en ácidos grasos Omega-3 como los de chía, pescado, etc.

### **3.1.2. Fuentes de ácidos grasos Omega-6 y Omega-3**

En general, las principales fuentes de ácidos grasos Omega-3 son de origen marino mientras que las principales fuentes de ácidos grasos Omega-6 son de origen vegetal.

#### **3.1.2.1. Principales fuentes de ácidos grasos Omega-6**

Los aceites vegetales constituyen una fuente importante de ácidos grasos Omega-6, aunque su composición varía según su origen y proceso tecnológico al que haya sido sometido. La Tabla 3.3, muestra el porcentaje en peso de cada familia de ácidos grasos de los principales aceites vegetales comerciales (Orsavova et al., 2015). Los aceites vegetales muestran una composición elevada en AGMI y AGPI, siendo los ácidos grasos más predominantes en los perfiles lipídicos vegetales el palmítico (C16:0), linoleico (C18:2n-6) y oleico (C18:1n-9)(Akoh, 2008). También el ácido esteárico (C18:0) suele ser un componente menor en la mayoría de los aceites vegetales (Akoh, 2008). Dentro de los AGPI el porcentaje de ácidos grasos de la serie Omega-3 es prácticamente testimonial frente a la elevada composición en ácidos grasos Omega-6. En el aceite de coco se observa que el porcentaje de ácidos grasos saturados es considerablemente más elevado que en el resto de aceites vegetales en detrimento de los

ácidos grasos insaturados. Los más utilizados a nivel mundial son el aceite de soja, palma, colza y girasol (Akoh, 2008).

Tabla 3.3 Composición en ácidos grasos de aceites vegetales comerciales. Adaptado de Orsavova *et al.*(2015).

Aceites (% Ácidos grasos)	AGS	AGMI	AGPI	Omega-3	Omega-6
Almendra	9.3	67.9	22.8	0.0	22.8
Cacahuete	10.7	71.1	18.2	0.0	18.2
Cáñamo	9.2	28.1	62.8	0.4	62.4
Cártamo	9.3	11.6	79.1	0.1	79.0
Coco	92.1	6.2	1.6	0.0	1.6
Colza	6.3	72.8	20.9	1.2	19.6
Girasol	9.4	28.3	62.4	0.2	62.2
Oliva	19.4	68.2	18.0	1.6	16.4
Palma	49.1	39.9	11.0	0.5	10.5
Salvado de arroz	22.5	44	33.6	0.5	33.1
Semilla de calabaza	19.6	26.1	54.3	0.1	54.2
Sésamo	16.9	42	41.2	0.2	40.9
Soja	16.1	26.2	57.7	5.9	51.8
Uva	10.4	14.8	74.9	0.2	74.7

### 3.1.2.2. Principales fuentes de ácidos grasos Omega-3

El mayor contenido de ácidos grasos Omega-3 se encuentra en especies marinas como peces, krill y microalgas. La fuente de ácidos grasos Omega-3 más utilizada desde el punto de vista industrial ha sido el aceite de pescado. La composición y contenido lipídico de los peces varía según diversos factores como la especie, estación del año, salinidad, etc. (García-Moreno *et al.*, 2013). La creciente demanda de producción de EPA y DHA en el mercado alimentario a partir de aceite de pescado se traduce en un consumo no sostenible de recursos naturales y genera un impacto ambiental importante (Finco *et al.*, 2016). También, el crecimiento del consumo de animales de piscifactoría, que son alimentados con una dieta a base de pescado y harina de pescado, consume recursos animales y no es sostenible. Esto ha provocado una demanda de productos de

alimentación para estos peces que son alternativas sostenibles de origen terrestre, pero que no tienen el mismo valor nutritivo ya que no contienen EPA y DHA en su composición. Para solucionar este inconveniente, una vía de investigación todavía en desarrollo, es la producción de aceites vegetales a partir de semillas terrestres transgénicas enriquecidas en EPA y DHA (Bimbo, 2013; Sprague and Tocher, 2017) y el uso de microalgas modificadas genéticamente (Betancor et al., 2017). Los estudios más recientes y con mejores resultados sobre el uso de aceites de cultivos transgénicos como ingredientes en alimentación para peces para mejorar su perfil lipídico han sido con *Camelina Sativa* transgénica (Betancor et al., 2017).

Por otro lado, desde hace años la investigación científica se ha dirigido hacia la búsqueda de nuevas fuentes de ácidos grasos Omega-3 alternativas al pescado, como el aceite de krill, de interés por su elevado contenido en EPA y DHA y en fosfolípidos (Bimbo, 2013). Sin embargo, aún se requieren más avances para corroborar que la captura de krill se encuentra en niveles sostenibles para mantener el equilibrio ambiental (Adarme-Vega et al., 2014). Otra fuente cada vez más relevante y de creciente interés es el uso de microalgas, hongos y bacterias marinas, es decir, organismos unicelulares capaces de producir ácidos grasos Omega-3. Sin embargo, se necesita el estudio y desarrollo de procesos más rentables capaces de satisfacer la demanda de producción de estos ácidos grasos a partir de estas fuentes (Finco et al., 2016). *C. conhii* y *Schizochytrium* son las especies de microalgas más utilizadas para la producción de DHA (Ansorena and Astiasarán, 2013). El contenido en lípidos de *Schizochytrium* puede ser superior al 50% de su composición, del que el 17% y el 42% son ácidos grasos Omega-6 y Omega-3, respectivamente. Los desarrollos en este campo, se centran en aumentar el contenido de EPA en los aceites de microalgas a partir de nuevas cepas de *Schizochytrium* con contenidos de EPA entre 10 y 16% (Fedorova-Dahms et al., 2011). Ferreira et al. (2019), realizaron una revisión sobre la producción de lípidos funcionales a partir de las microalgas más estudiadas tanto de agua dulce como de agua de mar. En esta revisión, evalúan cómo las condiciones y los sistemas de cultivo son elementos decisivos en el rendimiento del proceso. Así, el suministro de CO<sub>2</sub> y luz a los cultivos de microalgas promueve una mayor productividad de AGPI. Además, proponen a la especie *Chlorella* como candidato potencial para el cultivo en instalaciones industriales, ya que, ha mostrado un alto contenido en AGPI, alrededor de un tercio de

su composición lipídica, y además, es capaz de crecer en condiciones adversas como pueden ser aguas residuales utilizadas como medio de cultivo para su aprovechamiento (Ferreira et al., 2019).

La Tabla 3.4 muestra el porcentaje en peso de las principales familias de ácidos grasos en aceites comerciales procedentes de distintas especies marinas.

Tabla 3.4 Composición en ácidos grasos de aceites marinos comerciales (Bimbo, 2013; Morales-Medina et al., 2013, 2015a). \* Microalgas, hongos y bacterias marinas.

Aceites (% Ácidos grasos)	AGS	AGMI	Omega-3	EPA+DHA
Krill (Antártico)	37.0	30.0	28.0	23.0
Anchoa (Mediterráneo)	36.0	29.0	30.0	26.0
Sardina (Mediterráneo)	38.0	17.0	36.0	24.2
Jurel (Mediterráneo)	47.0	26.0	27.0	23.7
Bacalao (Mediterráneo)	21.0	44.0	27.0	23.0
Bacalao (Pacífico)	22.0	28.0	42.0	38.0
Bacaladilla (Mediterráneo)	27.1	37.3	28.9	24.6
Salmón (Pacífico)	21.0	32.0	27.0	20.0
Anguila (Pacífico)	23.0	42.0	29.0	22.0
Organismos Unicelulares y microalgas *				
<i>Ulkenia</i>	39.0	0.0	47.0	46.0
<i>Schizochytrium</i>	42.0	5.0	42.0	41.0
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	38.0	17.0	42.0	42.0
<i>Yarrowia lipolytica</i>	6.0	7.0	43.0	36.0
<i>Marine Chlorella</i>	23.0	27.0	39.0	37.0

Otra fuente alternativa rentable y competitiva a nivel industrial es el aceite de pescado procedente de descartes pesqueros. Los descartes de pesca son la parte de la captura total que no se retiene para la venta y es devuelta al mar (García-Moreno et al., 2013). Estos descartes suponen un problema económico y medioambiental por lo que diversos organismos internacionales han puesto en marcha políticas para prohibir esta práctica (Blanco et al., 2018). En este contexto, existen estudios interesantes sobre el aprovechamiento de los descartes para desarrollar productos de alimentación y aplicaciones farmacéuticas, dado que, su composición bioquímica contiene proteínas de

gran valor y lípidos con un elevado contenido en ácidos grasos Omega-3, EPA y DHA principalmente (Pérez-Gálvez et al., 2018). Como ejemplo, la Tabla 3.5 muestra el porcentaje de los ácidos grasos EPA y DHA de aceite extraído de las principales especies de descarte en el Mar de Alborán en la estación de verano (Morales-Medina et al., 2015a).

Tabla 3.5 Porcentaje en peso de EPA y DHA en el aceite extraído de las principales especies de descartes del Mar de Alborán en verano. Adaptado de Morales-Medina *et al.* (2015).

% AG	Aligote	Bacaladilla	Boga	Jurel	Pintarroja	Sardina
<b>EPA+DHA</b>	21.4	24.6	24.6	23.7	26.6	24.2

En la misma línea, Vázquez et al. (2019), realizaron un estudio de valorización de cinco especies de descarte de pesca (Bacaladilla, Escacho, Caballa, Pez Escorpión Rojo y Faneca) en el que entre otros desarrollos, como la obtención de hidrolizados con propiedades antihipertensivas y antioxidantes, también aislaron y obtuvieron aceites de pescado con una relación de ácidos grasos Omega-3/Omega-6 superior a 5.6 y porcentajes de EPA+DHA entre el 12.5 y 25%.

### 3.1.3. Lípidos funcionales y diseño de productos

Los avances en nutrición y medicina evidencian la estrecha relación que existe entre alimentación y salud. El consumidor demanda productos de alimentación que no solamente nutran sino que además ayuden a mejorar la salud e incluso a prevenir ciertas patologías. Por este motivo, la industria alimentaria destina grandes esfuerzos al diseño de productos que aporten beneficios al organismo humano. Se estima que en el año 2021 se inviertan en los países desarrollados más de 300 mil millones de dólares en el desarrollo de este tipo de productos alimenticios, denominados funcionales (Domínguez Díaz et al., 2020).

El organismo encargado en la Unión Europea de evaluar y validar los expedientes sobre la evidencia científica de las alegaciones de salud de un alimento funcional es la EFSA (Autoridad Europea para la Seguridad de los Alimentos). El proceso de validación es estricto e implica tres criterios: 1) que la sustancia bioactiva esté suficientemente caracterizada, 2) la declaración propuesta debe comprender un efecto fisiológico

beneficioso y 3) se debe establecer una relación de causa y efecto entre la sustancia bioactiva y el efecto fisiológico beneficioso (De Boer et al., 2016).

Los lípidos funcionales son lípidos con una función nutricional y fisiológica que aportan beneficios específicos sobre la salud cuando se consumen, como son los AGPI, AGMI, fosfolípidos y fitoesteroles. En la industria alimentaria, es común denominar también como lípidos funcionales aquellos que aportan una funcionalidad específica en base a sus propiedades fisicoquímicas, que ayuden al desarrollo y formulación del producto alimentario. Así, los ácidos grasos de cadena media, por ejemplo, además de su uso como fuente de grasa para nutrición médica en pacientes con síndromes de malabsorción de grasa y bebés prematuros, han sido muy valorados por tecnólogos y formuladores de alimentos por sus atributos físicos como la solubilidad y calidad organoléptica (Akoh, 2006).

Los ácidos grasos Omega-6 y Omega-3 son los lípidos funcionales por excelencia que se encuentran de forma natural mayoritariamente en aceites comestibles vegetales y marinos. Como se trató anteriormente, la población en numerosos países del mundo tiene una ingesta demasiado baja de EPA y DHA por su bajo consumo de especies marinas. Así, desde hace años, la industria alimentaria ha concentrado sus esfuerzos en la introducción de aceites de pescado, krill y algas en alimentos para atenuar el desequilibrio de los ácidos grasos Omega-6/Omega-3 en las dietas. Incluso se modifican dietas animales para el enriquecimiento de productos cárnicos, huevos y lácteos (Bernardi et al., 2016; Jacobsen et al., 2013a). Así por ejemplo, Bruneel et al.(2013), realizaron un estudio en el que se suministraron microalgas (5-10%) en la dieta de gallinas ponedoras para enriquecer los huevos con ácidos grasos Omega-3. Obtuvieron entre 2.1-3.3 mg de EPA y 42.9-48.7 mg de DHA por huevo, confirmando que la composición de ácidos grasos de la yema de huevo se ve significativamente afectada por la dieta de las gallinas (Coorey et al., 2015). Por otro lado, existen numerosos productos en el mercado enriquecidos en ácidos grasos Omega-3 como productos horneados, lácteos, salsas, huevos, fórmulas infantiles y nutraceuticos (Birch and Bonwick, 2019). En la Tabla 3.6 se muestran ejemplos de distintos productos en el mercado enriquecidos con ácidos grasos Omega-3.

Tabla 3.6 Ejemplos de productos enriquecidos en Omega-3 en el mercado mundial. Adaptado de Jacobsen et al.(2013).

Tipo de producto	Ejemplos en el mercado
Pan y productos horneados	Diamant Vital Omega-3 Kruste, (Diamant Mühle, Alemania)
	Tip Top Up, Pan en rebanadas y magdalenas (Tip Top bakeries, Australia)
	Nutribread (William Jackson Bakery, Reino Unido)
Leche y derivados	Leche Puleva Omega-3 (Lactalis Puleva, España)
	Mleko leche Omega-3-UHT (SM Sudowa, Polonia)
	Omi-3 yogurt (SM Siedlece, Polonia)
	Plus Omega-3-Leche y Omega-3-yogurt (Parmalat, Italia)
Zumos y refrescos	Zumo Tidal Wave Superfood (Naked Juice, California, USA)
	Zumos Bertrams Omega funcional (Bertrams, Reino Unido)
	My way wellness drink (Designer Foods, Alemania)
	Chikara Mizu soft drink (Kirin Breweries, Japón)
Huevos	Huevos DHA Gold (Omega Tech, USA)
	Huevos Oro Omega-3 (Unione Cascine Vapladana, Italia)
	Huevos plus (Polgrim's Pride, USA)
Productos cárnicos	Salchichas Strasburg (Hans, Australia)
	Hamburguesas Omega cool (Pals, Noruega)
	Omega-3 Jamón Cocido (Cárnicas Serrano, España)

La incorporación de lípidos funcionales a alimentos presenta desafíos relacionados con la solubilidad, con las características organolépticas (olor, sabor, color, textura) y especialmente con la estabilidad física y oxidativa. Los aceites ricos en ácidos grasos Omega-3 pueden ser incorporados a una matriz alimentaria directamente, o bien, incorporados como aceites preemulsionados a través de técnicas de emulsión o encapsulado. Dependiendo de la matriz alimentaria a enriquecer, una técnica para incorporar los ácidos grasos Omega-3 puede ser más adecuada que otra. Así, Let et al.(2007) evaluaron la incorporación directa de aceite de pescado y de aceite de pescado preemulsionado en leche, yogur y aderezos para ensalada. Encontraron que la incorporación directa del aceite aumentaba la estabilidad oxidativa en el caso de yogurt y los aderezos, mientras que el uso de una preemulsión, mejoraba la estabilidad de la leche enriquecida en ácidos grasos Omega-3. En un estudio sobre la elaboración de nuggets de pollo congelados enriquecidos con microcápsulas de ácidos grasos Omega-3 utilizando aceite de pescado, se mostró el efecto protector de la microencapsulación contra la oxidación de lípidos especialmente durante el primer mes de almacenamiento y además, las características sensoriales no se vieron afectadas por el enriquecimiento (Jiménez-Martín et al., 2016).

También, es posible incrementar el contenido de ácidos grasos Omega-3 directamente en los aceites comestibles mediante métodos físicos como la cristalización a baja temperatura, destilación molecular, complejación con urea, extracción con fluidos supercríticos (Muggli, 2007). Ejemplo de ello, es el estudio realizado por Vázquez and Akoh (2012) en el que se aumentó el contenido de ácido estearidónico (SDA, C18:4n-3) de aceite de soja mediante cristalizaciones a baja temperatura de un contenido inicial del 23% hasta un 45% de SDA. Así, ese aceite enriquecido obtenido podría usarse como ingrediente de partida para la producción de alimentos funcionales. También mediante métodos enzimáticos, que usan enzimas específicas en reacciones de esterificación, interesterificación, acidólisis o glicerólisis, puede incrementarse en los aceites el contenido en estos ácidos grasos esenciales. Estos métodos enzimáticos son la base para el desarrollo de los llamados lípidos estructurados.

Los lípidos estructurados son lípidos modificados por procesos químicos o enzimáticos que presentan una composición de ácidos grasos determinada con un propósito concreto

y teniendo en cuenta las posiciones en la cadena principal del glicerol de partida (Akoh, 2006; Morales-Medina et al., 2013). Existen distintas variedades de lípidos estructurados en forma de MAG, DAG y TAG, siendo estos últimos, los que más frecuentemente se diseñan para lograr unos efectos metabólicos específicos para el tratamiento de determinadas patologías o para ciertas deficiencias en la nutrición (Hashempour-Baltork et al., 2016). Estos TAG estructurados se diseñan teniendo en cuenta los mecanismos de absorción y transporte de ácidos grasos en el organismo humano. Como se trató en el Apartado 2.1., la estructura del TAG que se mantiene “inalterada” durante el proceso de digestión es la 2-MAG, ya que, las lipasas del aparato digestivo son específicas para las posiciones externas (sn-1,-3). De esta manera, el ácido graso situado en la posición central (sn-2) del TAG será el que mejor se absorba (Xu, 2000). Los ácidos grasos, especialmente los AGPI, tienen una estructura lábil por lo que el proceso de síntesis de los TAG estructurados más adecuado es el enzimático (Morales-Medina et al., 2013). Se emplean lipasas para producir TAG funcionales “a medida” con una regiodistribución de los ácidos grasos específica. La regiodistribución de más interés para nutrición clínica es la MLM que tiene ácidos grasos de cadena media (M) en las posiciones externas del TAG (sn-1,-3) y ácidos grasos esenciales (Omega-3, Omega-6), que son de cadena larga (L), en la posición central (sn-2) (Morales-Medina et al., 2013). Los ácidos grasos de cadena media, situados en las posiciones externas del TAG son una fuente de energía inmediata, mientras que, los ácidos grasos de cadena larga, de más difícil digestión, al estar situados en la posición central, permanecerán en esa región y esto facilitará su absorción. De este modo, Marín-Suárez et al. (2017), propusieron un tratamiento enzimático basado en la interesterificación de aceite de sardina con aceite de girasol alto oleico, para producir aceites con mayor contenido en ácidos grasos funcionales en la posición sn-2 de los TAG.

### 3.2. Estabilidad oxidativa de los AGPI Omega-3

La oxidación de los lípidos funcionales altera sus propiedades bioactivas, varía la calidad organoléptica y reduce la vida útil de los productos a los que son incorporados.

La estabilidad oxidativa de un producto de alimentación está influenciada, además de por los factores catalíticos de su entorno (oxígeno, temperatura, luz, iones metálicos, etc.), por su procesado y de manera determinante, por su composición y estructura lipídica. Los AGPI son altamente susceptibles a la oxidación debido a su elevado grado de insaturación. La distribución de los ácidos grasos en el TAG también desempeña un papel importante en esa susceptibilidad (Shahidi and Zhong, 2010). Así, hay estudios que revelan que la ubicación de AGPI en la posición central del esqueleto de glicerol ayuda a su estabilidad frente a la oxidación (Shen and Wijesundera, 2009). La oxidación lipídica ocurre por tres mecanismos posibles: autooxidación inducida por oxígeno molecular ( $O_2$ ), fotooxidación inducida por oxígeno singlete ( $*O_2$ ) y en menor medida por la oxidación enzimática producida por enzimas lipoxigenasas (Frankel E.N., 2005). La fotooxidación juega un papel importante en el inicio de la autooxidación lipídica. La Figura 3.1 muestra un esquema de estos dos mecanismos más determinantes. La fotooxidación tiene lugar en presencia de una fuente de energía luminosa, oxígeno y compuestos que se excitan electrónicamente cuando son activados por la luz como pueden ser determinados pigmentos (Min and Boff, 2002). Estos compuestos excitados electrónicamente al reaccionar con oxígeno dan lugar a oxígeno singlete que reacciona con los lípidos insaturados formando compuestos de oxidación primaria denominados, hidroperóxidos (LOOH).

En la autooxidación lipídica se diferencian tres etapas: iniciación, propagación y terminación. Los hidroperóxidos procedentes de la fotooxidación se descomponen en radicales libres por la acción de iniciadores como el calor y la presencia de iones metálicos. Estos radicales a su vez, reaccionan con lípidos insaturados (LH) a los que extraen un radical hidrógeno ( $H\bullet$ ) y se generan radicales lipídicos libres ( $L\bullet$ ) que reaccionan con oxígeno produciendo radicales peroxilo ( $LOO\bullet$ ). Los radicales peroxilo reaccionan con moléculas de lípidos insaturados y se vuelven a generar hidroperóxidos y radicales lipídicos libres de forma continuada hasta alcanzar el nivel máximo de

formación de hidroperóxidos, a partir del cual, se descompondrán en radicales alcoxilo ( $\text{LO}\cdot$ ), que a través de sucesivas reacciones (reacciones de escisión  $\alpha$  y  $\beta$ , recombinación de radicales, etc.) en la etapa de terminación, formarán una serie de productos de oxidación secundaria (aldehídos, cetonas, alcoholes, etc.) (Akoh, 2008; Schaich et al., 2013).

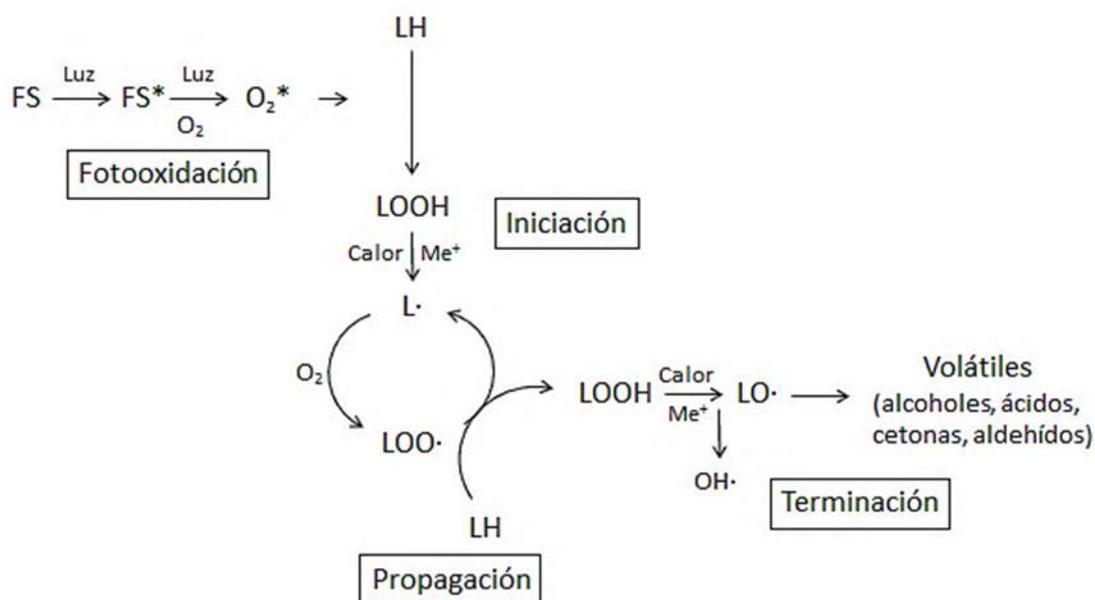


Figura 3.1 Mecanismos de oxidación lipídica. Adaptado de Muggli R. (2007). FS-Compuesto fotosensible, LH-Lípido insaturado, LOOH-Hidroperóxidos,  $\text{LOO}\cdot$ -Radical peróxido,  $\text{LO}\cdot$ -Radical alcoxilo,  $\text{L}\cdot$ -Radical lipídico.

Los hidroperóxidos no poseen olor ni sabor, sin embargo, los productos de oxidación secundaria se caracterizan por su volatilidad, mal olor y sabor. Algunos de los productos de oxidación secundaria más comunes de los ácidos grasos Omega-3 son el propanal, 2-pentenal, 3-hexenal, 4-heptenal, 2,4-heptadienal, 2,6-nonadienal y 2, 4, 7-decatrienal. El sabor y olor que generan estos compuestos son muy característicos, a rancio y a pescado. Además, es importante destacar que el consumidor tiene el umbral bajo para detectar sabores de este tipo a niveles menores que los sabores desagradables formados debido a la oxidación de los ácidos grasos Omega-6 (Frankel E.N., 2005).

En conclusión, la oxidación de los lípidos da lugar a la formación de olores y sabores indeseables, compuestos no saludables y en casos extremos se puede hasta reducir el nivel de AGPI con la consecuente pérdida del valor nutricional de los lípidos en cuestión (Jacobsen et al., 2013b). Por tanto, un requisito indispensable para el desarrollo

de productos enriquecidos en AGPI es evitar o al menos retrasar el mayor tiempo posible la oxidación.

### 3.2.1. Antioxidantes

Para lograr la estabilidad oxidativa en aceites y productos de alimentación enriquecidos en AGPI es necesaria la intervención de determinados compuestos con propiedades antioxidantes que inhiban o prevengan la oxidación lipídica. Además, hay tener en cuenta el manejo de estos productos durante su procesado, almacenamiento, etc. Así, en los aceites marinos y otros aceites comestibles, se sabe que las sucesivas etapas de extracción y refinado tienen un impacto negativo en la estabilidad oxidativa. Esto es debido a que en ellas puede haber exposición directa al oxígeno y además, se puede producir la eliminación de antioxidantes intrínsecos a la materia prima o aceite crudo como  $\alpha$ -tocoferol, ubiquinona (Q10), ácido ascórbico, carotenoides, aminoácidos y proteínas (Oterhals and Berntssen, 2010). De este modo, hay que extremar la precaución en estas etapas para que se retengan estos componentes en el aceite refinado, que junto con la adición de otros antioxidantes extrínsecos, logren una estabilidad oxidativa en el tiempo.

Los productos de alimentación pueden presentar distintos componentes y fases. En estos casos, la eficacia de un antioxidante no es fácilmente predecible. En sistemas alimentarios complejos esta eficacia está influenciada por diversos factores, como la calidad de las materias primas, procesado y composición de la matriz alimentaria, todos ellos a tener en cuenta en su elección (Jacobsen, 2010). Además, también se ve afectada por la concentración del antioxidante en la matriz, ya que puede ocurrir que a concentraciones altas el antioxidante provoque el efecto contrario (Jacobsen et al., 2013b; Yordi et al., 2012).

Los antioxidantes se clasifican en función de su mecanismo de actuación, aunque algunos pueden presentar más de uno. En general, se dividen en dos grandes grupos: antioxidantes primarios y antioxidantes secundarios (Frankel E.N., 2005). Los antioxidantes primarios, se caracterizan por su capacidad de captar radicales libres peróxido y alcoxilo que generan y propagan la oxidación y convertirlos en productos más estables. Los antioxidantes secundarios pueden inhibir la oxidación por

mecanismos diferentes, actuando como agentes reductores o quelantes de iones metálicos, que son potentes catalizadores de las reacciones de oxidación, o como atrapadores de oxígeno. Los antioxidantes primarios y secundarios suelen presentar efectos sinérgicos por lo que se suelen usar de manera conjunta (Aubourg et al., 2004). Por otro lado, dependiendo de su origen se distingue entre antioxidantes sintéticos y antioxidantes naturales. También existen determinados compuestos que poseen cierta sinergia con los antioxidantes y se utilizan conjuntamente en alimentos; entre ellos podemos citar determinados antimicrobianos y moduladores de pH como lactatos, fosfatos, citratos, tartratos, malatos y derivados del ácido adípico (Carocho et al., 2017, 2018). En la Tabla 3.7, se incluye la lista de aditivos alimentarios antioxidantes y sinérgicos aprobados por la EFSA con su clase, nombre y número E. Aunque la procedencia natural y sintética de los antioxidantes no se indica en las tablas oficiales, que muestran las cantidades y los permisos de uso de cada aditivo en cada tipo de alimento (Carocho and Ferreira, 2013), es importante distinguir entre uno y otro grupo, ya que, el consumidor demanda aditivos de origen natural y las tendencias actuales de mercado y en investigación van orientadas a la sustitución de antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturales.

Tabla 3.7 Lista de antioxidantes alimentarios y sinérgicos aprobados por la EFSA. Adaptado de Carocho et al.(2018).

Aditivo	Nombre	Número E
Ascorbatos	Ácido ascórbico	300
	Ascorbato sódico	301
	Ascorbato cálcico	302
	Ésteres de ácido ascórbico	304
Tocoferoles	Extracto de tocoferol	306
	$\alpha$ Tocoferol	307
	$\gamma$ Tocoferol	308
	$\delta$ Tocoferol	309
Galatos	Galato de propilo	310
	Galato de octilo	311
	Galato de dodecilo	312
Eritorbatos	Ácido eritórbico	315
	Eritorbato sódico	316
Butilatos	Terbutilhidroquinona (TBHQ)	319
	Butilhidroxianisol (BHA)	320
	Butilhidroxitolueno (BHT)	321

Aditivo	Nombre	Número E
Lactatos	Lactato sódico	325
	Lactato potásico	326
	Lactato cálcico	327
Citratos	Ácido cítrico	330
	Citratos sódicos	331
	Citratos potásicos	332
	Citratos cálcicos	333
	Citrato triamónico	380
Tartratos	Ácido tartárico	334
	Tartratos sódicos	335
	Tartratos potásicos	336
	Tartrato mixto de sodio y potasio	337
	Ácido metatartrárico	353
	Tartrato cálcico	354
Fosfatos	Ácido fosfórico	338
	Fosfatos sódicos	339
	Fosfatos de potásico	340
	Fosfatos cálcicos	341
	Fosfatos de magnesio	343
Malatos	Malatos sódicos	350
	Malatos de potasio	351
	Malatos cálcicos	352
Adipatos	Ácido adípico	355
	Adipato sódico	356
	Adipato potásico	357
Etilendiaminotetracéticos (EDTA)	EDTA cálcico disódico	385
Romero	Extracto de romero	392

### 3.2.1.1. Antioxidantes sintéticos

El uso de antioxidantes sintéticos se remonta al siglo pasado y han sido ampliamente utilizados en alimentación. Entre ellos destacan el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y terbutilhidroquinona (TBHQ). Estos son compuestos fenólicos muy eficaces para romper enlaces porque pueden donar átomos de hidrógeno a los radicales libres y producir radicales fenoxilo relativamente estables, ya que, en el radical fenoxilo, el electrón no apareado se deslocaliza alrededor del anillo aromático y se estabiliza por una energía de alta resonancia (Jacobsen et al., 2013b). Esa efectividad hace que se utilicen habitualmente también para la protección de aceites vegetales comerciales con alto contenido en AGPI. Como ejemplo, en un estudio comparativo de distintos antioxidantes (TBHQ, palmitato de ascorbilo, extracto de romero y  $\alpha$ - $\tau$ - y  $\delta$

tocoferol) en el que se evaluó el índice de estabilidad a distintos aceites vegetales comerciales como el aceite de girasol alto oleico, colza alto oleico, colza muy alto oleico y cártamo alto oleico, se confirmó que la adición de TBHQ en solitario o en combinación con otros antioxidantes como el palmitato de ascorbilo, dieron el mayor incremento en la estabilidad oxidativa de los aceites estudiados comparados con los otros antioxidantes utilizados, alcanzando un máximo de estabilidad oxidativa de 55.7 horas en el aceite de girasol alto oleico con TBHQ en combinación con palmitato de ascorbilo y mezcla de tocoferoles (Merrill et al., 2008). Sin embargo, el uso de estos compuestos fenólicos sintéticos está restringido por los posibles efectos secundarios sobre la salud humana (Carocho and Ferreira, 2013; Ito et al., 1985).

También son usados frecuentemente en la industria, y su inocuidad no está tan cuestionada, determinados ácidos y sus derivados como el etilendiaminotetracético (EDTA), que actúan como desactivadores de metales o agentes quelantes, o como el palmitato de ascorbilo (PA), galatos de propilo (GP), octilo (GO) y dodecilo (GD) que actúan como atrapadores de oxígeno y evitan enranciamiento (Reische et al., 2002; Wreesmann, 2011).

Los antioxidantes sintéticos además de su eficacia suelen tener un bajo coste y alta estabilidad en alimentos. Sin embargo, hay distintos estudios en matrices alimentarias con ácidos grasos Omega-3 en los que la eficacia de estos antioxidantes es diferente. Así, en aderezos para ensaladas y mayonesas enriquecidas en ácidos grasos Omega-3, el EDTA, por su efecto quelante de iones metálicos, resulta ser un buen antioxidante en estas matrices en las que los metales de transición juegan un papel determinante como potentes catalizadores de la oxidación lipídica (Let et al., 2007a). De esta manera, el EDTA es capaz de reducir la formación de radicales libres, hidroperóxidos lipídicos, compuestos volátiles y sabores a rancio y pescado (Jacobsen et al., 2001a; Let et al., 2007a). Sin embargo, en matrices como la leche y bebidas lácteas enriquecidas en ácidos grasos Omega-3, en las que parece tener menor importancia en la oxidación el efecto catalítico de los metales de transición, principalmente por su menor contenido en hierro en comparación con los aderezos y mayonesas (Jacobsen et al., 2008a), no reduce la formación de volátiles pero si la formación de sabores desagradables (Timm-Heinrich et al., 2004). Por otro lado, en otro tipo de productos como las barritas energéticas

enriquecidas en ácidos grasos Omega-3, no solo no protege contra la oxidación sino que además disminuye su estabilidad oxidativa (Nielsen and Jacobsen, 2009). Otros antioxidantes estudiados como el palmitato de ascorbilo y el galato de propilo en las mismas matrices, ejercen una función prooxidativa que puede deberse a su capacidad para reducir  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  (Kristinova et al., 2014; Murakami et al., 2000), sobre todo en mayonesas enriquecidas en las que se puede liberar el hierro unido a las proteínas en la yema de huevo (Jacobsen et al., 2008b; Let et al., 2007a). Esto da una idea de la complejidad de la estabilidad oxidativa en los productos de alimentación enriquecidos en AGPI, ya que, factores muy diferentes, como el pH, las distintas fases del alimento, componentes y calidad de las materias primas, aditivos, procesado, almacenamiento e incluso el tipo de AGPI (Omega-3, Omega-6) pueden influir en la eficacia de los antioxidantes sintéticos y también en los naturales (Frankel E.N., 2005; Jacobsen, 2010; Jacobsen et al., 2008b; Timm-Heinrich et al., 2004).

A pesar del uso extendido de los antioxidantes de origen sintético, uno de los retos científicos en alimentación en estas últimas décadas ha sido y es el desarrollo de compuestos antioxidantes de origen natural, como los derivados de proteínas alimentarias, vitaminas y extractos de plantas (Shahidi, 2000).

### **3.2.1.2. Antioxidantes de origen natural**

El estudio y uso cada vez más extendido de antioxidantes naturales se debe a sus buenos perfiles de seguridad alimentaria que los hacen más atractivos para el consumidor. Además, estos aditivos naturales pueden contener diferentes compuestos con distintas propiedades antioxidantes, que pueden prevenir y reducir la oxidación lipídica por diferentes mecanismos en sistemas complejos como los alimentos procesados (Jacobsen et al., 2019).

Los tejidos vegetales contienen numerosos compuestos bioactivos, entre ellos, potentes antioxidantes que han sido utilizados en alimentación durante siglos para preparar y conservar alimentos (De Paula Paseto Fernandes et al., 2018). Estos compuestos antioxidantes principalmente son compuestos fenólicos que derivan del metabolismo secundario de la mayoría de las plantas y se pueden dividir en diferentes clases: ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, cumarinas, lignanos, chalconoides,

flavonoides, ligninas y xantonas (Carocho and Ferreira, 2013; Carocho et al., 2018). La mayoría de los polifenoles tienen algún tipo de actividad biológica, ya sea antiinflamatorio, antimicrobiano, antioxidante o antitumoral (Carocho and Ferreira, 2013). Uno de los extractos vegetales más estudiados es el de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) cuyo contenido en polifenoles con alto poder antioxidante es muy elevado. Los principales polifenoles en el extracto de romero son el ácido carnósico, ácido rosmarínico, carnosol y rosmaridifenol y menos relevantes son también otros compuestos diterpenoides, flavonoides y derivados del ácido hidroxicinámico (Berdahl and McKeague, 2015). Este extracto, tiene la capacidad de actuar como un agente reductor al donar átomos de hidrógeno a través de sus compuestos fenólicos (Masuda et al., 2001). El extracto de romero es utilizado en numerosos productos de alimentación como aceites, salsas, caldos, carnes y pescados procesados, leche deshidratada, snacks (Carocho et al., 2018). Actualmente, es el único extracto vegetal que está incluido en la lista europea de aditivos alimentarios, con el número E-392 (Reglamento de la UE 1129/2011) y está considerado por su seguridad como aditivo *Quantum Satis*, es decir, que no tiene una ingesta diaria admisible (mg/Kg peso corporal) y se puede incorporar a los alimentos en la cantidad necesaria para el procesado del producto, de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación (Carocho et al., 2018). Puede ser utilizado en solitario o bien con otros antioxidantes (Hraš et al., 2000; Moen et al., 2017). Su capacidad antioxidante también se ha evaluado en distintas matrices alimentarias con ácidos grasos Omega-3 en su composición. Así, en leche enriquecida con aceite de pescado, el extracto de romero en concentraciones de 100 y 300 mg/kg de producto aumenta la estabilidad oxidativa del producto enriquecido. Esto se debe a que disminuye la formación de hidroperóxidos lipídicos y productos de oxidación secundaria, aunque en el panel sensorial se detecta sabor al extracto (Sørensen, 2010). Sin embargo, en otras matrices como surimi enriquecido con aceite de pescado parece tener efectos prooxidativos débiles cuando se usa en una concentración de 750 mg/kg de producto (Perez-Mateos et al., 2006), a pesar de que en estudios previos en geles comestibles elaborados con carne de caballa, se apreciaba mejoría en la estabilidad oxidativa (Perez-Mateos et al., 2002).

Otros extractos vegetales como el de orégano (*Origanum vulgare*), tomillo (*Thimus vulgare*) y té verde (*Cammellia sinensis*) también han sido evaluados en este tipo de

matrices; mayonesa y aderezos para ensaladas (Sørensen et al., 2010), bebidas lácteas (Boroski et al., 2012; Sørensen, 2010), surimi (Perez-Mateos et al., 2006), con resultados similares a los obtenidos para el extracto de romero.

Por otro lado, los tocoferoles son compuestos monofenólicos naturales con propiedades antioxidantes. Dependiendo del número y posición de los grupos metilo unidos al anillo aromático se denominan  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ - (Shahidi and Ambigaipalan, 2015). Estos compuestos están especialmente presentes en aceites vegetales ricos en ácidos grasos insaturados, aproximadamente 100-1000 ppm de tocoferoles mixtos, en grasas animales hasta 100 ppm y aceites de pescado 250-350 ppm (Kamal-Eldin and Budilarto, 2015). Los aceites vegetales contienen principalmente tocoferoles  $\alpha$  y  $\gamma$ , mientras que las grasas animales y los aceites de pescado contienen principalmente  $\alpha$ -tocoferol (Shahidi and Ambigaipalan, 2015). Estos compuestos son denominados comúnmente como vitamina E (Kamal-Eldin and Budilarto, 2015). Los mecanismos antioxidantes de los tocoferoles se basan en la transferencia de átomos de hidrógeno y eliminación de oxígeno singlete y otras especies reactivas, inhibiendo así la peroxidación lipídica (Lee and Min, 2006). Sin embargo, se sabe que estos antioxidantes pierden eficacia a altas concentraciones (Kamal-Eldin and Budilarto, 2015). Así, el  $\alpha$ -tocoferol que actúa como inhibidor de la oxidación de AGPI, se vuelve menos efectivo a medida que su concentración aumenta más allá de cierto umbral (Fuster et al., 1998; Kulås and Ackman, 2001). En sistemas alimentarios complejos, como matrices enriquecidas en ácidos grasos Omega-3, en los que la oxidación puede producirse por mecanismos muy diversos, la adición de tocoferoles puede ser insuficiente para lograr la estabilidad oxidativa del producto (Jacobsen et al., 2008b). Así, por ejemplo, en leche enriquecida con aceite de pescado la adición de  $\alpha$ -tocoferol en solitario en una concentración de 1.1mg/kg de leche tiene efectos antioxidantes débiles (Jacobsen et al., 2013b); sin embargo, la adición de ácido cítrico, que tiene efecto quelante, podría proteger y ayudar a los tocoferoles durante la oxidación (Frankel E.N., 2005) mejorando así su actividad antioxidante en leche enriquecida en aceite de hígado de bacalao (Let et al., 2004).

Además del ácido cítrico, también han sido evaluados en alimentos con ácidos grasos Omega-3 en su composición, el ácido ascórbico y cafeico. Los mecanismos antioxidantes del ácido ascórbico se basan en la donación de átomos de hidrógeno a los

radicales lipídicos, la eliminación del oxígeno singlete y molecular (Lee and Min, 2006). Sin embargo, en matrices complejas con ácidos grasos Omega-3 en su composición, como la mayonesa enriquecida en aceite de pescado, muestra un fuerte carácter prooxidante a concentraciones mayores o iguales a 40 mg/kg de producto (Jacobsen et al., 1999; Oterhals and Berntssen, 2010). Esto puede deberse a que el ácido ascórbico es altamente susceptible a la oxidación en presencia de iones metálicos como el  $\text{Cu}^{3+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  y esa oxidación puede verse afectada por el pH y la actividad del agua (Lee and Min, 2006). Similar comportamiento presenta el ácido cafeico cuando se utiliza en barras energéticas enriquecidas en concentraciones menores o iguales a 15 mg/kg de producto. En este estudio también se atribuyen los efectos prooxidantes del cafeico a su capacidad de reducir iones metálicos presentes en el alimento (Horn et al., 2009).

Más novedoso es el uso de algas marinas como antioxidantes en alimentación. Las algas marinas son fuente de numerosos compuestos con propiedades bioactivas (Holdt and Kraan, 2011), entre ellos compuestos antioxidantes como polifenoles, carotenoides, tocoferoles y determinados péptidos (Heffernan et al., 2014). Su uso como antioxidantes ha sido evaluado en diferentes alimentos con ácidos grasos Omega-3 en su composición (Jacobsen et al., 2019). Babakhani et al. (2016), estudiaron un extracto etanólico del alga marina común *Polysiphonia fucoides* en carne picada de caballa y comprobaron que era muy eficaz retardando la oxidación de lípidos y protegía contra la pérdida de tocoferoles, siendo tan eficiente como el antioxidante sintético BHT. Otras matrices en las que se han evaluado extractos de algas marinas con buenos resultados frente a la oxidación lipídica son mayonesa enriquecida con aceite de pescado (Honold et al., 2016), aceite de pescado y leche (Kindleysides et al., 2012), y barras de granola enriquecidas con aceite de pescado (Hermund and Yes, 2015; Hermund et al., 2016).

Por otro lado, las proteínas derivadas de alimentos tanto de origen vegetal como animal, merecen atención especial debido a la gran cantidad de propiedades bioactivas que poseen, entre ellas, la capacidad antioxidante (Elias et al., 2008; Hettiarachchy et al., 2011). Las proteínas son macromoléculas presentes en los seres vivos formadas por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, estos son, enlaces entre el grupo amino,  $-\text{NH}_2$ , de un aminoácido y el grupo carboxilo,  $-\text{COOH}$ , de otro aminoácido (Figura 3.2).

Los grupos funcionales de la cadena lateral de las proteínas son los que contribuyen a sus propiedades estructurales y funcionales (Aluko, 2015; Wu et al., 2003). Además, el pH del medio en el que se encuentren los aminoácidos influirá en su reactividad, así, por debajo de la constante de disociación ácida ( $pK_a$ ), retendrán átomos de hidrógeno mientras que, para valores de pH por encima de la  $pK_a$ , se ionizarán y tendrán carga negativa (Hunt and Dalglish, 1994; Lee et al., 1992). Esto quiere decir que el pH de una matriz alimentaria es un factor importante en el posible efecto antioxidante de los aminoácidos (Aluko, 2015).

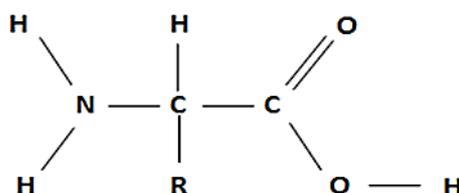


Figura 3.2 Estructura general de las proteínas.

Así, las proteínas y sus derivados pueden inhibir la oxidación lipídica por diferentes mecanismos como la inactivación de especies reactivas del oxígeno, la eliminación de radicales libres, mediante la quelación de metales de transición, reducción de hidroperóxidos e incluso mediante la alteración de las propiedades físicas de los sistemas alimentarios complejos a los que son incorporadas (Elias et al., 2008). Se ha demostrado que proteínas procedentes de la leche y de la soja pueden inhibir la oxidación lipídica en sistemas alimentarios complejos. Elias et al. (2005), comprobaron que las proteínas del lactosuero de la leche de vaca son capaces de inhibir las reacciones de oxidación lipídica en emulsiones de aceite de pescado en agua por eliminación de radicales libres y por quelación de metales de transición prooxidativos, aunque el mecanismo específico por el que ocurre no está totalmente claro. Estos mismos autores pusieron de manifiesto que algunos residuos aminoácidos hidrofóbicos de la proteína tienen el potencial de inhibir las reacciones de oxidación de lípidos (Elias et al., 2005) ya que, se oxidaban preferentemente y provocaban la eliminación de radicales libres y la repulsión electrostática de metales de transición prooxidantes a valores por debajo del punto isoeléctrico de la proteína (Elias et al., 2005; Stadtman, 1993). Por este motivo, en este estudio la presencia en la fase continua de la emulsión de aceite de pescado de

bajas concentraciones de  $\beta$ -lactoglobulina, 250 y 750  $\mu\text{g/ml}$ , inhibía significativamente la oxidación lipídica (Elias et al., 2005).

La proteína de soja también puede inhibir la oxidación de ácidos grasos Omega-3 en emulsiones alimentarias (Di Giorgio et al., 2019; Zhao and Xiong, 2015). En un estudio sobre el efecto de la adición de proteínas y péptidos de soja en la oxidación de éster etílico de EPA secado y estabilizado con maltodextrina, se observó que se mejoraba su estabilidad oxidativa durante un periodo de 7 días. Esto podría ser debido a la eliminación de radicales libres prooxidantes por parte de la proteína y sus péptidos, incluso en condiciones de alta humedad (Park et al., 2005).

Por otro lado, se sabe que las propiedades bioactivas de las proteínas, entre ellas la capacidad antioxidante, pueden mejorarse mediante procesos químicos, enzimáticos y físicos (Jeewanthi et al., 2015). Así, los péptidos derivados de la hidrólisis de proteínas tienen una actividad antioxidante sustancialmente mayor que las proteínas intactas (Elias et al., 2008). Estos péptidos son segmentos de aminoácidos de las proteínas nativas que se han liberado de ella por medio de estas reacciones de hidrólisis químicas o enzimáticas (Adler-Nissen, 1986; Aluko, 2015). La hidrólisis enzimática de proteínas consiste en la fragmentación de moléculas de proteínas en péptidos pequeños de diversos tamaños y en aminoácidos, catalizada por enzimas proteolíticas denominadas proteasas (Sbroggio et al., 2016). La hidrólisis enzimática, por seguridad y calidad alimentaria, es preferible a la hidrólisis química (Aluko, 2015). Las condiciones del proceso son más moderadas y controlables y generalmente, no produce ningún producto de degradación tóxico, ya que, esta hidrólisis es más selectiva porque utiliza proteasas que son específicas para un determinado tipo de enlace (Espejo-Carpio, 2012). Las propiedades funcionales de los péptidos derivados de la hidrólisis enzimática dependen en gran medida de la fuente de la que procede la proteína y de las condiciones de la hidrólisis, como el grado de hidrólisis alcanzado (DH) (i.e. número de enlaces peptídicos escindidos), tipo de enzima empleada, pH y ratio enzima/sustrato (Chalamaiah et al., 2012; Ipsen et al., 2001). Además, la hidrólisis enzimática de las proteínas influye en el peso molecular, la hidrofobicidad y en sus grupos polares (Adler-Nissen, 1986) lo que a su vez afecta a su capacidad como antioxidantes (Kristinsson and Rasco, 2000; Wu et al., 2003). Los péptidos por su estructura son menos propensos al

plegamiento conformacional que las proteínas. Esto asegura que la mayoría de sus grupos reactivos estén siempre disponibles para reacciones antioxidantes y además, son solubles en un rango de pH más amplio que las proteínas de partida (Aluko, 2015). Eso los hace adecuados para matrices alimentarias líquidas y semilíquidas. El estudio sobre el uso de hidrolizados de proteínas como agentes antioxidantes en alimentos es extenso. La Tabla 3.8 muestra algunos ejemplos de hidrolizados derivados de proteínas de distinto origen con capacidad antioxidante en diferentes sistemas alimentarios.

Tabla 3.8 Ejemplos de hidrolizados derivados de proteínas de distinto origen con capacidad antioxidante en diferentes sistemas alimentarios.

Fuente del hidrolizado de proteína	Sistema alimentario	Referencia
Lactosuero	Microcápsulas de aceite de pescado	Tamm et al. (2015)
Caseína	Carne picada de ternera	Díaz and Decker (2004)
Yogur	Leche enriquecida en Omega-3	Farvin et al. (2010)
Huevo	Carne picada de ternera y de atún	Sakanaka and Tachibana (2006)
Soja	Hamburguesas empanadas de cerdo	Peña-Ramos and Xiong, (2003)
Patata	Emulsiones cárnicas para productos de charcutería	Nieto et al., (2009)
Guisante	Emulsiones y microcápsulas de aceite de pescado	Tamm et al.(2016b)
Arroz	Microcápsulas de aceite de linaza	Gomes and Kurozawa (2020)
Sardina	Emulsiones de aceite de pescado	García-Moreno et al.(2016)
Carpa común	Emulsiones de aceite de pescado	Ghelichi et al. (2017)
Jurel	Microcápsulas de aceite de pescado	Morales-Medina et al. (2016)
Bacalao	Emulsiones de aceite de pescado	Farvin et al.(2014)
Bacaladilla	Bebida de té	Egerton et al.(2018)

Las proteínas del lactosuero consisten principalmente en proteínas globulares siendo las más abundantes la  $\beta$ -lactoglobulina (55%) y  $\alpha$ -lactoglobulina (24%) (García-Moreno et al., 2018; Hu et al., 2003a). Se sabe que los hidrolizados de proteína de lactosuero mejoran la solubilidad y la emulsificación en un rango amplio de pH comparados con sus proteínas intactas (Jeewanthi et al., 2015; Sinha et al., 2007). Esto se debe a que la hidrólisis produce una disminución de su peso molecular que puede afectar a la exposición de sus grupos hidrófobos (Tavano, 2013) y aumentar su actividad superficial y, en consecuencia, aumentar la estabilidad y viscoelasticidad de las películas interfaciales (Davis et al., 2005) en los sistemas complejos de los que formen parte, como pueden ser emulsiones de agua y aceite (Tamm et al., 2012, 2015). Por su

composición en determinados aminoácidos, hidrofóbicos principalmente, su conformación en la secuencia peptídica y el tamaño molecular tras la hidrólisis, los hidrolizados de proteína de lactosuero poseen capacidad antioxidante (Elias et al., 2005; García-Moreno et al., 2014a; Peña-Ramos et al., 2004; Vavrusova et al., 2015). Son captadores de radicales libres y quelantes de hierro, y tienen capacidad para la inactivación de especies reactivas del oxígeno (Caetano-Silva et al., 2018; Conway et al., 2013). Esto les confiere gran potencial como antioxidantes en sistemas alimentarios complejos como pueden ser alimentos enriquecidos en ácidos grasos Omega-3. Así, Tamm et al. (2015) estudiaron la capacidad de las proteínas del suero de la leche ( $\beta$ -lactoglobulina) parcialmente hidrolizadas, a grado de hidrólisis 3% y 6%, tanto con enzima Alcalasa como con tripsina, para estabilizar microcápsulas de aceite de pescado. El estudio oxidativo reveló que después de 3 semanas de almacenamiento las muestras con  $\beta$ -lactoglobulina sin hidrolizar habían aumentado considerablemente su contenido en hidroperóxidos con respecto a las otras muestras que contenían hidrolizados de  $\beta$ -lactoglobulina. Las muestras con hidrolizados de la proteína tuvieron una estabilidad oxidativa similar hasta las 7 semanas de almacenamiento pero, posteriormente, las muestras a DH 6% con tripsina fueron las que obtuvieron menor concentración de hidroperóxidos,  $39.6 \pm 5.9$  mmol/kg de aceite frente a  $122.6 \pm 6.8$  mmol/kg de aceite de la proteína intacta, tras 11 semanas de almacenamiento respecto a las demás muestras. Esto puede deberse a la especificidad de la enzima tripsina dentro de la molécula de  $\beta$ -lactoglobulina (Cheison et al., 2011) comparada con la Alcalasa (Tamm et al., 2015) y a que el grado de hidrólisis mayor puede aumentar la cantidad de aminoácidos antioxidantes accesibles (Elias et al., 2008; McClements and Decker, 2000; Tamm et al., 2015; Zhou et al., 2012). En estudios posteriores, se confirmó la capacidad de los hidrolizados de proteínas de lactosuero para estabilizar física y oxidativamente microcápsulas de aceite de pescado en comparación con la proteína intacta ya que se volvió a retrasar la formación de hidroperóxidos en las muestras que contenían hidrolizados de proteína de lactosuero a DH 6% hidrolizado con tripsina (Tamm et al., 2016b). Además, se ha comprobado el efecto antioxidante de los hidrolizados de proteína de lactosuero en otros sistemas complejos como el surimi, capaz de estabilizarlo oxidativamente hasta un periodo de nueve días en refrigeración (Cui et al., 2017).

Por otro lado, también han sido estudiados los hidrolizados derivados de la proteína de la soja. Al igual que ocurre con el lactosuero en la industria láctea, también se generan subproductos derivados de la fabricación de productos de alimentación a base de soja que pueden ser aprovechados y rentabilizados. Ejemplo de ello, son los hidrolizados de suero de soja generado en la producción de tofu que contienen péptidos antioxidantes que pueden utilizarse en la industria alimentaria (Singh and Banerjee, 2013). A los hidrolizados de proteína de soja se les atribuye la capacidad para actuar como quelantes de iones metálicos, eliminar radicales libres (Gibbs et al., 2004) y prevenir la penetración, en matrices alimentarias, de iniciadores de la oxidación lipídica por su capacidad para formar una membrana alrededor de las gotas de grasa o aceite (Moure et al., 2006; Peña-Ramos and Xiong, 2002). Como se explicó anteriormente, dependiendo de las condiciones en las que se produce la hidrólisis, el tipo de enzima utilizada y grado de hidrólisis alcanzado, la actividad antioxidante de los hidrolizados producidos puede variar. Ya en 1995, Chen et al. (1995) estudiaron los efectos antioxidantes contra la peroxidación de ácido linoleico en un sistema acuoso a pH 7 de los hidrolizados de proteína de soja,  $\beta$ -conglucina, durante 24 horas con cinco enzimas diferentes: proteasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa de *Bacillus subtilis*, proteasa de *Aspergillus melleus*, proteasa de *Bacillus sp.* y proteasa de pepsina de la mucosa gástrica porcina. El efecto de la hidrólisis se reflejó en el aumento de la capacidad antioxidante para todas las enzimas utilizadas. El hidrolizado más activo fue el producido con proteasa *Bacillus sp.* y se observó que no aumentó la estabilidad oxidativa del ácido linoleico en el sistema acuoso conforme aumentaba el DH (Chen et al., 1995). Esto podría ser extrapolable a productos de alimentación emulsionados (Moure et al., 2006). También Peña-Ramos and Xiong (2002) hidrolizaron aislado de proteína de soja con pepsina, papaína y quimotripsina (37°C) purificadas y sin purificar con Alcalasa, Protamex y Flavourzyme (50°C) a distintos DH, 1.7-20.6%. Probaron estos hidrolizados en un sistema oxidante de liposomas y se disminuyó la formación de peróxidos entre el 28-65%, con la proteína tanto hidrolizada como sin hidrolizar a excepción del hidrolizado con papaína. Las muestras que tuvieron el mayor efecto inhibitorio sobre la oxidación de lípidos fueron las de quimotripsina y Flavourzyme.

Más reciente es el estudio de Zhang et al. (2018), que investigaron el efecto de la hidrólisis enzimática con la proteasa Neutrasa (E/S = 0.5%, 2%, 4%, 5%, 6% y DH =

1.8%, 2.9%, 4.6%, 5.7%, 6.2%) en las propiedades antioxidantes de conjugados de proteína de soja-maltodextrina. Algunos de estos conjugados fueron ya testados como agentes encapsulantes y emulsionantes de aceite de pescado en otros estudios previos de los autores con resultados prometedores (Zhang et al., 2014, 2015). La hidrólisis liberó parcialmente grupos hidrófobos de la proteína de soja y los hidrolizados mostraron una capacidad de eliminación de radicales y actividad de quelación de hierro más eficiente comparada con la proteína aislada (Zhang et al., 2018). Sin embargo, la actividad inhibidora de los hidrolizados de conjugado disminuyó significativamente a medida que el DH aumentó.

Directamente en alimentos como carne picada cocida de ternera, se han evaluado los efectos de los hidrolizados de proteína de soja con *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* a DH elevados, 13.4 y 26.1%, comprobando que reducen la formación de peróxidos, 12.9 y 20.1% de reducción respectivamente, tras 15 días de almacenamiento a -20°C (Zhang et al., 2010). En otro estudio de estabilidad oxidativa con hamburguesas empanadas de cerdo cocinadas a 70°C y refrigeradas a 4°C durante 7 días, que contenían hidrolizado de aislado de proteína de soja (0.5 horas con quimotripsina o Flavourzyme), se comprobó que la hidrólisis mejoraba la capacidad del aislado de proteína de soja para retrasar la formación de dienos conjugados, sin embargo, no fue capaz de retrasar la producción de peróxidos (Peña-Ramos and Xiong, 2003).

También han sido objeto de estudio desde hace años las proteínas de pescado como materias primas para la producción de hidrolizados de proteínas con actividad antioxidante (Aluko, 2015). Se sabe que la industria de procesamiento de pescado produce más del 60% de subproductos (piel, cabeza, vísceras, etc.) que contienen gran cantidad de proteínas que pueden ser revalorizadas mediante hidrólisis enzimática para la obtención de péptidos con distintas funcionalidades como antioxidantes, antihipertensivos, inmunomoduladores y antimicrobianos (Chalamaiah et al., 2012; Pérez-Gálvez et al., 2018). Como se trató en el Apartado 3.1.2.2., los descartes de pesca también pueden utilizarse para este fin. A los hidrolizados de pescado se les atribuye una alta capacidad para inhibir la peroxidación lipídica y estabilizar radicales libres asociada a la presencia de aminoácidos hidrófobos (Harnedy and Fitzgerald, 2011; He et al., 2013). La liberación de péptidos antioxidantes también depende de las propiedades

de la especie hidrolizada (Pérez-Gálvez et al., 2018) además de otros factores ya mencionados. García-Moreno et al. (2014b), evaluaron las propiedades antioxidantes de hidrolizados de proteínas, a DH 13.2 a 21.0% con subtilisina + tripsina, procedentes de distintas especies de descarte: sardina, jurel, dorada, boga y pintarroja. Los hidrolizados de sardina y jurel mostraron la mayor capacidad para captar radicales libres con  $IC_{50}$  de 0.91 a 1.78 mg de proteína/ml, los de boga y sardina el mayor poder reductor y los de sardina y pintarroja el mayor poder quelante con  $IC_{50}$  de 0.32 mg de proteína/ml. Así, los autores concluyeron que la sardina era la especie de descarte evaluada con el mayor potencial para la producción de hidrolizados con actividad antioxidante. Como en otros sustratos, la capacidad antioxidante de los hidrolizados se ve afectada por otros factores. Diversos estudios evalúan la influencia del grado de hidrólisis alcanzado y de las proteasas empleadas (Egerton et al., 2018; García-Moreno et al., 2016a; Klompong et al., 2007; Morales-Medina et al., 2016). Además de actividad antioxidante, los hidrolizados de proteínas procedentes de pescado suelen mostrar propiedades fisicoquímicas mejoradas como capacidad emulsificante (Klompong et al., 2007; Pacheco-Aguilar et al., 2008), capacidad de retención de agua, capacidad de retención de aceite y solubilidad (Geirsdottir et al., 2011) lo que puede ser de utilidad para la formulación de determinados alimentos (He et al., 2013). Morales-Medina et al. (2016) estudiaron las propiedades funcionales y antioxidantes de dos hidrolizados de proteínas procedentes de especies de descarte de pesca, sardina y jurel, hidrolizadas a DH 5% y 10% con dos enzimas diferentes, subtilisina y tripsina. Encontraron que, en general, independientemente de la enzima utilizada, las capacidad para captar radicales libres y el poder reductor de los hidrolizados disminuían con el aumento del grado de hidrólisis mientras que la actividad quelante tenía el comportamiento opuesto. El hidrolizado más activo fue el de grado de hidrólisis 5%. Posteriormente, los hidrolizados se utilizaron como emulsificantes y antioxidantes en emulsiones con aceite de pescado al 5% para microencapsular. A DH 5% se obtuvieron emulsiones físicamente estables que se microencapsularon y almacenaron durante 12 semanas a 20°C. Sin embargo, en las microcápsulas no se pudo establecer una correlación clara entre la actividad antioxidante de los hidrolizados y la oxidación del aceite. También Ghelichi et al. (2017), estudiaron la estabilidad física y oxidativa de emulsiones de aceite de pescado al 5% estabilizadas con hidrolizados de proteína de huevas de carpa común a distintos

grados de hidrólisis, entre 7.6% y 10.2%, obtenidos a diferentes tiempos (30, 60, 90 y 120 minutos) con subtilisina. Los hidrolizados, en los ensayos realizados *in vitro*, mostraron capacidad para captar radicales libres y para quelar metales. Todos los hidrolizados estabilizaron físicamente las emulsiones durante un periodo de 7 días y de manera más significativa los hidrolizados a 60 y 120 minutos. Además, retrasaron la formación de peróxidos y productos de oxidación secundaria en las emulsiones, evitando así la pérdida de ácidos grasos Omega-3, especialmente en la última etapa de almacenamiento de 4 a 7 días. Sin embargo, a partir del séptimo día, la formación de peróxidos y volátiles comenzaron a degradar las emulsiones de manera más significativa.

### **3.2.2. Técnicas de estabilización de AGPI Omega-3**

El principal inconveniente de la incorporación de AGPI a alimentos es la aparición de reacciones de oxidación, ya que, como se ha discutido en el apartado anterior, son altamente inestables. Por tanto, los procesos de estabilización utilizados para protegerlos juegan un papel determinante. La estabilización en alimentos se puede llevar a cabo añadiendo directamente antioxidantes y también empleando procesos de emulsificación o microencapsulación. Además la producción de emulsiones o microcápsulas no sólo sirve para proteger al lípido funcional en cuestión, sino que también, proporciona una vía para su incorporación en alimentos (Morales-Medina et al., 2016). Generalmente en matrices alimentarias líquidas o semilíquidas, la incorporación se realiza en forma de emulsión mientras que en matrices sólidas se emplea la microencapsulación (Jacobsen, 2010).

#### **3.2.2.1. Adición directa de antioxidantes**

La adición de antioxidantes es el método más efectivo para controlar la velocidad y el alcance de la oxidación lipídica en los alimentos (Shahidi and Ambigaipalan, 2015). Los antioxidantes alimentarios deben ser inocuos, estables al procesado, fáciles de incorporar, solubles en el producto, económicos y efectivos a bajas concentraciones (Kiokias et al., 2008). Por otro lado, para que un antioxidante sea eficaz es necesario tener en cuenta la complejidad del sistema alimentario en el que se incorpora (Jacobsen et al., 2013b). Algunos productos suelen tener diferentes fases con distintos ingredientes por las que el antioxidante tiene mayor o menor afinidad. Así, según la teoría llamada “paradoja polar” los antioxidantes polares serán más activos en medios apolares y viceversa (Porter, 1993). Este planteamiento se completa con la teoría que propone lipofilizar los antioxidantes hidrofílicos para cambiar su ubicación, dividirlos en diferentes fases y mejorar su actividad antioxidante (Frankel et al., 1994; Laguerre et al., 2009, 2010; Sørensen, 2010). Sin embargo, en sistemas más complejos, como los alimentos enriquecidos en ácidos grasos Omega-3, es complicado extrapolar resultados de una matriz alimentaria a otra (Jacobsen, 2015). Esto se debe a que la eficacia de los antioxidantes también dependerá, además de su ubicación física en la matriz alimentaria, de la presencia de otros componentes con los que pueda interactuar como prooxidantes, antioxidantes, emulsificantes y de las condiciones del medio como

puede ser el pH del alimento (McClements and Decker, 2000; Sørensen et al., 2008). De este modo, el mismo antioxidante puede ejercer efectos diferentes en distintos sistemas alimentarios (Jacobsen, 2015). A menudo, se utilizan antioxidantes como los tocoferoles para proteger el aceite de pescado contra la oxidación (Jacobsen et al., 2013b), y sin embargo, su efectividad en alimentos enriquecidos en este aceite no es tan clara (Jacobsen, 2015). Así por ejemplo, cuando se trata el aceite de caballa con  $\alpha$ -tocoferol en concentraciones de 50 y 100 partes por millón (ppm) se inhibe la oxidación de lípidos en un 75 y 80% tras 66 días a  $-40^{\circ}\text{C}$  (Zuta et al., 2007), pero en matrices más complejas como leche y mayonesa enriquecidas en ácidos grasos Omega-3, los tocoferoles no ejercen efectos antioxidantes significativos (Jacobsen, 2015; Jacobsen et al., 2001b). Al igual que con los tocoferoles, hay diversos estudios en los que se evalúa el efecto de diferentes antioxidantes en distintos alimentos enriquecidos con aceite de pescado (Horn et al., 2009; Jacobsen et al., 1999, 2000, 2001b, 2008b; Let et al., 2004, 2005, 2007a; Nielsen and Jacobsen, 2009; Nielsen et al., 2007; Timm-Heinrich et al., 2004) y que confirman la complejidad de predecir el comportamiento antioxidante de un sistema alimentario a otro. La Tabla 3.9 muestra un resumen de la eficacia de distintos antioxidantes en diferentes alimentos enriquecidos en ácidos grasos Omega-3. Así, el palmitato de ascorbilo presenta actividad prooxidativa en mayonesa y en barras energéticas (Horn et al., 2009), mientras que en aderezos para ensaladas y en bebida láctea se encontraron efectos antioxidantes débiles e incluso prooxidativos (Jacobsen et al., 2008a; Let et al., 2007b). Por otro lado, el galato de propilo y el ácido gálico también presentan actividad prooxidante en mayonesa y bebida láctea (Jacobsen et al., 1999; Nielsen et al., 2004) y el ácido cafeico evaluado en barras energéticas disminuye la estabilidad oxidativa (Horn et al., 2009). También han sido evaluadas en matrices enriquecidas en ácidos grasos Omega-3 mezclas de antioxidantes que muestran efectos sinérgicos con objeto de mantener la estabilidad oxidativa de la matriz por diferentes mecanismos. Por ejemplo, se descubrió que la eficacia del EDTA en aderezos para ensaladas enriquecidos en aceite de pescado, puede mejorarse mediante la adición simultánea de palmitato de ascorbilo y  $\gamma$ -tocoferol (Let et al., 2007b). La evolución de los peróxidos en el aderezo para ensalada en función del tiempo de almacenamiento, de 6 semanas, con los antioxidantes en solitario y adicionados conjuntamente resultó ser mucho mejor para las muestras en las que se había utilizado una mezcla de los tres

antioxidantes, con PV < 4 meq/kg. Lee et al.(2005) incorporaron a carne picada de res enriquecida en ácidos grasos Omega-3, varias combinaciones de mezclas de antioxidantes y se consiguió la estabilización oxidativa más eficaz durante 6 días a 4°C con la mezcla de citrato de sodio, eritorbato sódico y extracto de romero.

También en un estudio para estabilizar aceite de sardina rico en ácidos grasos Omega-3, se encontró que  $\alpha$ -tocoferol, en concentraciones de 50-207 ppm, optimizó la reducción de la formación de hidroperóxidos en el aceite de sardina cuando se combinó con palmitato de ascorbilo a una concentración de 450 ppm y ácido cítrico a concentración de 50 ppm. Sin embargo, los productos secundarios de oxidación se redujeron para concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol de 478-493 ppm, con 390-450 ppm de palmitato de ascorbilo y 50 ppm de ácido cítrico (Morales-Medina et al., 2015b).

Como se ha visto hasta ahora, además de la adición de antioxidantes, en determinados alimentos enriquecidos en ácidos grasos Omega-3, son necesarias otras estrategias para mejorar la estabilidad oxidativa y que sirvan además como vehículo para la incorporación al alimento.

Tabla 3.9 Efecto antioxidante en diferentes matrices alimentarias enriquecidas en ácidos grasos Omega-3. Adaptado de Jacobsen (2001c)

Producto	Tocoferol	Palmitato de ascorbilo	Ácido ascórbico	EDTA	Galato de propilo	Ácido gálico
Leche	Antioxidante débil (i)	Antioxidante (j)	-	Antioxidante (i,j)	-	-
Bebida láctea	-	Prooxidante (m)	-	Antioxidante (g)	-	Prooxidante a antioxidante débil
Yogur líquido	-	-	-	Antioxidante (l)	-	-
Aderezos	Antioxidante débil (e)	Prooxidante (e)	-	Antioxidante (k)	-	-
Mayonesa	Antioxidante débil a prooxidante (c)	Prooxidante (e,a)	Prooxidante (e,a)	Antioxidante (h,d)	Prooxidante (e,b)	Prooxidante
Barritas energéticas	Antioxidante a prooxidante débil (n)	Prooxidante (n)	-	Prooxidante (o)	-	-

Jacobsen et al. (1999) (a), Jacobsen et al.(2000) (b); Jacobsen et al. (2001b) (c); Jacobsen et al. (2001a) (d); Jacobsen et al. (2001c) (e); Jacobsen et al. (2001b) (f); Jacobsen et al. (2001a) (g); Timm-Heinrich et al. (2004) (g); Nielsen et al. (2004) (h); Let et al. (2004) (i), Let et al. (2005) (j), Let et al. (2007b) (k); Nielsen et al. (2004) (l); Nielsen et al. (2004) (m); Nielsen et al. (2004) (n); Horn et al. (2009) (n); Nielsen and Jacobsen (2009) (o).

### 3.2.2.2. Procesos de emulsionado

El uso de emulsiones de aceite de pescado como sistema para la incorporación de ácidos grasos Omega-3 ha sido investigado en diferentes matrices alimentarias (Jacobsen, 2015; Walker et al., 2015). Una emulsión alimentaria es un alimento constituido por dos líquidos inmiscibles y una interfase, aunque este término puede extenderse a sistemas alimentarios multifásicos que contengan al menos una fase hidrofílica (agua) y una fase lipofílica (aceite), con una de ellas dispersa en forma de gotas en la otra (Genot et al., 2013). En las emulsiones aceite/agua (o/w), la fase oleosa se dispersa en el agua (leche, salsas, sopas) y en las emulsiones agua/aceite (w/o) el agua se dispersa en aceite (untables, mantequilla, margarina) (Berton-Carabin et al., 2014; Kralova and Sjöblom, 2009). Las emulsiones por naturaleza son termodinámicamente inestables, tienden a desestabilizarse físicamente en el tiempo. Los principales mecanismos de desestabilización de emulsiones se reflejan en la Figura 3.3 y son: floculación (i.e. dos o más gotas de la fase dispersa se agregan), coalescencia (i.e. dos o más gotas de la fase dispersa se fusionan para formar una sola gota de mayor tamaño debido a la ruptura de la película interfacial) y creaming o cremado (i.e. las gotas o agregados se desplazan hacia arriba o hacia abajo y comienza a producirse la separación de las fases) (Genot et al., 2013). Esto mismo puede ocurrir al incorporar a un alimento aceites con alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados Omega-3, por tanto, es necesario no solo solventar los problemas de estabilidad oxidativa derivados de su alta reactividad por su estructura química, sino también los problemas de estabilidad física (Genot et al., 2013). Los aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados Omega-3 son líquidos a temperatura ambiente e inmiscibles en agua, de esta manera, cuando se mezclan en una matriz alimentaria acuosa tienden a desestabilizarse. Por este motivo, es necesaria la presencia de algún componente con propiedades anfifílicas que pueda interactuar en la interfase aceite-agua y reducir la tensión superficial (Jacobsen, 2015). Es necesaria la presencia de emulsificantes que se dispersarán en la fase en la que sean más solubles para formar la emulsión. En la industria alimentaria suelen utilizarse como emulsificantes proteínas, fosfolípidos y otros tensioactivos tanto de origen natural como sintético.

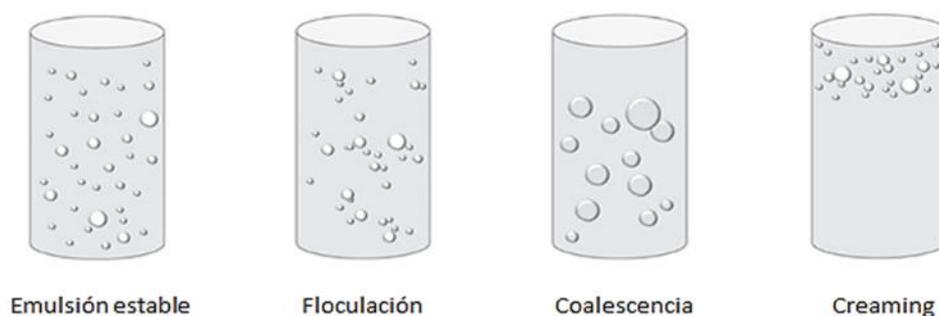


Figura 3.3 Mecanismos de desestabilización de emulsiones. Adaptado de Genot *et al.*(2013).

Además de servir de vehículo para la incorporación de ácidos grasos Omega-3 a alimentos, se utilizan emulsiones o/w para proteger estos lípidos contra la oxidación, ya que, proporcionan una barrera física entre el aceite con ácidos grasos Omega-3 y los compuestos o agentes prooxidantes (García-Moreno *et al.*, 2016a; Ghelichi *et al.*, 2017; Gumus *et al.*, 2017; Hermund *et al.*, 2016; Let *et al.*, 2007a; Walker *et al.*, 2015). Aun así, la propia emulsión utilizada para proteger puede ser vulnerable a estos prooxidantes. La estabilidad oxidativa de los lípidos en la emulsiones puede verse afectada por numerosos factores. La interfase aceite-agua tiene un papel crítico en la oxidación de lípidos, ya que, en ella tiene lugar el contacto entre el aceite y los prooxidantes que puedan existir en la fase acuosa (Berton-Carabin *et al.*, 2014). De este modo, las moléculas que conformen la interfase, principalmente emulsificantes, y el área interfacial, determinada por la distribución de tamaño de gota, influirán en la estabilidad oxidativa de la emulsión (McClements and Decker, 2000). Un tamaño de gota muy pequeño conforma un área interfacial grande que puede aumentar la tasa de oxidación, ya que, hay más superficie de contacto para los antioxidantes (Jacobsen, 2010). Pero a su vez, un tamaño de gota grande puede interferir en la absorción del emulsificante y en su efectividad (Ries *et al.*, 2010). En general en emulsiones alimentarias se encuentran una amplia gama de tamaños de gota en un rango de 0.1 a 20  $\mu\text{m}$  (Berton-Carabin *et al.*, 2014).

En la interfase la composición del emulsificante y su carga eléctrica son importantes para repeler o atraer metales prooxidativos (Mei *et al.*, 1998). La interfase a su vez se verá afectada por la composición de la emulsión, las interacciones entre los distintos componentes y su distribución, es decir, por el reparto en las fases e interfase según la

afinidad por ellas (Berton-Carabin et al., 2014; Jacobsen, 2015). También se verá afectada por el pH, ya que, algunos componentes de la emulsión, como los emulsificantes, pueden tener grupos ionizables que asuman diferentes cargas en función de las condiciones ácidas, neutras o básicas (McClements and Decker, 2018). Además, la solubilidad de compuestos prooxidantes podría aumentar o disminuir según el pH y eso afectaría a la tasa de oxidación (Ferreira Ferreira da Silveira et al., 2020). En la estabilidad oxidativa de las emulsiones puede influir el propio proceso de emulsificación en el que se necesita el aporte de energía ya sea por alta presión, ultrasonidos o agitación intensa para la formación de la emulsión (McClements, 2005) y pueden provocar el contacto entre los ácidos grasos poliinsaturados con oxígeno y otros agentes prooxidativos. No obstante, a pesar de todos estos factores críticos en la oxidación lipídica, la interfase puede ser una barrera eficaz para la estabilidad oxidativa de las emulsiones (Genot et al., 2013). Esa eficacia puede potenciarse por las características de los emulsificantes y antioxidantes ubicados en ella (McClements and Decker, 2000).

Pernin et al.(2019) estudiaron, durante 7 días a temperatura ambiente, la estabilidad oxidativa de emulsiones de aceite de pescado en agua que contenían 250g/kg de DHA y compararon las proteínas de lactosuero como emulsionantes y Tween 80 (i.e. monooleato de polioxietilensorbitano, emulsificante ampliamente utilizado en alimentación) y utilizaron como antioxidantes eugenol, ácido ferúlico y  $\alpha$ -tocoferol en solitario y mezclados. Demostraron que la naturaleza del emulsionante es importante, ya que, los antioxidantes que consiguieron estabilizar oxidativamente la muestra, eugenol y  $\alpha$ -tocoferol, mostraron su actividad antioxidante en presencia de las proteínas de lactosuero y no con Tween 80. Las emulsiones formuladas con proteínas de lactosuero fueron significativamente más estables que las de Tween 80 según la evolución de los hidroperóxidos y compuestos secundarios de oxidación. Esto puede ser debido a varios motivos; uno que el lactosuero, como se trató en el Apartado 3.2.1.2., posee actividad antioxidante (Elias et al., 2005) y otro por la capacidad de esos antioxidantes para posicionarse de manera diferente en el sistema dependiendo del emulsificante utilizado (López-Martínez and Rocha-Uribe, 2018; Silva et al., 2017; Stöckmann et al., 2000). Es probable que la estructura del Tween 80 limite a los antioxidantes la accesibilidad a la

interfase donde comienza la oxidación lipídica no pudiendo ejercer correctamente su actividad (Berton-Carabin et al., 2014).

También hay diversos estudios que recomiendan el empleo en las emulsiones alimentarias de un mismo agente con propiedades emulsificantes y antioxidantes que pueda exhibir esas propiedades en la interfase donde se inicia la oxidación (García-Moreno et al., 2016a; McClements and Decker, 2018). Son moléculas antioxidantes y emulsificantes que ejercen una actividad protectora eficaz contra la oxidación debida a su ubicación en el área crítica del sistema (Genot et al., 2013). En este sentido, determinadas proteínas pueden reunir esas dos capacidades. Las proteínas son generalmente biopolímeros anfífilos por la polaridad diferente de los aminoácidos que las componen. Se absorben en la interfase formada durante el proceso de emulsificación orientando sus grupos hidrofílicos a la fase acuosa y sus grupos lipofílicos en la fase oleosa (Genot et al., 2013) y así se reduce la tensión interfacial logrando la estabilidad de la emulsión. Por otro lado, también ciertas proteínas y sus hidrolizados, como se ha visto anteriormente, poseen actividad antioxidante (Aluko, 2015; Elias et al., 2008). Como ejemplo, proteínas procedentes del lactosuero (Hou et al., 2019; Villiere et al., 2005), soja (Shao and Tang, 2014; Zhao and Xiong, 2015) y pescado (Taheri et al., 2014) pueden presentar actividad emulsificante y antioxidante. Sin embargo, se han realizado escasos estudios en los que se analice la estabilidad física y oxidativa en sistemas alimentarios complejos como las emulsiones de aceite de pescado en agua para incorporar a alimentos con un único agente emulsificante-antioxidante (García-Moreno et al., 2016a; Morales-Medina et al., 2016). García-Moreno et al. (2016) investigaron las propiedades antioxidantes y emulsificantes de hidrolizados de proteínas de sardina y pintarroja, a DH 3, 4, 5 y 6%, para estabilizar física y oxidativamente emulsiones de aceite de pescado en agua. Obtuvieron resultados prometedores con los hidrolizados de grado de hidrólisis más bajo según los índices de peróxidos, el análisis de productos de oxidación secundaria y la distribución del tamaño de partícula obtenidos tras 7 días de incubación a 20°C en oscuridad. Se observó que los peróxidos aumentaban rápidamente en los cuatro primeros días, sobre todo, en las emulsiones con hidrolizado de sardina DH 5 y 6% y con pintarroja DH 3%. Los mejores resultados de estabilidad física se obtuvieron con el hidrolizado de sardina DH 3%, logrando tamaños de gota pequeños a día 1 de  $D_{4,3} 0.245 \pm 0.001 \mu\text{m}$  y a día 10 igual a  $D_{4,3} 0.349 \pm 0.002 \mu\text{m}$ . Estos resultados

concuerdan con los datos obtenidos por Joye and McClements (2014), que obtuvieron emulsiones estables con tamaños de gota pequeños en hidrolizados de gluten con DH 3%.

También ha sido evaluada la capacidad antioxidante y emulsificante de otros hidrolizados de proteína como la proteína de patata para estabilizar emulsiones alimentarias. Así, Nieto et al. (2009) sugirieron el empleo de hidrolizados de proteína de patata para estabilizar física y oxidativamente emulsiones de carne tipo salchicha con un porcentaje de grasa del 15-30%. Sin embargo, son necesarios más estudios que corroboren estas investigaciones y optimicen el empleo de este tipo de moléculas proteicas emulsificantes-antioxidantes en emulsiones alimentarias, así como, más estudios de viabilidad para incorporarlas a su vez a alimentos (Jacobsen, 2015; McClements and Decker, 2018).

Actualmente, las investigaciones se dirigen principalmente a la identificación de antioxidantes-emulsificantes naturales y a la obtención de nuevas moléculas de este tipo a partir de ingredientes de origen natural (McClements and Decker, 2018). En este sentido, se están utilizando en investigación herramientas computacionales (i.e. bioinformática) para estudiar y predecir la doble actividad emulsificante y antioxidante de péptidos derivados de una fuente natural (García-Moreno et al., 2020).

### 3.2.2.3. Procesos de microencapsulación

La microencapsulación es el proceso de contener o envolver cualquier ingrediente activo, como pueden ser aceites ricos en ácidos grasos Omega-3, dentro de otra sustancia de recubrimiento formando microcápsulas (Figura 3.4) (Kaushik et al., 2015). En estos procesos, pequeñas partículas o gotas están rodeadas por una sustancia denominada encapsulante que actúa de barrera para protegerlas de los efectos ambientales (oxígeno, luz, iones metálicos, temperatura, humedad, etc.) para mejorar su estabilidad física y oxidativa (Garg et al., 2006). En la microencapsulación, el ingrediente activo se difunde gradualmente a través de las paredes de la microcápsula para su posterior liberación controlada (Fang and Bhandari, 2010). De esta manera además, se puede enmascarar el sabor de los aceites y también se puede mejorar la seguridad, la calidad y el valor nutricional del producto de alimentación en el que esté incorporado (Bakry et al., 2016).

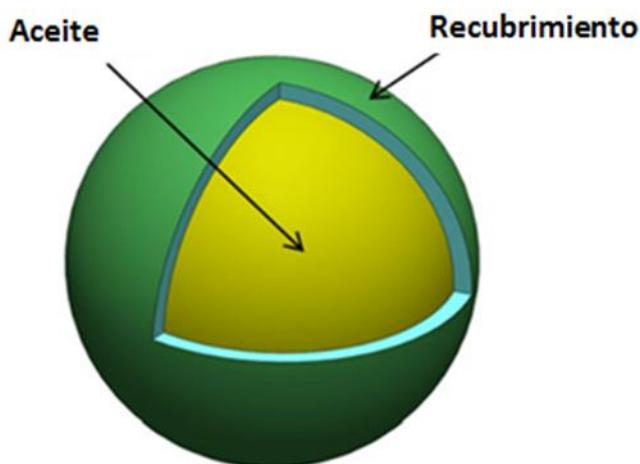


Figura 3.4 Esquema simplificado de la composición de una microcápsula de aceite. Adaptado de (Bakry et al., 2016).

Existen numerosas técnicas de encapsulación, algunas bajo patente, para la encapsulación de ácidos grasos Omega-3 como la extrusión (Saleeb and Arora, 1999) secado por lecho fluidizado (Ponginebbi and Publisi, 2008) o por formación de complejos de inclusión y posterior liofilizado (Schmid et al., 2001). Sin embargo, estas técnicas suelen ser menos económicas o presentar algunos inconvenientes en la

incorporación a matrices alimentarias en comparación con otras más utilizadas, como pueden ser tamaños de partícula demasiado altos para incorporación a alimentos o procesos que influyen negativamente en la estabilidad de los ácidos grasos Omega-3 de los aceites (Kaushik et al., 2015). A nivel industrial, las técnicas más implementadas para la microencapsulación de aceites con ácidos grasos Omega-3 son el secado por atomización, previa preparación de la emulsión o/w, y la coacervación compleja (Bakry et al., 2016; Kaushik et al., 2015). Más novedoso y prometedor es el uso de técnicas electrodinámicas como el electrospraying y electrospinning, en fase de investigación (Anu Bhushani and Anandharamakrishnan, 2014; Hermund et al., 2019; Zhang et al., 2011).

#### **3.2.2.3.1. Técnicas electrodinámicas**

Son técnicas de encapsulación directa versátiles y adecuadas para la producción de nano-microfibras (electrospinning) o nano-micropartículas (electrospraying) que contienen compuestos bioactivos como aceites enriquecidos en ácidos grasos Omega-3 (Aceituno-Medina et al., 2013; Stephansen et al., 2014). Estos procesos utilizan un campo electrostático de alto voltaje para cargar la superficie de gotas formadas al final de un tubo capilar que contienen el aceite a encapsular y un polímero. Cuando las fuerzas eléctricas superan la tensión superficial, se expulsa un chorro cargado eléctricamente y se produce la evaporación del solvente dando como resultado fibras o partículas secas (Anu Bhushani and Anandharamakrishnan, 2014; Frenot and Chronakis, 2003; García-Moreno et al., 2016b). El inconveniente de esta técnica es su baja capacidad de producción respecto a otras técnicas. García-Moreno et al. (2016b), investigaron la encapsulación de aceite de pescado en nanofibras de alcohol de polivinilo mediante electrospinning. Utilizaron como emulsificantes aislado de proteína de lactosuero e hidrolizado de proteína de sardina a DH 4%. El primero exhibió mayor capacidad emulsificante y dio lugar a emulsiones más estables físicamente, con un tamaño de gota más pequeño. Se obtuvo una alta eficiencia de encapsulación de  $92.4 \pm 2.3\%$ . Sin embargo, las fibras presentaron un mayor contenido de hidroperóxidos y productos de oxidación secundarios en comparación con el aceite de pescado emulsionado y sin protección. Esto podría ser debido, según los autores, a la presencia

de trazas de metales en el polímero encapsulante que catalizarían la oxidación de los ácidos grasos Omega-3 presentes en el aceite (García-Moreno et al., 2016b).

### 3.2.2.3.2. Coacervación compleja

La coacervación es la separación de dos fases líquidas en una solución coloidal por la modificación del pH del sistema, que hace que varíe la solubilidad de las moléculas y se forme una nueva fase, coacervado, que envuelve la fase a encapsular (Dobetti and Pantaleo, 2008). Posteriormente, es necesario el endurecimiento o secado para formar la cápsula que contiene el aceite (Bakry et al., 2016). La coacervación puede ser simple o compleja, dependiendo de la utilización de un polímero o varios para formar la cubierta encapsulante (Eratte et al., 2018). La coacervación compleja es una técnica muy utilizada para la encapsulación de aceites con ácidos grasos Omega-3, ya que, se consiguen tamaños de partícula pequeños que contribuyen a una mejor eficiencia de encapsulación (Rusli et al., 2006; Soottitantawat et al., 2003). También evita que el aceite migre a la superficie de la partícula por lo que la concentración de aceite superficial es normalmente baja en comparación con otros métodos. Una baja concentración de aceite en la superficie mantiene mejor las propiedades sensoriales y la estabilidad oxidativa (Barrow et al., 2009). Sin embargo, tiene algunos inconvenientes como que los coacervados formados con esta técnica son estables en un rango estrecho de pH y requiere un monitoreo cuidadoso y largos periodos de tiempo (Zhang et al., 2009). Eratte et al. (2014) produjeron y caracterizaron microcápsulas de aceite de atún mediante el uso de coacervados de aislado de proteína de lactosuero y goma arábiga. Compararon los métodos de secado por atomización y secado por liofilización. En ambos casos obtuvieron un incremento en la estabilidad oxidativa respecto al control. Además, el secado por atomización fue la mejor opción para retirar el agua de las cápsulas como se refleja en el índice de estabilidad oxidativa que obtuvieron los autores, tiempo de inducción de 22.1 horas frente a 13.2 horas obtenido con liofilización.

También, la patente de Krumbholz et al. (2001) se refiere a la microencapsulación de ácidos grasos Omega-3 y Omega-6 o derivados mediante coacervación compleja utilizando dos capas de polímeros, la primera una gelatina, caseína o alginato que recubre el interior de la microcápsula mediante fuerzas interfaciales, y la segunda capa polimérica de otra gelatina, goma arábiga o pectina que se adhiere a la segunda por

fuerzas electrostáticas logrando la estabilidad física y oxidativa de estos microencapsulados.

### 3.2.2.3.3. Secado por atomización

El secado por atomización o spray drying, es la técnica de encapsulación más extendida en la industria alimentaria para encapsulación de aceites con ácidos grasos Omega-3 (Barrow et al., 2013; Kaushik et al., 2015) al ser un proceso relativamente simple y económico en comparación con otros (Bakry et al., 2016). La microencapsulación de aceites mediante secado por atomización consiste en la preparación y homogeneización de una emulsión de o/w, que se hace pasar por un atomizador o boquilla de pulverización hasta la cámara en la que se produce la deshidratación de las partículas atomizadas mediante una corriente de aire a alta temperatura que conduce a una evaporación muy rápida del agua, con el consiguiente atrapamiento casi instantáneo del aceite (Bakry et al., 2016; Carneiro et al., 2013; Kaushik et al., 2015; Trojanowska et al., 2017) (Figura 3.5).

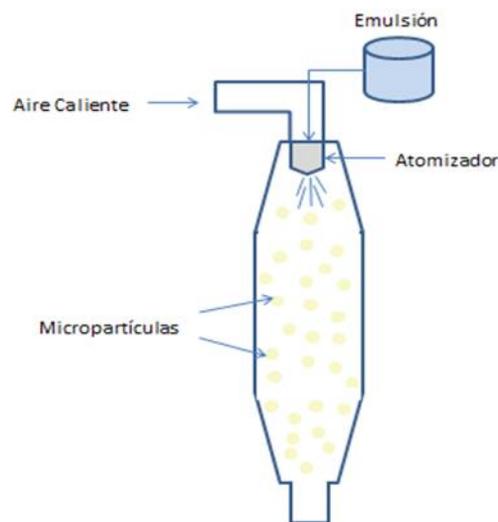


Figura 3.5 Esquema del proceso de secado por atomización.

La eficiencia en la encapsulación viene determinada por el porcentaje de aceite encapsulado y la estabilidad física y oxidativa de las microcápsulas a lo largo del tiempo. Un porcentaje elevado en las microcápsulas de aceite no encapsulado es un catalizador de oxidación de las propias cápsulas y de la matriz alimentaria a la que se

incorporen (Drusch and Berg, 2008). Para una eficiente microencapsulación de aceites ricos en ácidos grasos Omega-3 mediante secado por atomización, es necesario tener en cuenta factores como la formulación de la emulsión previa, es decir, la selección del agente encapsulante, emulsificante y antioxidante adecuados y sus concentraciones, tipo de aceite y concentración, y, las condiciones del proceso como la temperatura de entrada y salida del aire calefactor, temperatura de entrada de la alimentación, caudal de alimentación y caudal de aire. Además de las ventajas económicas, equipación fácilmente disponible y procesado sencillo, el secado por atomización tiene la ventaja de tener la capacidad de controlar el tamaño medio de partícula de las microcápsulas secadas y, como inconveniente, tiene la limitación de que solo unos pocos agentes encapsulantes son compatibles con esta técnica debido a las altas temperaturas que han de soportar (Desai and Park, 2005). En general, los carbohidratos suelen ser buenos encapsulantes para esta técnica por su estabilidad, solubilidad en agua y por su tendencia a formar una red fina y densa durante el secado (Calvo et al., 2012; Charve and Reineccius, 2009; Drusch et al., 2009). Chen et al. (2016) evaluaron la estabilidad de microcápsulas de un aceite rico en DHA con diferentes mezclas de encapsulantes: la primera con almidón modificado-goma arábiga-maltodextrina, la segunda con aislado de proteína de soja-goma arábiga-maltodextrina y la tercera con caseína-glucosolactosa. Esta última fue la de más alta eficiencia de encapsulación, 98.66%, con un tamaño de partícula de  $D_{4,3}$  14.173  $\mu\text{m}$  y las más estable física y oxidativamente tras la oxidación acelerada durante ocho semanas a 45°C. También hay patentes relacionadas con materiales encapsulantes aptos para secado por atomización que promueven una buena estabilidad oxidativa (Drusch and Mannino, 2009). Así, Fimreite (2004) patentó la encapsulación de ácido linoleico conjugado en una matriz basada en almidón derivado de n-octenilsuccinato (almidón n-OSA) mediante secado por pulverización en una atmósfera inerte que logró una mayor estabilidad del ingrediente funcional. También en la encapsulación de aceite de pescado se ha estudiado el empleo de almidón n-OSA en combinación con otros carbohidratos, con buenos resultados en estabilidad oxidativa de las microcápsulas dependiendo del grado de hidrólisis de la molécula de almidón y su contenido en azúcares reductores (DE%) (Drusch et al., 2007, 2009). Otras combinaciones evaluadas han sido las de concentrado de proteína de lactosuero-caseinato sódico en solitario o combinados con goma arábiga, con jarabe de glucosa o

maltodextrina (Takeungwongtrakul et al., 2015). En este estudio, para encapsular aceite de camarón las eficiencias de encapsulación fueron muy bajas salvo para la combinación con jarabe de glucosa, con una eficiencia de  $86.31 \pm 1.88\%$ , a la que se le hizo un seguimiento en su estabilidad oxidativa durante 6 semanas a  $30^\circ\text{C}$ , con uso de antioxidantes y sin él. A pesar del considerable incremento en el valor de peróxidos a partir de la cuarta semana, los valores de estos productos de oxidación primaria, incluso para la muestra que no contenía antioxidantes, fueron aceptables. Otros estudios, que también evalúan la combinación de proteínas y sus hidrolizados con carbohidratos, confirman que las proteínas alimentarias poseen efectos sinérgicos con estos encapsulantes y son capaces de estabilizar las microcápsulas a lo largo del tiempo (Drusch et al., 2007, 2012; Di Giorgio et al., 2019; Łozińska et al., 2020; Serfert et al., 2013; Tamm et al., 2015, 2016a).

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los factores clave en el proceso de encapsulación mediante secado por atomización es la formulación de la emulsión previa. Es necesario partir de una emulsión estable tanto física como oxidativamente, por lo que los componentes que la conforman son fundamentales. Ya se trató en el Apartado 3.2.2.2., que una misma molécula emulsificante y antioxidante, que sea capaz de situarse en la interfase de la emulsión para frenar la oxidación y estabilizarla físicamente, es un reto con consecuencias importantes de cara a la estabilidad en el tiempo de las microcápsulas de aceite de pescado. En este sentido, hay estudios en los que se han utilizado proteínas e hidrolizados de proteínas alimentarias para estabilizar microcápsulas de aceites ricos en ácidos grasos Omega-3 producidas mediante secado por atomización. Wang et al. (2016b) realizaron un estudio sistemático para microencapsulación de aceite de pescado con aislado de proteína de lactosuero. Evaluaron seis emulsiones para encapsular: A. ratio aceite:proteína 10:1 + tratamiento térmico ( $80^\circ\text{C}$ , veinte minutos) para mejorar el “cross-linking” de las proteínas en la interfase agua-aceite y 10% sólidos, B. ratio aceite:proteína 10:1 sin tratamiento térmico y 10% sólidos, C. ratio aceite:proteína 5:1+tratamiento térmico y 10% sólidos, D. ratio aceite:proteína 1:1 sin tratamiento térmico y 25% sólidos, E. ratio aceite:proteína 1:1 sin tratamiento térmico y 10% sólidos, F. ratio aceite:proteína 1:2 sin tratamiento térmico y 10% sólidos. Los resultados mostraron dos tendencias en los cambios del índice de peróxidos de los encapsulados sometidos a una temperatura de  $40^\circ\text{C}$  durante 50 días.

Las microcápsulas con alto contenido de aceite (A, B, C) mostraron un aumento sostenido mientras que las muestras con contenido de aceite bajo (D, E, F) aumentaron más rápidamente alcanzando niveles máximos después de 30-40 días. El tratamiento térmico de la proteína podría ayudar en la eficiencia de encapsulación y las muestras con mayor concentración de proteína de lactosuero mostraron una mejor estabilidad.

También, en el apartado de antioxidantes de origen natural, se trató la capacidad de los hidrolizados de proteínas del suero de la leche para estabilizar física y oxidativamente microcápsulas de aceite de pescado producidas mediante la técnica de secado por atomización, llegando a lograr hasta 11 semanas de almacenamiento para hidrolizados de  $\beta$ -lactoglobulina con tripsina y DH 6% (Tamm et al., 2015, 2016b). Sin embargo, otros hidrolizados de proteínas derivadas de la leche, como las caseínas, presentaban con esta técnica una menor eficiencia de encapsulación y menor estabilidad en el tiempo comparada con la proteína intacta (Drusch et al., 2012).

Las proteínas de soja también han sido estudiadas en microencapsulación de aceites ricos en ácidos grasos Omega-3 como emulsificantes y encapsulantes para estabilizar microcápsulas producidas mediante secado por atomización. Di Giorgio et al. (2019) realizaron un estudio sobre la microencapsulación de aceite de pescado mediante secado por atomización utilizando proteínas procedentes de la soja como agente emulsificante y encapsulante a distintos ratios aceite:proteína (1:1, 2:1, 3:1, 4:1), y con distintos procesos de emulsificación previa a la encapsulación. En este estudio se obtuvieron eficiencias de encapsulación del 88% y tamaños de partícula en torno a 2.5  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, los procesos previos de emulsificación testados, homogeneización con agitación intensa mediante ultraturrax y ultrasonificación, causaron oxidación inicialmente en el aceite. Los autores concluyen que, en el estudio de estabilidad oxidativa acelerada, existen buenas perspectivas de cara a futuros estudios con la muestra homogeneizada solo mediante ultraturrax y con un ratio aceite:proteína de 1:1.

Otros estudios interesantes, que evalúan microcápsulas producidas mediante secado por atomización y que estudian la capacidad de hidrolizados de proteínas alimentarias para estabilizarlas física y oxidativamente, son los de Tamm et al. (2016b) y Morales-Medina et al. (2016). En el primero, se evaluó la influencia de la hidrólisis enzimática sobre el efecto antioxidante del aislado de proteína de guisante y sobre las propiedades

fisicoquímicas de la interfase aceite-agua en emulsiones de aceite de colza microencapsuladas mediante secado por atomización. Se alcanzaron distintos grados de hidrólisis, DH 1, 2, 4, 6, 8%, y se probaron dos enzimas (subtilisina y tripsina). De los hidrolizados con subtilisina sólo el hidrolizado a DH 1% consiguió una emulsión estable. Sin embargo, las emulsiones que contenían hidrolizados derivados de tripsina fueron estables durante el secado por atomización y se consiguieron altas eficiencias de microencapsulación, 94.5-95.6%, y también, los resultados del estudio oxidativo mostraron mayor potencial para reducir la oxidación con respecto a la proteína intacta (Tamm et al., 2016a). Morales-Medina et al. (2016), como se trató en el apartado de antioxidantes naturales, investigaron las propiedades de los hidrolizados de proteínas de sardina y jurel con subtilisina o con tripsina para la microencapsulación de aceite de pescado mediante secado por atomización. Obtuvieron emulsiones físicamente estables para microencapsular con los hidrolizados a DH 5% de ambos sustratos y con los dos tipos de enzima. La eficiencia de encapsulación llegó a ser de hasta el  $98\pm 0.1\%$ . De este modo, los autores confirmaron la idoneidad de los hidrolizados de pescado para su uso en emulsiones con aceite rico en ácidos grasos Omega-3 secadas por atomización (Morales-Medina et al., 2016).

## **4. OBJETIVOS**



La estabilidad oxidativa es el principal desafío en la incorporación de ácidos grasos Omega-3 a matrices alimentarias, como se ha discutido en los antecedentes bibliográficos descritos en el Apartado 3. La oxidación lipídica da lugar a alteraciones en la estabilidad, olor y sabor de los alimentos. Esto hace necesario el empleo de técnicas de estabilización con componentes antioxidantes y emulsificantes que aumenten la estabilidad oxidativa. La efectividad de estas técnicas dependerá de la complejidad de la matriz alimentaria de que se trate (Jacobsen, 2010, 2015). De este modo, los resultados obtenidos en un sistema alimentario, no pueden ser extrapolados a otro sistema alimentario distinto y la técnica empleada para la incorporación de estos ingredientes funcionales a un producto alimenticio debe considerarse cuidadosamente (Jacobsen, 2015). En este sentido, es un reto científico y técnico encontrar péptidos procedentes de la hidrólisis enzimática de proteínas alimentarias con propiedades tanto emulsificantes como antioxidantes, a un nivel adecuado, para estabilizar física y oxidativamente emulsiones y microcápsulas de aceites ricos en ácidos grasos Omega-3 que servirán de vehículo para la incorporación a matrices alimentarias. Candidatos idóneos para testar en estos alimentos por su procedencia natural y sostenible son los hidrolizados de proteínas como la soja y subproductos de la industria alimentaria como el lactosuero, y los descartes de pesca.

El objetivo general de esta tesis doctoral es desarrollar procesos de estabilización de ácidos grasos Omega-3 mediante técnicas de emulsionado y microencapsulado, empleando para ello emulsificantes naturales, con propiedades antioxidantes, de naturaleza peptídica, procedentes de la hidrólisis enzimática de proteínas alimentarias: lactosuero, soja y bacaladilla.

Esta investigación cuenta con los siguientes objetivos específicos:

1. Obtención de hidrolizados de proteínas alimentarias con actividad emulsificante y antioxidante.
2. Estudio de la estabilidad física y oxidativa de emulsiones de aceites ricos en ácidos grasos Omega-3 estabilizadas con hidrolizados de proteínas alimentarias.

3. Microencapsulación de emulsiones de aceites ricos en ácidos grasos Omega-3 estabilizadas con hidrolizados de proteínas alimentarias mediante secado por atomización.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 5.1. Materiales

Los materiales utilizados en esta investigación se agrupan en: sustratos proteicos, enzimas y aceite.

### 5.1.1. Sustratos proteicos

Los sustratos seleccionados son buenos candidatos para la generación de péptidos con actividad emulsificante y antioxidante, según se ha descrito en los antecedentes bibliográficos, además de su procedencia sostenible. El lactosuero es un subproducto de la industria quesera considerado desde hace décadas un componente valioso desde el punto de vista funcional (Muro Urista et al., 2011). El concentrado de proteína de lactosuero (WPC) y sus hidrolizados son ampliamente utilizados en alimentación (Iriundo-Dehond et al., 2018) y resulta útil y significativo poder compararlo con los otros dos sustratos, soja y bacaladilla. El consumo de aislado de proteína de soja (SPI) y, en general, los productos de soja en todo el mundo han ido en aumento por su excelente valor nutricional y su precio asequible (Chua and Liu, 2019). Esta tendencia se debe además a la demanda que existe en la actualidad a usar ingredientes vegetales como fuente de proteínas por razones de salud, dieta y sensibilidades alimentarias (Djuardi et al., 2020). También el aislado de proteína de soja y sus hidrolizados tienen propiedades de interés para aplicaciones industriales como su capacidad emulsificante, espumante y como antioxidante al igual que el lactosuero (Djuardi et al., 2020). Por otro lado, la industria pesquera genera gran cantidad de subproductos y una parte importante de estos la conforman los descartes de pesca (Blanco et al., 2018; García-Moreno et al., 2013). Los descartes representan no solo una infrutilización irresponsable de las reservas pesquera, sino que también tienen un impacto negativo en los ecosistemas marinos (Groenewold and Fonds, 2000). En el Mar Mediterráneo Occidental, la mayoría de los descartes de pesca por arrastre son de bacaladilla. Como se trató en el Apartado 3.2.1., la hidrólisis enzimática de las proteínas procedentes de descartes de bacaladilla (BP) induce propiedades bioactivas con numerosas aplicaciones industriales en alimentación (emulsificante, antioxidante, espumante, capacidad de retención de agua) (Egerton et al., 2018; García-Moreno et al., 2017).

De esta manera, los tres sustratos y sus hidrolizados son candidatos con gran potencial para lograr la estabilidad física y oxidativa en aceites y productos de alimentación enriquecidos en AGPI. Por tanto, en esta investigación como sustratos proteicos se han utilizado: concentrado de proteína de lactosuero (WPC), aislado de proteína de soja (SPI), proteína de bacaladilla procedente de descarte de pesca (BP)

- **Bacaladilla** (*Micromesistius poutassou*) de descarte adquirida en el puerto pesquero de Motril (Granada, España). El contenido de proteína de la bacaladilla era de 18.44% en peso. El pescado entero se trituró en una picadora Sammic SK-3 (Guipúzcoa, España) de acuerdo con el proceso descrito por García-Moreno et al. (2014b) y la mezcla se conservó a -80 °C hasta su uso.
- **Concentrado de proteína de lactosuero** procedente de Wheyco GmbH (Hamburgo, Alemania). El contenido de proteína de lactosuero era de 34.59% en peso.
- **Aislado de proteína de soja** procedente de Solae LLC (San Luís, Misuri EE. UU.). El contenido de proteína del aislado de proteína de soja era de 85.9% en peso.

### 5.1.2. Enzimas

Para la hidrólisis enzimática de los sustratos proteicos se utilizaron dos tipos de enzimas:

- **Subtilisina** (EC 3.4.21.62)  
La enzima subtilisina, comercializada como Alcalasa 2.4 L por Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca), es una serino-proteasa de origen bacteriano originada por *Bacillus licheniformis*. Es estable en un rango de pH entre 5 y 11.5 con máxima actividad entre 50 y 60°C. Esta enzima ataca preferentemente al carboxilo terminal de los aminoácidos hidrofóbicos (Espejo-Carpio, 2012).
- **Tripsina** (EC 3.4.21.4)  
La enzima tripsina, comercializada como PTN 6.0S por Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca), es una proteasa de origen animal que se encuentra en el aparato digestivo de numerosos vertebrados. Es estable en un rango de pH entre de 7 y 9 y a temperaturas entre los 30 y 60°C (Guadix et al., 2000). Esta enzima tiene

preferencia por las posiciones del carboxilo terminal de residuos de arginina y lisina, ambos aminoácidos con grupos cargados positivamente (Espejo-Carpio, 2012).

### **5.1.3. Aceite**

El aceite de pescado refinado utilizado en esta investigación, Omevital 18/12 TG Gold, procede de BASF Personal Care and Nutrition GmbH (Illertissen, Alemania). La composición de ácidos grasos se determinó mediante cromatografía de gases (CG) como describe Morales-Medina et al. (2016). Se obtuvo un contenido de ácido eicosapentaenoico (C20:5n-3) del  $20.29 \pm 0.08\%$  y de ácido docosahexaenoico (C22:6n-3) del  $16.97 \pm 0.09\%$ . El valor de peróxidos (PV) del aceite refinado se midió como se describe en el Apartado 5.2.5.1. y fue de  $0.49 \pm 0.09$  meq O<sub>2</sub>/kg de aceite. El aceite se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad hasta su uso.

## **5.2. Metodología**

La metodología empleada en esta investigación se describe en los siguientes apartados:

### **5.2.1. Hidrólisis enzimática de sustratos proteicos**

En cada sistema sustrato-enzima, las reacciones de hidrólisis tuvieron lugar en un reactor mezcla perfecta encamisado. Para cada sustrato, se tomaron 40 g de proteína, y se homogeneizó con agua desmineralizada hasta alcanzar un volumen final de 400 ml. Por la camisa de calefacción se hizo pasar agua caliente procedente de un baño termostático Julabo High Tech de Julabo GmbH (Seelbach, Alemania) ajustado para mantener la temperatura constante en el interior del reactor. La agitación se generó mediante un agitador magnético Agimatic-E de J.P. Selecta S.A. (Abrera, España) a 500 r.p.m. La temperatura y el pH de reacción se fijaron en  $50^{\circ}\text{C}$  y en 8 respectivamente. Estas condiciones de reacción son adecuadas para la actividad y estabilidad de ambas enzimas (Adler-Nissen, 1986; Espejo-Carpio et al., 2013; Guadix et al., 2000). Fijadas las condiciones de reacción se añade la enzima para el inicio de la hidrólisis. Durante las reacciones de hidrólisis en medio básico, se generan protones al romper los enlaces peptídicos y, para mantener el pH en el valor deseado es necesaria la adición de base

(NaOH) (Camacho et al., 2001). Para el control de la reacción y su monitorización se utilizó un titrino automático 718 Stat Titrino de Metrohm (Herisau, Suiza) con sonda de temperatura y pH y bureta de dosificación de la disolución de NaOH (1M). La Figura 5.1 muestra el dispositivo para la hidrólisis enzimática de los sustratos proteicos.



Figura 5.1 Dispositivo para hidrólisis enzimática de proteínas.

Se produjeron los hidrolizados con los siguientes grados de hidrólisis (DH) 2, 4, 6, 10 y 14%. El grado de hidrólisis se determinó mediante el método de pH-stato (Camacho et al., 2001) que relaciona el consumo de base con el número de enlaces peptídicos escindidos de acuerdo con la Ecuación (1):

$$DH = \frac{B \cdot N_b}{\alpha \cdot m_p \cdot h_{TOT}} \cdot 100 \quad (1)$$

Donde B (ml) es la cantidad de base consumida,  $N_b$  (eq/L) es la normalidad de la base,  $\alpha$  es el grado promedio de disociación de los grupos  $\alpha\text{-NH}_2$  liberados durante la hidrólisis,  $m_p$  (g) es la masa de proteína en el sustrato y  $h_{TOT}$  (meq/g) es el número de equivalentes de enlaces peptídicos por gramo de proteína (Adler Nissen, 1986).

## 5.2.2. Caracterización de hidrolizados

Se determinaron las capacidades emulsificante y antioxidante de cada hidrolizado. Una vez seleccionados los hidrolizados con mejores capacidades se determinó su perfil de aminoácidos y la distribución del tamaño molecular.

### 5.2.2.1. Determinación de las propiedades emulsificantes

La actividad emulsificante se define como la cantidad máxima de aceite que puede ser emulsionada por una cantidad fija de proteína, y la estabilidad de la emulsión, a menudo se ha definido por la velocidad de separación de fases en agua y aceite durante el almacenamiento de la emulsión (Pearce and Kinsella, 1978). La actividad y estabilidad emulsificante se evaluaron de acuerdo con el método descrito por Klompong et al. (2007) basado en el de Pearce y Kinsella (1978) con algunas modificaciones. Este método evalúa la desestabilización de la emulsión (i.e. separación de las fases de aceite y agua por coalescencia de gotas de aceite) por los cambios en la turbidez de las muestras, que se cuantifican por el aumento de absorbancia.

Para cada muestra de hidrolizado, la actividad y la estabilidad emulsificante se determinaron a diferentes pH: 2, 4, 6 y 8. Las muestras de hidrolizados se disolvieron en agua ultra pura y el pH se ajustó con NaOH 1 M o HCl 1 M. La solución acuosa a una concentración de proteína del 0.5% se mezcló con un 15% de aceite vegetal (i.e. aceite de girasol) y se homogeneizó usando un Ultra Turrax de IKA Werke GmbH & Co. (Staufen, Alemania) a 16000 rpm durante 2 minutos (Figura 5.2). Se pipetearon dos alícuotas de la emulsión de 50  $\mu$ l a 0 y 10 minutos y se diluyeron con 5 ml de solución de dodecil sulfato de sodio al 0.1% (SDS). La absorbancia de las muestras se determinó en una cubeta de cuarzo de 10 mm con un espectrofotómetro Cary 100 Bio (Varian, EE. UU.) a una longitud de onda de 500 nm. El índice de actividad emulsionante (EAI) y el índice de estabilidad de la emulsión (ESI) se calcularon mediante las Ecuaciones (2) y (3), respectivamente:

$$IAE \left( \frac{m^2}{g} \right) = \frac{2 \cdot 2.303 \cdot A_0 \cdot DF}{(1 - \theta) \cdot m_p} \quad (2)$$

$$IEE (min) = \frac{A_0 \cdot \Delta t}{A_0 - A_{10}} \quad (3)$$

Donde  $A_0$  y  $A_{10}$  fue la absorbancia medida en el tiempo inicial y después de  $\Delta t=10$  min, respectivamente. Las variables  $m_p$  y  $\theta$  representan la masa de proteína (g) y la fracción de volumen de aceite en la emulsión y DF es el factor de dilución.



Figura 5.2 Ultra Turrax de IKA Werke GmbH & Co.

### 5.2.2.2. Análisis de las propiedades antioxidantes

La actividad antioxidante de los hidrolizados se determinó empleando tres métodos de análisis: actividad inhibidora de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Picot et al., 2010), poder reductor de  $Fe^{3+}$  (Oyaizu, 1986) y actividad quelante de metales (Decker and Welch, 1990).

#### 5.2.2.2.1. Determinación de la actividad inhibidora de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Para la determinación de la actividad inhibidora de DPPH se mezcló 1 ml de cada solución de hidrolizado con 1 ml de DPPH 0.1 mM en metanol y se agitó e incubó durante 30 minutos en la oscuridad. Después se midió la absorbancia a 515 nm. Como blanco se usó agua destilada en lugar de muestra y un control de muestra usando metanol en lugar de solución DPPH. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

La actividad inhibidora de DPPH se calculó mediante la Ecuación (4):

$$\text{Inhibición DPPH \%} = \left(1 - \frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{control}}}{A_{\text{blanco}}}\right) \cdot 100 \quad (4)$$

Donde  $A_{\text{muestra}}$ ,  $A_{\text{control}}$  y  $A_{\text{blanco}}$  son las absorbancias de la muestra, el control y el blanco respectivamente.

Los resultados se expresaron en términos de  $IC_{50}$ , concentración inhibitoria media del hidrolizado, en mg/ml. Es decir, la concentración de hidrolizado necesaria para inhibir al radical DPPH en un 50%.

#### 5.2.2.2.2. Determinación de poder reductor de $Fe^{3+}$

Para la determinación del poder reductor se mezclaron 1 ml de solución de hidrolizado con 1 ml de tampón fosfato 0.2 ml y con 1 ml de ferrocianuro de potasio (1%). La mezcla se incubó a 50°C durante 20 minutos. Después, se añadió 1 ml de tricloroacético (10%) y las muestras se centrifugaron (3000 xg, 10 minutos). Luego, se añadieron 0.2 ml de solución de cloruro férrico (1%) a 1 ml de sobrenadante y 1 ml de agua destilada. Después de 10 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 700 nm. Las mediciones se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron en términos de  $IC_{50}$  del hidrolizado en mg/ml, que representa la concentración de hidrolizado que da una absorbancia de 0.5.

#### 5.2.2.2.3. Determinación de la actividad quelante de $Fe^{2+}$

Para la determinación de la actividad quelante se mezclaron 1 ml de solución de hidrolizado con 3.7 ml de agua destilada y 0,1 ml de solución de cloruro ferroso 2 mM. La reacción se inhibió después de 3 minutos añadiendo 0,2 ml de solución de ferrozina 5 mM. Después, las muestras se agitaron vigorosamente y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. La absorbancia se midió a 562 nm. Se usó agua destilada como blanco y como control de muestra no se añadió ferrozina. Las mediciones se realizaron por triplicado. La actividad quelante de metales se calculó mediante la Ecuación (5):

$$\text{Actividad quelante de metales (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{control}}}{A_{\text{blanco}}}\right) \cdot 100 \quad (5)$$

Donde  $A_{\text{muestra}}$ ,  $A_{\text{control}}$  y  $A_{\text{blanco}}$  son las absorbancias de la muestra, el control y el blanco respectivamente.

Los resultados se expresaron en términos de  $IC_{50}$  del hidrolizado en mg/ml, estimado como la concentración de hidrolizado que pudo quelar la mitad de iones  $Fe^{2+}$  en el ensayo.

### 5.2.2.3. Determinación del perfil de aminoácidos

La composición de aminoácidos se determinó por digestión ácida de las muestras y separación por cromatografía de fase inversa de acuerdo con Liu et al. (1995). La separación se llevó a cabo utilizando un sistema Waters Alliance 2695 AccQ-Tag D de Waters Corporation (Milford, Massachusetts, EE.UU.) como se describe a continuación. Se disolvieron 100 mg de muestra de hidrolizado en polvo en 5 ml de HCl 6 M durante 24 horas a 112°C. Esta reacción se realizó bajo atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación de aminoácidos. Después de enfriar, las muestras se diluyeron con agua ultra pura una concentración de proteína de 10 mg/ml y se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0.45  $\mu\text{m}$  (Cronun 25 mm PES FFPS2545, EMD Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) para eliminar las partículas en suspensión. Una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  de este filtrado se mezcló con 70  $\mu\text{l}$  de tampón de borato y 20  $\mu\text{l}$  del reactivo de derivación (AccQ® Fluor Reagent WAT052880, Waters Corporation), que consiste en una solución de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) en acetonitrilo. La reacción tuvo lugar a 55°C durante 10 minutos, formando derivados de urea asimétricos que presentan una alta emisión de fluorescencia. Los derivados se separaron posteriormente por cromatografía de fase inversa, empleando el sistema Waters Alliance 2695 montado con la columna AccQ-Tag (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EE. UU.). Las muestras se eluyeron en una fase móvil compuesta de AccQ-Tag Eluyente A, acetonitrilo y agua a 37°C y los derivados se detectaron después de la separación por el detector de fluorescencia de barrido Waters 474.

#### 5.2.2.4. Distribución de tamaño molecular

La distribución del tamaño molecular de los hidrolizados se determinó mediante un sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) de Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala, Suecia) montado con una columna GL Superdex Peptide 10/300 de GE Healthcare (Uppsala, Suecia) de acuerdo con Espejo-Carpio et al. (2013). Se diluyeron las muestras de los hidrolizados liofilizados en agua ultra pura a una concentración de proteína de 5 mg/ml. Para realizar el análisis, se inyectó una alícuota de 500  $\mu$ L de la disolución anterior y se eluyó a 0.5 ml/min utilizando 0.5 ml/min de agua como fase móvil. Al final de la columna se monitorizó la absorbancia fijada en 280 nm. Se utilizaron como patrones Glicina (75 Da), alanina (89 Da), Phe-Gly-Gly (279 Da), (Gly) 6 (360 Da), vitamina B12 (1355 Da), insulina (5733 Da), aprotinina (6511 Da) y ribonucleasa (13700 Da). Cada muestra se procesó por triplicado.

#### 5.2.3. Emulsionado

El proceso de emulsionado requiere aporte de energía y la presencia de un emulsionante para la formación y estabilidad de la emulsión. Para la producción de las emulsiones se sigue la metodología empleada por García-Moreno et al.(2016a). Se fijó un contenido en proteína del 2% (p/p) y 5% (p/p) de aceite de pescado. En primer lugar, se realiza una pre homogeneización agitando en Ultra Turrax (IKA Werke GmbH & .Co., Staufen, Alemania) a 16000 rpm durante 2 minutos y se añade el aceite de pescado durante el primer minuto (Figura 5.2). Después, la homogeneización se realizó en un homogeneizador de alta presión (Panda Plus 2000, GEA Niro Soavi, Lübeck, Alemania) a 450/75 bar en tres ciclos (Figura 5.3). En el homogeneizador de alta presión, la emulsión primaria o pre emulsión, obtenida tras la pre homogeneización en Ultra Turrax, se fuerza a pasar por la cámara de presión a través de una válvula. La combinación de cizalladura intensa, cavitación y condiciones de flujo turbulento transforma las gotas a un tamaño de partícula entre 0.1 y 2  $\mu$ m (Genot et al., 2013).

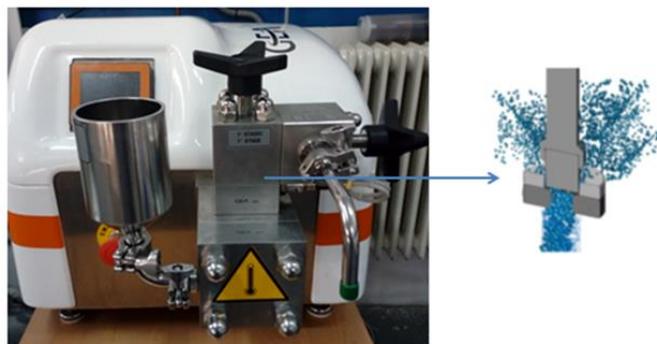


Figura 5.3 Homogeneizador de alta presión Panda Plus 2000 de GEA Niro Soavi S.p.A.

#### 5.2.4. Determinación de las propiedades físicas de las emulsiones

Las propiedades físicas de las emulsiones de aceites enriquecidos en ácidos grasos Omega-3 se evaluaron mediante la determinación del potencial zeta, distribución de tamaño de gota, test de creaming y, por microscopía óptica, se caracterizaron de forma cualitativa las estructuras físicas de las emulsiones.

##### 5.2.4.1. Potencial zeta

Como medida inicial de estabilidad física de las emulsiones, se determinó el potencial zeta a día 1 para obtener información sobre la carga superficial de las partículas/gotas en la interfase aceite-agua de las emulsiones.

El potencial zeta se determinó en un Zetasizer Nano ZS de Malvern Instruments Ltd. (Worcestershire, Reino Unido). Las emulsiones se diluyeron 1:1000 en agua destilada ajustando el pH a la emulsión original, esto es; pH igual a 2 para BPH4 y pH igual a 8 para WPH10 y SPH2. Las mediciones se hicieron por triplicado.

##### 5.2.4.2. Determinación del tamaño de gota de las emulsiones

La distribución del tamaño de gota se determinó por difracción láser en un analizador de tamaño de partículas por difracción láser Mastersizer 2000 de Malvern Instruments Ltd. (Worcestershire, Reino Unido). Se usaron los índices de refracción del aceite de girasol (1.469) y el agua (1.330) para partículas y dispersantes, respectivamente. Las distribuciones de tamaño de gota se obtuvieron en diámetro del percentil 90 ( $D_{90}$ ),

diámetro medio en volumen o de Brouckere ( $D_{4,3}$ ) y diámetro en volumen/superficie o de Sauter ( $D_{3,2}$ ), Ecuaciones (6) y (7). Las medidas se realizaron por duplicado.

$$D_{4,3} = \frac{\sum n_i \cdot d_i^4}{\sum n_i \cdot d_i^3} \quad (6)$$

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i \cdot d_i^3}{\sum n_i \cdot d_i^2} \quad (7)$$

Donde  $n_i$  es el número de gotas de aceite con diámetro  $d_i$ .

#### **5.2.4.3. Test de creaming y caracterización cualitativa de la estructura**

En estados más avanzados de agregación en las emulsiones se puede dar separación de fases y para evaluar ese efecto se emplea el test de creaming. Las emulsiones se colocaron en tubos graduados por duplicado y el índice de formación de crema se calculó durante el almacenamiento en porcentaje de separación de fases (Petursson et al., 2004).

Se evaluó la estructura de la emulsión de forma cualitativa por microscopía óptica con 20x/63x en un microscopio Axio Zeiss Lab A1 de Carl Zeiss Suzhou Co., Ltd. (Suzhou, China).

#### **5.2.5. Evaluación de la estabilidad oxidativa de las emulsiones**

La estabilidad oxidativa de las emulsiones se evaluó mediante la determinación del contenido de peróxidos e índice de anisidina y la cuantificación e identificación de productos de oxidación secundarios volátiles según se describe a continuación.

##### **5.2.5.1. Determinación del contenido de peróxidos (PV) de las emulsiones**

Las extracciones del aceite se realizaron a temperatura ambiente con una mezcla de 2-propanol/hexano (1:1, v/v) centrifugando a 670 g durante 2 minutos y evaporando, posteriormente, el hexano del sobrenadante que contiene el aceite mediante una corriente de  $N_2$ .

El contenido de hidroperóxidos se determinó utilizando el ensayo de tiocianato (Drusch et al., 2012). Para ello, se diluyeron 10 mg de aceite extraído con 5 ml de 2-propanol y

se mezclaron con 50  $\mu$ l de cloruro de hierro II y 50  $\mu$ l de tiocianato de amonio. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 60°C. La absorbancia se midió a 485 nm. Las extracciones se realizaron por duplicado y las muestras se realizaron por cuadruplicado.

#### **5.2.5.2. Determinación del índice de anisidina (AI) de las emulsiones**

El método de determinación se llevó a cabo de acuerdo con la norma ISO 6885: 2006. Se basa en la reacción de la *p*-anisidina diluida en ácido acético con los aldehídos  $\alpha$  y  $\beta$  insaturados presentes en el aceite extraído. Los resultados se expresaron como 100 veces el incremento de la absorbancia, medido a una longitud de onda de 350 nm en una celda de 10 mm, de una solución de prueba cuando se hizo reaccionar con anisidina en las condiciones de especificadas en el Estándar Internacional (ISO, 2006). Las muestras se realizaron por triplicado.

#### **5.2.5.3. Cuantificación e identificación de productos de oxidación secundarios volátiles (Dynamic Headspace GC-MS)**

La determinación de los productos de oxidación secundaria se realizó con la técnica headspace según García-Moreno et al. (2016a) con algunas modificaciones. Se pesaron aproximadamente 4 g de emulsión y 30 mg de patrón interno (4-metil-1-pentanol, 30  $\mu$ g/g de agua) en una botella de purga de 100 ml. A esto, se le añadieron 5 ml de agua destilada y 1 ml de antiespumante (Synperonic 800  $\mu$ l/l de agua). La botella de purga se calentó en un baño de agua a 45°C mientras se purgaba con nitrógeno (flujo 150 ml/min, 30 minutos). Los productos de oxidación secundaria volátiles quedaron atrapados en tubos Tenax GR. Los volátiles se desorbieron nuevamente por calor (200°C) en un desorbedor térmico automático (ATD-400, Perkin Elmer, Norwalk, CN, EE.UU), con una trampa fría a -30°C y se liberó nuevamente (220°C). La muestra se condujo a un cromatógrafo de gases (HP 5890IIA, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, EE.UU; Columna: DB-1701, 30 m x 0.25 mm x 1.0  $\mu$ m; J&W Scientific, CA, EE.UU). La temperatura inicial del horno fue de 45 °C durante 5 min, aumentando con 1.5 °C/min hasta 55°C, con 2.5°C/min hasta 90°C, y con 12.0°C/min hasta 220°C, donde se mantuvo durante 4 minutos. Los compuestos individuales se analizaron por espectrometría de masas (detector selectivo de masas HP 5972, Agilent Technologies,

EE.UU.; Modo de ionización de electrones, 70 eV; relación de masa-carga entre 30 y 250). Los compuestos individuales se identificaron mediante búsquedas en la biblioteca MS (Wiley 138 K, John Wiley and Sons, Hewlett-Packard) y se cuantificaron mediante curvas de calibración. Los estándares externos empleados fueron 3-metil-butanal, 3-metil-butanol, 1-penten-3-ona, pentanal, 1-penten-3-ol, (E)-2-pentenal, 1-pentanol, hexanal, (E)-2-hexenal, heptanal, (Z)-4-heptenal, octanal, benzaldehído, (E, E) -2,4-heptadienal, (E,Z)-2,6-nonadienal, (E,E)-2,4-octadieno, 2-etilfurano y 2-pentifurano. Las mediciones se realizaron por triplicado en cada muestra.

### **5.2.6. Microencapsulación mediante secado por atomización**

El secado por atomización para la microencapsulación de las emulsiones se realizó en un secadero de laboratorio Büchi B-190 Spray Dryer de Büchi Labortechnik (Flawill, Suiza) (Figura 5.4). La emulsión (1) se bombea hacia la cámara de secado (6) donde se encuentra el atomizador (3) que la pulveriza mediante aire comprimido (4). Las pequeñas gotas de emulsión se secan y son arrastradas por el aire hasta el ciclón (7) donde son separadas. Las partículas se recogen en el receptáculo del producto (8) y el aire sale al exterior libre de partículas. A la salida del ciclón se encuentra el ventilador de aspiración (9) que genera la circulación de aire en el equipo. La entrada de aire se encuentra en la parte superior del equipo (2) donde está la resistencia eléctrica (5) que calienta el aire hasta la temperatura deseada. Para controlar la temperatura del aire a la entrada y a la salida de la cámara de secado se utilizan dos sondas de temperatura (10).

Los secados se realizaron a caudal de aire de 25 Nm<sup>3</sup>/h. Por el atomizador de 0.5 mm de diámetro se hizo pasar 600 L/h de aire comprimido (Espejo-Carpio, 2012) para proporcionar un tamaño de partícula adecuado. Se fijó una temperatura de entrada de aire de 180°C y el caudal de entrada de las emulsiones se ajustó para obtener una temperatura de salida de aire de 90°C.

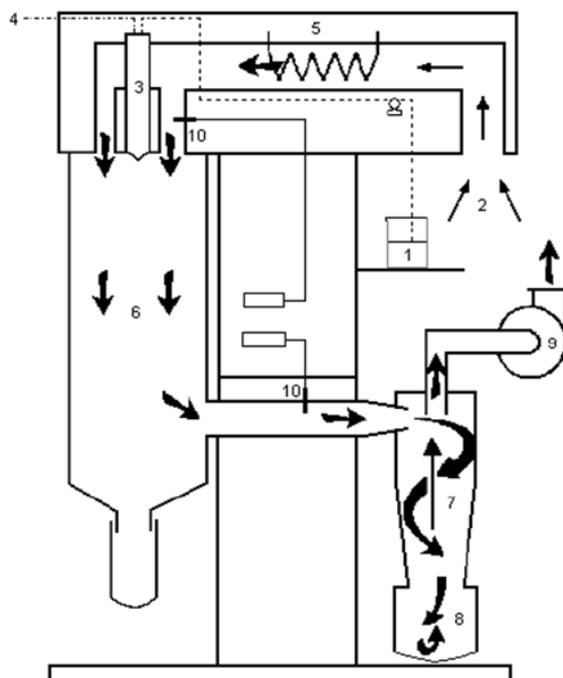


Figura 5.4 Esquema del secadero por atomización Büchi B-190 (Espejo-Carpio, 2012).

### 5.2.7. Caracterización física de los microencapsulados

La caracterización física de los microencapsulados se llevó a cabo mediante la determinación del contenido en humedad, actividad del agua, eficiencia de encapsulación y distribución del tamaño de partícula.

#### 5.2.7.1. Humedad

El contenido de humedad de las cápsulas secadas por atomización se determinó usando una balanza infrarroja AD-471A de A&D (Tokio, Japón). Aproximadamente, 1 g de microencapsulado (polvo) se calentó a 105°C durante 90 minutos hasta peso constante.

#### 5.2.7.2. Actividad de agua

Las medidas de actividad de agua se realizaron en un analizador LabMASTER-aw de Novasina AG (Lachen, Suiza). La temperatura se ajustó a 20°C.

### 5.2.7.3. Eficiencia de microencapsulación (EM)

La eficiencia de microencapsulación (EM) se determinó según el método descrito por Danviriyakul et al. (2002) con algunas modificaciones. Para ello, se añadieron 2.5 g de cápsulas en 15 ml de hexano y se agitó la mezcla durante 2 minutos utilizando un agitador tipo vórtex. Posteriormente, se centrifugó a 2720 g durante 20 minutos y se recogieron 5 ml de sobrenadante. Con este volumen fue posible calcular el aceite no encapsulado con la Ecuación (8) evaporando el hexano mediante una corriente de N<sub>2</sub> y pesando el aceite contenido en ese volumen. Cada medida se realizó por duplicado.

$$EM \% = \left( \frac{A_T - A_{NE}}{A_T} \cdot 100 \right) \quad (8)$$

Donde A<sub>T</sub> es la masa de aceite total teórico (g) y A<sub>NE</sub> es la masa de aceite no encapsulado (g).

### 5.2.7.4. Distribución del tamaño de emulsión reconstituida

Para la determinación del tamaño de gota se reconstituyeron las emulsiones microencapsuladas disolviendo el polvo en agua destilada para alcanzar el mismo contenido de sólidos que las emulsiones originales.

La distribución del tamaño se determinó por difracción láser como se ha descrito en el Apartado 5.2.4.2. La distribución de tamaño se obtuvo en diámetro del percentil 90 (D<sub>90</sub>), diámetro medio en volumen o de Brouckere (D<sub>4,3</sub>) y diámetro en volumen/superficie o de Sauter (D<sub>3,2</sub>), Ecuaciones (6) y (7). Las medidas se realizaron por duplicado.

### 5.2.8. Evaluación de la estabilidad oxidativa de los microencapsulados

La estabilidad oxidativa de los microencapsulados se evaluó mediante la determinación del contenido de peróxidos. Las extracciones del aceite y el valor de peróxidos (PV) de los microencapsulados se realizaron como se ha descrito en el Apartado 5.2.5.1., disolviendo previamente la proporción de microencapsulado correspondiente a 30 mg

de aceite en 2.5 ml de agua. Las extracciones se realizaron por duplicado y las muestras se realizaron por triplicado.

### **5.2.9. Análisis estadístico**

El análisis de varianza (ANOVA) para identificar diferencias significativas se realizó mediante el software Statgraphics (versión 5.1) de Statgraphics.Net. (Madrid, España). Los valores medios se compararon mediante el test de Tukey de múltiples rangos. Las diferencias entre medias se consideraron significativas a valores de  $p \leq 0.05$ .

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## **6.1. Obtención de hidrolizados de proteínas alimentarias con actividad emulsificante y antioxidante**

### **6.1.1. Objetivos y tareas**

El objetivo de este capítulo es la obtención de péptidos con actividad emulsificante y antioxidante mediante la hidrólisis enzimática de concentrado de proteína de lactosuero, aislado de proteína de soja y proteína de bacaladilla.

En primer lugar, se llevan a cabo las hidrólisis enzimáticas de los sustratos proteicos en un amplio rango de grados de hidrólisis. Posteriormente, se determinan las propiedades emulsificantes de cada hidrolizado y se desarrollan modelos matemáticos para optimizar estas propiedades en función del sustrato, grado de hidrólisis de los hidrolizados y pH de la emulsión. Debido a la distinta especificidad de las enzimas se propuso un modelo para cada enzima estudiada. El procedimiento de optimización permite seleccionar el hidrolizado con las mejores propiedades emulsificantes a un pH de emulsión determinado. Para validar ese resultado se estudia la estabilidad física y oxidativa de una emulsión producida con el hidrolizado de propiedades emulsificantes optimizadas de acuerdo a los modelos obtenidos.

A continuación, se evalúa la capacidad antioxidante de los hidrolizados. Se estudia la influencia del grado de hidrólisis, el tipo de enzima utilizada y sustrato proteico sobre las propiedades antioxidantes de los hidrolizados.

Finalmente, se seleccionan los hidrolizados con mejores propiedades emulsificantes y antioxidantes de cada sustrato.

### **6.1.2. Procedimiento experimental**

Comprende el procedimiento de hidrólisis enzimática de los sustratos proteicos, los métodos empleados para evaluación de las propiedades emulsificantes y para el análisis de las propiedades antioxidantes de los hidrolizados de concentrado de proteína de lactosuero, aislado de proteína de soja y proteína de bacaladilla procedente de descartes de pesca.

### **6.1.2.1. Hidrólisis enzimática**

Las hidrólisis de concentrado de proteína de lactosuero (WPC), aislado de proteína de soja (SPI) y proteína de bacaladilla (BP), se llevaron a cabo según el procedimiento descrito en el Apartado 5.2.1., a diferentes grados de hidrólisis, DH 2, 4, 6, 10 y 14% y con cada enzima, subtilisina y tripsina. Se realizaron, por tanto, un total de 30 hidrólisis enzimáticas (3 sustratos x 5 DH x 2 enzimas).

Tras la hidrólisis las muestras se calentaron a 90°C durante 5 minutos para desactivar la enzima. Posteriormente, los hidrolizados obtenidos se liofilizaron en un liofilizador Labconco de Labconco Corporation (Kansas City, Misuri, EE.UU.).

El contenido de proteína tanto de los sustratos como de los hidrolizados en polvo se determinó por el método de Kjeldahl, utilizando un factor de conversión de nitrógeno a proteína de 6.38 para concentrado de proteína de suero y aislado de proteína de soja y 6.25 para proteína de bacaladilla (Adler-Nissen, 1986).

### **6.1.2.2. Evaluación de las propiedades emulsificantes de los hidrolizados**

Para la evaluación de las propiedades emulsificantes de los hidrolizados, se determinaron los índices de actividad y estabilidad emulsionante. Se obtuvieron modelos estadísticos para la optimización de las dos propiedades para obtener un hidrolizado con las mejores características emulsificantes.

#### **6.1.2.2.1. Determinación de la actividad y estabilidad emulsificante**

La actividad y la estabilidad emulsificante de cada muestra de hidrolizado de WPC, SPI y BP a DH 2, 4, 6, 10 y 14% fueron determinadas a diferentes pH: 2, 4, 6 y 8, según el método descrito en el Apartado 5.2.2.3.

#### **6.1.2.2.2. Modelo estadístico y optimización de las propiedades emulsificantes**

##### **- Diseño estadístico y modelo de regresión**

Los hidrolizados de concentrado de proteína de lactosuero y aislado de proteína de soja, presentan propiedades emulsificantes en un rango amplio de pH y DH, mientras que los

de bacaladilla sólo presentaron propiedades emulsificantes en un rango muy estrecho de DH y pH. Por esto motivo, se seleccionaron los hidrolizados de concentrado de proteína de lactosuero y aislado de proteína de soja para desarrollar modelos matemáticos para optimización de las propiedades emulsificantes. Estos modelos matemáticos pueden predecir las características y condiciones óptimas para conseguir el emulsificante más eficiente. Con el objetivo de modelar las propiedades emulsificantes de los hidrolizados se consideraron como variables de entrada: el sustrato (WPC y SPI), el grado final de hidrólisis y el pH de la emulsión. Estas variables se relacionaron con las variables de salida, actividad y estabilidad emulsificante (IAE, IEE) mediante modelos de regresión múltiple. Debido a la distinta especificidad de las enzimas se propuso un modelo para cada enzima (E) estudiada, subtilisina y tripsina. Para este fin, los factores experimentales se variaron de acuerdo con un diseño factorial, involucrando variables categóricas y numéricas. El sustrato (S) es una variable categórica, con dos niveles, es decir, lactosuero y soja. El pH de la emulsión y el grado final de hidrólisis (DH) son variables continuas numéricas que se probaron en 4 niveles, pH 2, 4, 6 y 8, y 5 niveles, DH 2, 4, 6, 10 y 14%, respectivamente. Por lo tanto, el diseño factorial para cada modelo comprendió  $2 (S) \times 4 (pH) \times 5 (DH) = 40$  ensayos experimentales. Para cada ejecución experimental, el índice de actividad de la emulsión (IAE  $m^2/g$ ) y el índice de estabilidad de la emulsión (IEE, min) se determinaron como salidas numéricas para cada enzima.

La naturaleza de las variables de entrada sugirió emplear modelos de regresión con factores mixtos categóricos y continuos. Las variables categóricas se pueden incorporar en un modelo de regresión como entradas numéricas eligiendo un método de codificación apropiado. Entre las diferentes alternativas descritas en la literatura, se eligió el método de codificación ficticia para este trabajo (Davis, 2010; Nagadevara, 2019). Mediante este enfoque, los niveles de sustrato se codificaron como 1 (concentrado de proteína de suero, WPC) y 2 (aislado de proteína de soja, SPI).

Basado en la tendencia mostrada por IAE y por IEE con el pH y el DH, se propusieron modelos cúbicos para la regresión múltiple. Los modelos cúbicos, expresados por la Ecuación (9) para cada enzima (subtilisina (a) y tripsina (b)), comprenden términos

lineales, cuadráticos y cúbicos para las variables numéricas, así como sus interacciones binarias y ternarias con las variables categóricas.

La intersección y los coeficientes de los modelos cúbicos se estimaron mediante regresión múltiple. Se realizó un análisis ANOVA para evaluar la significancia de cada término de los modelos de regresión. Se calculó una probabilidad asociada (valor  $p$ ) para cada efecto, es decir, término lineal, cuadrático, cúbico o de interacción en el polinomio, a un nivel de confianza del 95%. Esos efectos con valores de  $p$  superiores a 0.05 no se consideraron estadísticamente significativos en las respuestas IAE o IEE, y se eliminaron de los modelos cúbicos. El método backward selection (Kroese and Chan, 2014) fue elegido para este propósito. Este enfoque consiste en eliminar secuencialmente aquellos términos con un valor  $p$  más alto, hasta obtener un modelo reducido final donde todos los términos son significativos (es decir, valor  $p < 0.05$ ) en la variable de respuesta.

$$\begin{aligned}
 (a) \quad \{IAE, IEE\}_{Subtilisina} &= b_0 + b_1 \cdot S + b_2 \cdot DH + b_3 \cdot pH + b_{12} \cdot S \cdot DH + b_{13} \cdot S \cdot pH + b_{23} \\
 &\quad \cdot DH \cdot pH + b_{22} \cdot DH^2 + b_{33} \cdot pH^2 + b_{123} \cdot S \cdot DH \cdot pH + b_{122} \cdot S \cdot DH^2 + b_{133} \\
 &\quad \cdot S \cdot pH^2 + b_{222} \cdot DH^3 + b_{223} \cdot DH^2 \cdot pH + b_{333} \cdot pH^3 + b_{332} \cdot pH^2 \cdot DH \\
 (b) \quad \{IAE, IEE\}_{Tripsina} &= c_0 + c_1 \cdot S + c_2 \cdot DH + c_3 \cdot pH + c_{12} \cdot S \cdot DH + c_{13} \cdot S \cdot pH + c_{23} \\
 &\quad \cdot DH \cdot pH + c_{22} \cdot DH^2 + c_{33} \cdot pH^2 + c_{123} \cdot S \cdot DH \cdot pH + c_{122} \cdot S \cdot DH^2 + c_{133} \cdot S \\
 &\quad \cdot pH^2 + c_{222} \cdot DH^3 + c_{223} \cdot DH^2 \cdot pH + c_{333} \cdot pH^3 + c_{332} \cdot pH^2 \cdot DH
 \end{aligned} \tag{9}$$

Para la realización de estos cálculos se utilizó el software Statgraphics (versión 5.1) de Statgraphics.Net. (Madrid, España).

#### - Optimización de las propiedades emulsificantes

Los modelos de regresión expresados por la Ecuación (9) son polinomios de tercer grado, que pueden optimizarse para obtener un máximo para cada respuesta estudiada (IAE, IEE). La maximización de cada variable de respuesta es deseable para asegurar que el hidrolizado pueda estabilizar la emulsión dentro del período de almacenamiento. Según los datos experimentales, las condiciones de operación que maximizan el IAE no

coinciden con las que maximizan el IEE. El comportamiento conflictivo de los factores experimentales sugirió combinar ambos objetivos en una sola función OBJ (S, pH, DH) de acuerdo con el método de suma ponderada (Marler and Arora, 2010). En este caso, el problema de optimización que se estableció fue encontrar la combinación de factores (es decir, S, pH, DH) dentro de su rango experimental que maximizara la función objetivo, Ecuación (10):

$$\text{Maximizar OBJ}(S, DH, pH) = w \cdot \text{IAE} + (1 - w) \cdot \text{IEE} \quad (10)$$

$$\text{Con: } S \in \{1, 2\}; 2 \leq DH \leq 14; 2 \leq pH \leq 8$$

El coeficiente  $w$  es el factor de peso, que representa la importancia relativa atribuida a un solo objetivo dado. Por ejemplo,  $w = 1$  plantea la optimización única del índice de actividad de la emulsión. En nuestro caso, donde no predomina un solo objetivo,  $w = 0.5$ . Las respuestas IAE e IEE fueron normalizadas dentro del intervalo (0,1).

El algoritmo evolutivo, implementado en la herramienta Solver del software MS Excel, fue elegido para la optimización.

#### **6.1.2.2.3. Producción de la emulsión estabilizada con el hidrolizado con mejor capacidad emulsificante**

Se produjeron dos emulsiones, una con el hidrolizado con mejores propiedades emulsificantes (SHT6.5) y otra con aislado de proteína de soja sin hidrolizar (SPI), como emulsión de control. Las emulsiones contenían un 2% (p/p) de proteína y 5% (p/p) de aceite de pescado (García-Moreno et al., 2016a). El hidrolizado con mejores propiedades emulsificantes y la proteína de aislado de proteína de soja sin hidrolizar se disolvieron en agua destilada. El pH se ajustó a 8 para ambas emulsiones mediante la adición de soluciones de NaOH 1M. En primer lugar, la preemulsión se realizó agitando en Ultra Turrax (IKA Werke GmbH & .Co., Staufen, Alemania) a 16000 rpm durante 2 minutos y se añadió el aceite de pescado durante el primer minuto (Figura 5.2). Después, la homogeneización se realizó en un homogeneizador de alta presión (Panda Plus 2000, GEA Niro Soavi, Lübeck, Alemania) a 450/75 bar en tres ciclos (Figura 5.3)

Para acelerar la oxidación de lípidos, se añadió a las emulsiones una solución de  $\text{FeSO}_4$  100 mM (4  $\mu\text{l}$  por 1 g de emulsión). También se agregó una solución de 0.0125 g/ml de azida de sodio para evitar el deterioro microbiano durante el almacenamiento. Las emulsiones se almacenaron en oscuridad a 20°C durante 10 días en botellas de vidrio de 30 ml y 26 mm de diámetro interno. Cada botella contenía 10 ml de emulsión. Se tomaron muestras en los días 0, 1, 3, 6 y 10 para las medidas de estabilidad física y oxidativa.

#### **6.1.2.2.4. Estudio de estabilidad física y oxidativa de la emulsión estabilizada con el hidrolizado con mejor capacidad emulsificante**

El estudio acelerado de estabilidad física y oxidativa tuvo lugar durante 10 días a 20°C en oscuridad.

##### **6.1.2.2.4.1. Evaluación de la estabilidad física**

Para evaluar la estabilidad física de la emulsión SHT6.5 y de la emulsión de control SPI, se determinó el potencial zeta, como medida de la estabilidad inicial de las emulsiones, y la distribución del tamaño de gota.

###### **6.1.2.2.4.1.1. Potencial zeta**

El potencial zeta de las emulsiones se determinó según el procedimiento descrito en el Apartado 5.2.4.1. a día 1 para obtener información sobre la carga superficial de las gotas en la interfase aceite-agua, que refleja la estabilidad inicial de las emulsiones.

###### **6.1.2.2.4.1.2. Distribución del tamaño de gota**

La distribución de tamaño de gota de las emulsiones se determinó como se describe en el Apartado 5.2.4.2. Las determinaciones se realizaron a día 0, 1, 3, 6 y 10 de almacenamiento. Los resultados se obtuvieron en diámetro del percentil 90 ( $D_{90}$ ), diámetro medio en volumen o de Brouckere ( $D_{4,3}$ ) y diámetro en volumen/superficie o de Sauter ( $D_{3,2}$ ).

#### 6.1.2.2.4.2. Evaluación de la estabilidad oxidativa

Se evaluó la estabilidad oxidativa de la emulsión SHT6.5 y de la emulsión de control SPI, mediante la determinación del contenido de peróxidos, índice de anisidina y valor de oxidación total.

##### 6.1.2.2.4.2.1. Determinación del contenido de peróxidos (PV) y del índice de anisidina (AI) de las emulsiones

El contenido de peróxidos y el índice de anisidina de la emulsión estabilizada con el hidrolizado y la emulsión estabilizada con SPI sin hidrolizar se determinaron como se describe en el Apartado 5.2.5.1. y en el Apartado 5.2.5.2., respectivamente. Las determinaciones se realizaron a día 0, 1, 3, 6 y 10 de almacenamiento.

##### 6.1.2.2.4.2.2. Valor de oxidación total (TOTOX)

Para cuantificar la generación global de los productos de oxidación se determinó el valor de oxidación total (TOTOX). Este es un índice de oxidación integral calculado a partir de la suma ponderada del valor de peróxidos (PV) y el valor de *p*-anisidina (AV) de la siguiente manera (Ecuación 11):

$$TOTOX = 2 \cdot PV + AV \quad (11)$$

#### 6.1.2.3. Análisis de la capacidad antioxidante de los hidrolizados

Para la determinación de la actividad antioxidante de los hidrolizados, se evaluó la capacidad de los hidrolizados para inhibir radicales libres mediante el método de determinación de actividad inhibidora del radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) descrito en el Apartado 5.2.2.4.1. Además, se determinó el poder reductor de  $Fe^{3+}$  de los hidrolizados y su actividad quelante de metales mediante los métodos descritos en los Apartados 5.2.2.4.2. y 5.2.2.4.3. respectivamente.

### 6.1.3. Resultados y discusión

Con cada sustrato seleccionado, concentrado de proteína de lactosuero (WPC), aislado de proteína de soja (SPI) y proteína de bacaladilla de descarte (BP) se obtuvieron hidrolizados enzimáticos a DH: 2, 4, 6, 10 y 14%, empleando las enzimas subtilisina y

tripsina. En cada caso se determinaron los índices de actividad emulsionante (IAE) y de estabilidad de la emulsión (IEE) a pH: 2, 4, 6 y 8 y sus propiedades antioxidantes.

#### **6.1.3.1. Estudio de las propiedades emulsificantes**

Los valores de IAE y IEE para cada sustrato proteico, WPC, SPI y BP, se muestran en las Figuras 6.1, 6.2, y 6.3 respectivamente. La capacidad emulsionante de los péptidos depende fundamentalmente de la fuente de proteína, del grado de hidrólisis (DH), el tipo de enzima y el pH de la emulsión (Chalamaiah et al., 2012; Ipsen et al., 2001)

Como se muestra en la Figura 6.1, en las emulsiones de aceite en agua estabilizadas con hidrolizado de WPC, independientemente de la enzima utilizada en la hidrólisis, los niveles del IAE disminuyeron ligeramente con el DH, presentando un valor promedio entre 8 y 10 m<sup>2</sup>/g. Este empeoramiento con el aumento de DH fue más pronunciado para la emulsión a pH 4, donde IAE disminuyó hasta valores de 2-3 m<sup>2</sup>/g. Al aumentar el grado de hidrólisis, el tamaño de los péptidos de los hidrolizados es más pequeño. Estos péptidos pequeños no son lo suficientemente anfifílicos para exhibir buenas propiedades emulsionantes. Además, migran rápidamente y se adsorben en la interfase, pero muestran menos eficiencia para disminuir la tensión en la interfase aceite-agua, ya que, no pueden desplegarse y reorientarse como los péptidos grandes para estabilizar la emulsión (Klompong et al., 2007; Schröder et al., 2017).

En cuanto a los valores de IEE, fluctuaron a lo largo del intervalo de DH, presentando los valores más elevados a DH 10% y pH 8 con subtilisina y DH 14% y pH 8 con tripsina. Estos resultados están en línea con Scherze y Muschiolik (2001), quienes obtuvieron propiedades emulsionantes óptimas para emulsiones de aceite en agua estabilizadas con hidrolizados de WPC a DH 10%. La estabilidad de esas emulsiones además se mantuvo incluso con hidrolizados a DH 20%, pero en hidrólisis más extensas a DH 27% esa estabilidad no fue posible.

Los cambios en el pH de la emulsión alteran la carga neta de la proteína (Kralova and Sjöblom, 2009) y su conformación en la interfase (McClements and Gumus, 2016), lo que afecta a sus capacidades en la emulsión. Los valores más bajos de IAE y IEE se observaron a pH 4 y 6. Cerca del punto isoeléctrico de las proteínas su solubilidad es

menor (Joye and McClements, 2014; Lieske and Konrad, 1996; Pearce and Kinsella, 1978; Taheri et al., 2014; Taherian et al., 2011), lo que, en emulsión, puede fomentar la coalescencia y floculación debido a su menor facilidad para difundirse y absorberse en la interfase (Lieske and Konrad, 1996; Qi et al., 1997). Así, se aprecia que los valores de pH alejados del punto isoeléctrico mejoraron la estabilidad de la emulsión, como se muestra en la Figura 6.1, donde los valores más elevados de IAE y IEE se alcanzan en las emulsiones a pH 8, independientemente de la enzima empleada. Esta misma tendencia se ha observado en otros estudios con proteína de WPC en los que las emulsiones a pH entre 4 y 6 se desestabilizaban y a pH por encima de 6, eran estables (Adjonu et al., 2014a; Lieske and Konrad, 1996; Mutilangi et al., 1996).

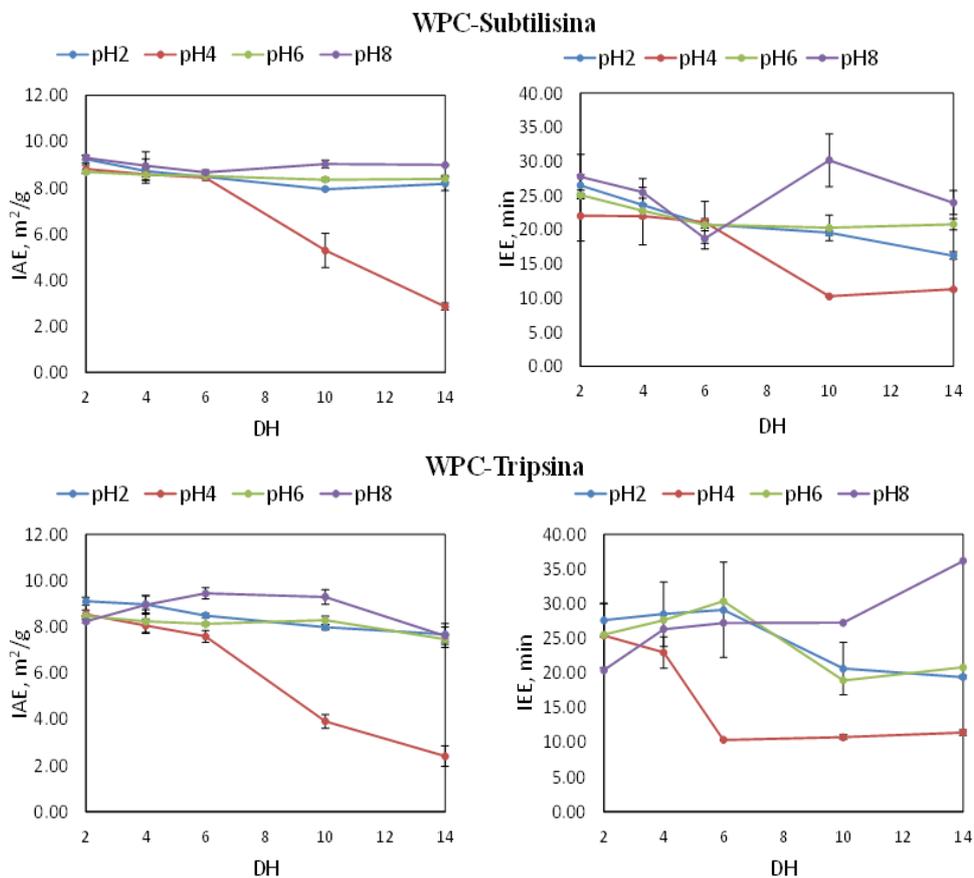


Figura 6.1 Índice de Actividad Emulsionante (IAE, m<sup>2</sup>/g) e Índice de Estabilidad Emulsionante (IEE, min) en función del pH (2, 4, 6 y 8) y grado de hidrólisis (2, 4, 6, 10 y 14%) para los hidrolizados de concentrado de proteína de suero (WPC) producidos con subtilisina y tripsina.

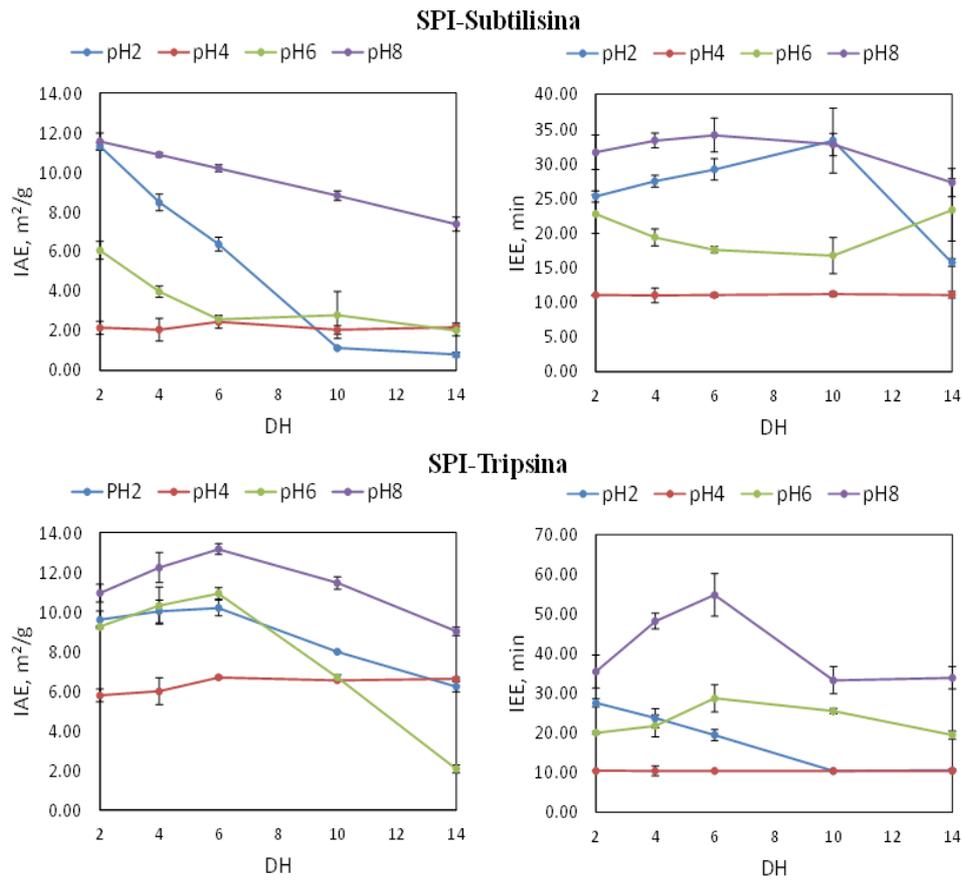


Figura 6.2 Índice de Actividad Emulsionante (IAE, m<sup>2</sup>/g) e Índice de Estabilidad Emulsionante (IEE, min) en función del pH (2, 4, 6 y 8) y grado de hidrólisis (2, 4, 6, 10 y 14%) para los hidrolizados de aislado de proteína de soja (SPI) producidos con subtilisina y tripsina.

En la Figura 6.2 se representan los índices de capacidad emulsificante (IAE, IEE) de los hidrolizados de SPI con subtilisina y con tripsina en función del DH y el pH de la emulsión. En general, las emulsiones estabilizadas con hidrolizados de SPI presentaron valores más elevados del IAE a DH 6%. Los índices de actividad y estabilidad empeoraron a niveles de DH superiores a este valor, independientemente de la enzima empleada. Esto puede deberse a que los péptidos más grandes, como se ha observado anteriormente con los hidrolizados de WPC, mejoran las propiedades emulsionantes de los hidrolizados debido a su mayor capacidad de desplegarse en la interfase aceite-agua (Schröder et al., 2017). Además, las propiedades emulsionantes de los hidrolizados se ven afectadas principalmente por el carácter anfifílico de los péptidos. Un buen emulsificante debe presentar un equilibrio óptimo entre los grupos polares y no polares para una adecuada solubilidad en agua y tensión superficial (McClements and Jafari,

2018) y esto tiene un efecto importante sobre la estabilidad física y oxidativa de las emulsiones. Es más probable que los péptidos grandes tengan residuos tanto hidrófobos como hidrófilos que interactúan con las gotas de aceite y la fase acuosa, respectivamente. Esta interacción aumenta la estabilidad de la emulsión debido a los efectos estéricos (Adjonu et al., 2014b; Lam and Nickerson, 2013). Por otro lado, como consecuencia de la hidrólisis enzimática, los péptidos de cadena corta tienen un núcleo hidrófobo parcialmente expuesto, lo que explica su mayor tasa de difusión en la interfase aceite-agua y su capacidad para cubrir un área más grande de interfase (Adjonu et al., 2014b; Aluko, 2015; Jeewanthi et al., 2015; Sinha et al., 2007). Por tanto, una proteólisis demasiado extensa produce un hidrolizado final con anfifilicidad reducida, lo que es perjudicial para la formación y estabilidad de la emulsión (Chen et al., 2011; Gbogouri et al., 2004; Lam and Nickerson, 2013). Esta tendencia concuerda también con los resultados del estudio de Jung et al. (2005), que encontraron la máxima estabilidad para las emulsiones preparadas con hidrolizados de soja a DH 4% y pH 7. De manera similar, (Lopes-da-Silva and Monteiro, 2019), estudiaron el efecto del DH sobre las propiedades emulsionantes del aislado de proteína de soja, concluyendo que la actividad emulsionante es superior a niveles bajos de DH.

En cuanto a la influencia del pH, en la Figura 6.2 se aprecia que los valores más bajos de IAE y IEE se observaron a pH 4, cerca del punto isoeléctrico de las proteínas de SPI, como ocurre con las emulsiones estabilizadas con los hidrolizados de proteína de WPC. La carga neta de los péptidos podría minimizarse a pH 4 lo que puede implicar una disminución de la hidrofobicidad y la solubilidad y, por tanto, su movilidad a través de la interfase sería menor (Adjonu et al., 2014a; Mutilangi et al., 1996). Para las emulsiones estabilizadas con hidrolizados de SPI, los valores de pH alejados del punto isoeléctrico mejoraron la estabilidad de la emulsión y muestran valores máximos de IAE y IEE en las emulsiones a pH 8 (Figura 6.2). Esto puede ser debido a un aumento de la solubilidad de los péptidos y a una mayor exposición de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos de los hidrolizados de SPI a pH más alto (Adjonu et al., 2014a).

Como se muestra en la Figura 6.2 las propiedades emulsionantes de los hidrolizados de proteína de soja producidos con tripsina fueron significativamente superiores

comparados con los de subtilisina. Los valores más elevados de IAE ( $13.17 \pm 0.27 \text{ m}^2/\text{g}$ ) y IEE ( $54.83 \pm 5.39 \text{ min}$ ) de la serie experimental se encontraron para la proteína de soja hidrolizada con tripsina a DH 6% (Figura 6.2). Esto se explica por la especificidad de la tripsina hacia los enlaces que implican grupos carboxílicos de lisina o arginina, liberando péptidos hidrofílicos que contribuyen a la estabilización de las gotas de aceite en la emulsión (Ashaolu, 2019; Zhao and Hou, 2009). En línea con estos resultados, Zhao y Hou (2009) lograron hidrolizados de proteínas de soja (DH 1-2%) producidos con tripsina con un mejor IAE que los hidrolizados por neutrasa. Del mismo modo, otros estudios revelaron una solubilidad superior y propiedades emulsificantes de los hidrolizados de proteína de soja producidos con tripsina (Adjonu et al., 2014b; Taherian et al., 2011).

La Figura 6.3 muestra los índices de capacidad emulsificante (IAE, IEE) de los hidrolizados de BP con subtilisina y tripsina en función del DH. En los hidrolizados de BP el pH de la emulsión influyó drásticamente en sus propiedades emulsificantes. Solamente a pH 2 los hidrolizados mostraron actividad y estabilizaron la emulsión. Esto contrasta con la afirmación de que a pH bajo, la carga en las cadenas laterales de aminoácidos débilmente ácidos y básicas se ven influenciadas y se pueden volver menos solubles (Gbogouri et al., 2004) disminuyendo así las propiedades emulsificantes. Sin embargo, en estudios con hidrolizados de proteína procedente de bacaladilla como el de Egerton et al. (2018), obtuvieron resultados excelentes en solubilidad a pH 2. El punto isoeléctrico de las proteínas de pescado suele variar entre pH 4.5 y 5.5. Así, Klompong et al. (2007) al considerar el efecto del pH sobre IAE e IEE en hidrolizados de proteína de jurel (*Selaroides leptolepis*), encontraron a pH 4 los valores más bajos coincidente también con una menor solubilidad a ese pH. IAE e IEE generalmente aumentaron a medida que el pH se alejó de pH 4-5 (Klompong et al., 2007). En relación a la influencia del grado de hidrólisis en las propiedades emulsificantes de la bacaladilla, solamente a DH bajos (DH 2-6%) se consiguió estabilizar la emulsión. Esto se debe a que las propiedades emulsionantes empeoran con el aumento de DH, ya que, se produce la liberación de péptidos pequeños que exhiben menos actividad superficial e hidrofobicidad (Gbogouri et al., 2004; Kristinsson and Rasco, 2000).

### Proteína de Bacaladilla (BP)

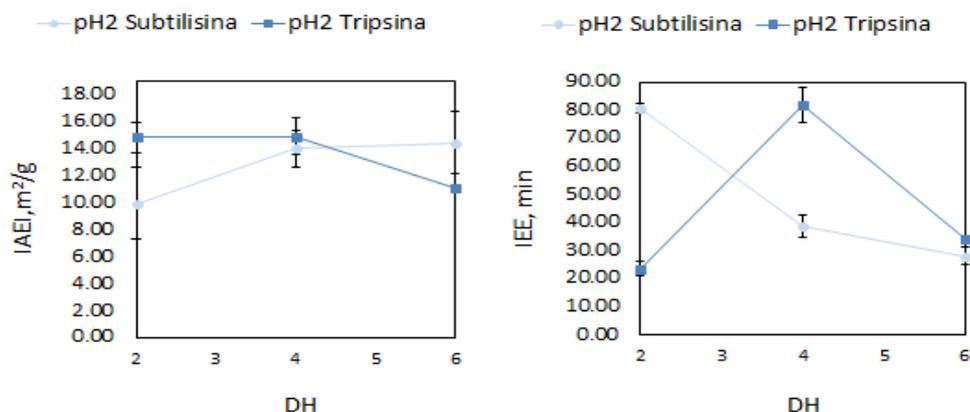


Figura 6.3 Índice de Actividad Emulsionante (IAE, m<sup>2</sup>/g) e Índice de Estabilidad Emulsionante (IEE, min) a pH 2 en función del grado de hidrólisis (2, 4 y 6%) para los hidrolizados de proteína de Bacaladilla producidos con subtilisina y tripsina.

Como se observa en la Figura 6.3, el IAE presenta los mejores valores para los hidrolizados con DH 4% independientemente de la enzima utilizada ( $14.02 \pm 1.34$  y  $14.94 \pm 1.36$  m<sup>2</sup>/g). Sin embargo, el IEE para los hidrolizados con subtilisina disminuye conforme aumenta el DH de 2% a 6%. Para los hidrolizados de proteína de bacaladilla con tripsina el IEE presenta el valor más elevado a DH 4% ( $81.97 \pm 6.16$  min). Estos resultados están en consonancia con estudios previos que evalúan las propiedades emulsificantes de hidrolizados de proteína de pescado con subtilisina donde los índices IAE e IEE disminuyeron ( $p < 0.05$ ) a medida que aumentaba el DH, y a DH 5%, los hidrolizados exhibieron fuertes propiedades emulsionantes (Klompong et al., 2007). Además, García-Moreno et al. (2017) obtuvieron hidrolizados de proteína de bacaladilla hidrolizada a DH 4%, donde los valores de capacidad emulsificante fueron notablemente superiores al resto de los hidrolizados de DH 8% y 12%. En ese estudio los valores más elevados de capacidad emulsificante se alcanzaron a DH 4% para los hidrolizados de tripsina y con respecto a la estabilidad de la emulsión, los hidrolizados de subtilisina a DH 4% presentaron el valor más alto, 92.7 minutos, y un promedio de 58 minutos para los hidrolizados de tripsina (García-Moreno et al., 2017).

### 6.1.3.2. Optimización de las propiedades emulsificantes

Para los sustratos que presentaron propiedades emulsificantes en un rango amplio de pH y DH, hidrolizados de WPC y SPI, se llevó a cabo la modelización matemática de las propiedades emulsionantes, IAE e IEE, mediante el procedimiento descrito en el Apartado 6.1.2.2.2., tomando como variables de entrada, el sustrato empleado, el DH final de los hidrolizados, así como el pH de formación de la emulsión, y como variables de respuesta, IAE e IEE. De esta forma se pueden predecir las características y condiciones óptimas para conseguir el hidrolizado con mejores propiedades emulsificantes.

Se obtuvieron modelos independientes con cada enzima para los índices de actividad y estabilidad de la emulsión (IAE, IEE) en función del tipo de sustrato, del DH y pH de formación de la emulsión. Como se ha mencionado en el Apartado 6.1.2.2.2 los modelos cúbicos (Ecuación (9)) se redujeron hasta obtener los modelos expresados por las Ecuaciones (12) y (13) para la enzima subtilisina y (14) y (15) para la enzima tripsina donde se eliminaron los términos con un valor  $p$  asociado superior al 5%:

$$\text{IAE (Subtilisina)} = 11.13 + 3.58 \cdot S - 0.37 \cdot S \cdot \text{DH} - 2.65 \cdot S \cdot \text{pH} + 0.04 \cdot S \cdot \text{DH} \cdot \text{pH} + 0.27 \cdot S \cdot \text{pH}^2 \quad (12)$$

$$\text{IEE (Subtilisina)} = 41.76 + 17.18 \cdot S - 1.06 \cdot \text{DH} - 14.52 \cdot \text{pH} - 9.82 \cdot S \cdot \text{pH} + 0.12 \cdot \text{DH} \cdot \text{pH} + 3.81 \cdot \text{pH}^2 + 1.07 \cdot S \cdot \text{pH}^2 - 0.29 \cdot \text{pH}^3 \quad (13)$$

$$\text{IAE (Tripsina)} = 19.15 - 7.38 \cdot \text{pH} + 1.36 \cdot \text{pH}^2 + 0.03 \cdot S \cdot \text{pH}^2 - 0.01 \cdot \text{DH}^2 \cdot \text{pH} - 0.081 \cdot \text{pH}^3 + 0.01 \cdot \text{pH}^2 \cdot \text{DH} \quad (14)$$

$$\text{IEE (Tripsina)} = 80.61 - 32.03 \cdot \text{pH} - 5.05 \cdot S \cdot \text{pH} + 0.96 \cdot \text{DH} \cdot \text{pH} - 0.53 \cdot \text{DH}^2 + 5.90 \cdot \text{pH}^2 + 0.84 \cdot S \cdot \text{pH}^2 + 0.03 \cdot \text{DH}^3 - 0.05 \cdot \text{DH}^2 \cdot \text{pH} - 0.40 \cdot \text{pH}^3 \quad (15)$$

La bondad de ajuste del modelo reducido tuvo unos coeficientes de correlación de  $R^2=81.55\%$  y  $83.54\%$  para IAE e IEE respectivamente con subtilisina y de  $R^2=72.30\%$  para IAE y  $83.55\%$  para IEE con tripsina. Por tanto, los modelos matemáticos ajustaron bien los datos experimentales, y de esta manera, los modelos permiten predecir adecuadamente la influencia de los factores experimentales sobre las variables de respuesta. Los modelos de regresión expresados por las Ecuaciones (12), (13), (14) y (15) permitieron la generación de gráficos de superficie para IAE e IEE (Figuras 6.4, 6.5, 6.6, 6.7 y 6.8). Estos gráficos representan la influencia de las variables de entrada, sustrato, DH, pH sobre las variables de respuesta IAE e IEE según los modelos matemáticos desarrollados. Mediante estos gráficos se visualiza fácilmente la tendencia de los conjuntos de datos y los valores óptimos. La modelización realizada predice que los hidrolizados de SPI (SPH) exhiben mejores propiedades emulsionantes que los hidrolizados de concentrado de WPC (WPH). Con subtilisina el máximo IAE se alcanza para WPH hidrolizado a DH 2 y pH 8 (Figura 6.4, Tabla 6.1), mientras que el máximo IEE, para SPH también hidrolizado a DH 2 y pH 8 (Figura 6.5, Tabla 6.1). Para tripsina los valores máximos de ambas variables de salida (IAE e IEE) se obtienen para SPH hidrolizado a DH 6.5 y pH 8 (Tabla 6.1, Figura 6.6 y Figura 6.7). Las propiedades emulsionantes de los hidrolizados de tripsina son ligeramente superiores a las obtenidas con subtilisina. Ambas enzimas tienen diferente especificidad. La subtilisina es una proteasa de amplio espectro, comúnmente utilizada para mejorar la solubilidad de la proteína (García-Moreno et al., 2017; Joye and McClements, 2014). En contraste, la tripsina escinde preferiblemente el lado carboxílico de la arginina y lisina, liberando péptidos cargados positivamente, y por lo tanto hidrófilos, al medio (Adamson and Reynolds, 1996; Mutilangi et al., 1996). Estos péptidos estabilizan las gotas de aceite mediante efectos estéricos (Lopes da Rosa et al., 2018). Respecto al grado de hidrólisis, con subtilisina los mejores índices se obtienen a DH 2 para ambos sustratos (Figuras 6.4, 6.5, 6.8 (a) y (b)). Para tripsina se obtienen a grados de hidrólisis de 6.4-6.5 en ambos sustratos (Figuras 6.6, 6.7, 6.8 (c) y (d)). La mejora de las propiedades emulsionantes a DH bajo se ha descrito ampliamente en numerosas publicaciones (Adjonu et al., 2014b; Lam and Nickerson, 2013; Sinha et al., 2007). En relación al pH, se puede concluir que un pH de 8 conduce a índices de actividad y estabilidad significativamente mejores independientemente de la enzima y el sustrato. En general,

valores de pH alejados del punto isoeléctrico de las proteínas generan mejores IAE e IEE debido a una mejor solubilidad de la proteína, de este modo se explica la tendencia en los modelos a un ligero repunte de los valores de actividad y estabilidad a pH 2 como puede observarse en los gráficos de superficie.

Tabla 6.1 Valores máximos de IAE e IEE obtenidos para cada enzima con los modelos. \*S: Sustrato; DH: Grado de hidrólisis; IAE: Índice de Actividad Emulsionante; IEE: Índice de Estabilidad Emulsificante; WPC: Concentrado de proteína de lactosuero; SPI: Aislado de proteína de soja.

Enzima	IAE Máximo, m <sup>2</sup> /g	S	DH, %	pH
Subtilisina	10.61	WPC	2	8
Tripsina	12.96	SPI	6.5	8
Enzima	IEE Máximo, min	S	DH, %	pH
Subtilisina	32.40	SPI	2	8
Tripsina	44.39	SPI	6.5	8

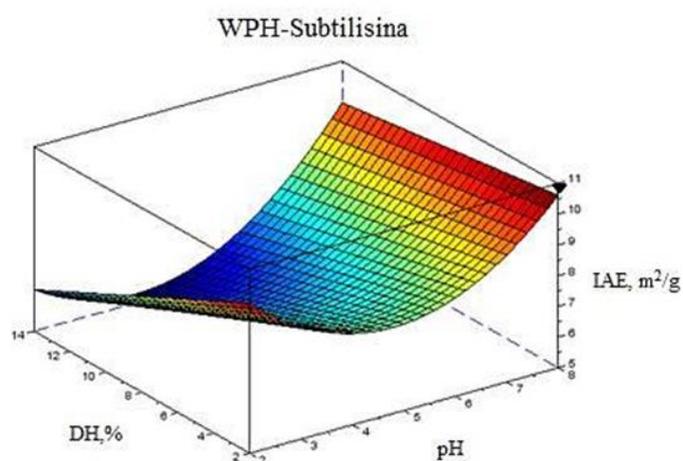


Figura 6.4 Gráfico de superficie de IAE para los hidrolizados de proteína de lactosuero (WPH) con subtilisina. El máximo de IAE para subtilisina se señala con un marcador ▼.

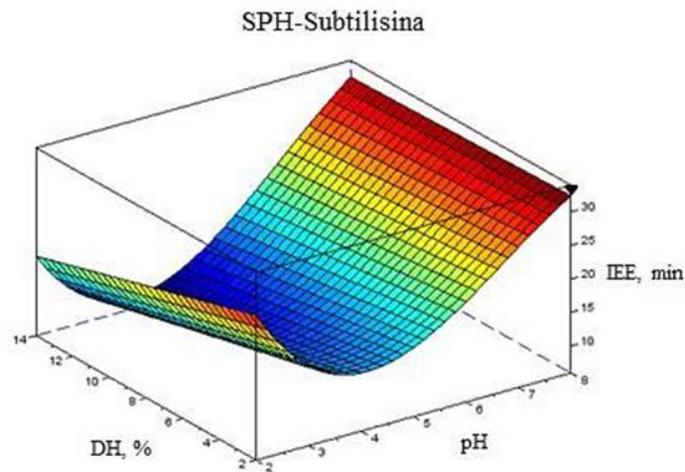


Figura 6.5 Gráfico de superficie de IEE para los hidrolizados de proteína de soja (SPH) con subtilisina. El máximo de IEE para subtilisina se señala con un marcador ▼.

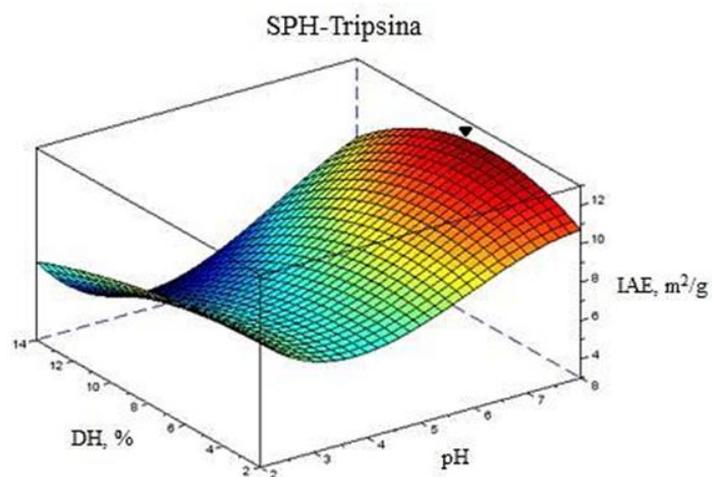


Figura 6.6 Gráfico de superficie de IAE para los hidrolizados de proteína de soja (SPH) con tripsina. El máximo de IAE para tripsina se señala con un marcador ▼.

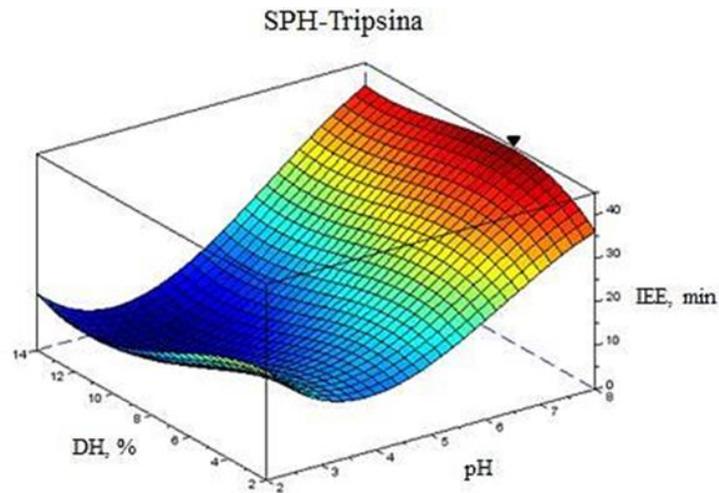


Figura 6.7 Gráfico de superficie de IEE para los hidrolizados de proteína de soja (SPH) con tripsina. El máximo de IEE para tripsina se señala con un marcador ▼.

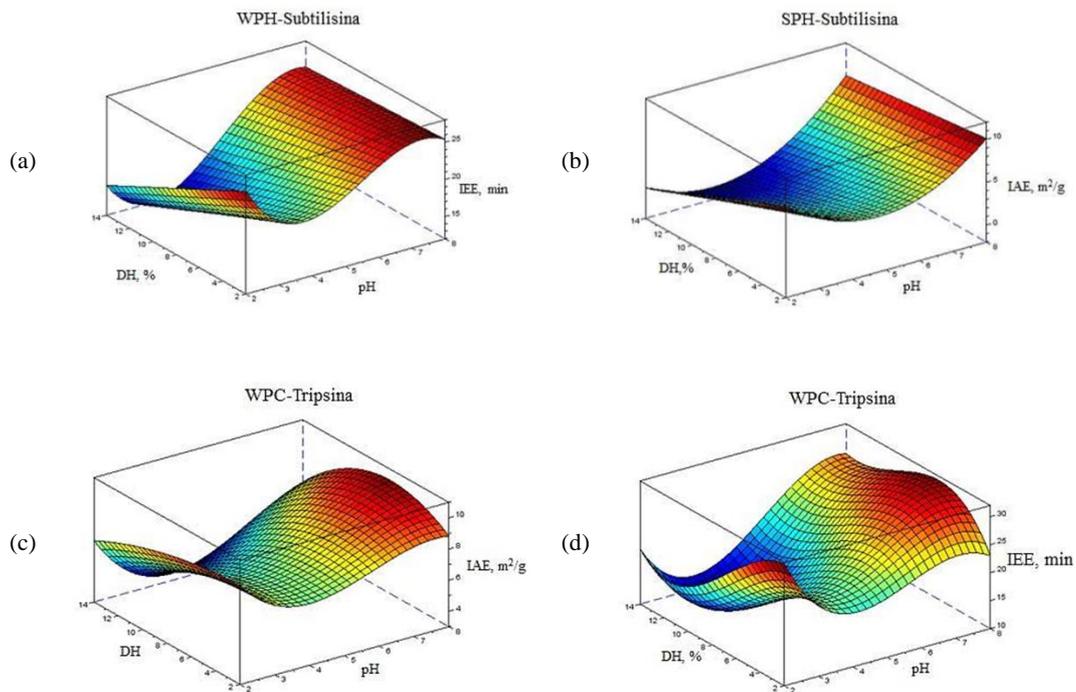


Figura 6.8 Gráficos de superficie para (a) IEE para los hidrolizados de WPH con subtilisina, (b) IAE para los hidrolizados de SPH con subtilisina, (c) IAE para los hidrolizados de WPH con tripsina, (d) IEE para los hidrolizados de WPH con tripsina.

Dado que los objetivos individuales de maximizar IAE e IEE no pueden conseguirse simultáneamente, se combinaron en la función objetivo (10). Los valores experimentales (DH y pH) que maximizan la función bi-objetivo establecida por la

Ecuación (10) para cada enzima (subtilisina y tripsina) por separado están reflejados en la Tabla 6.2 junto con el máximo absoluto predicho por los modelos. En los óptimos obtenidos las propiedades emulsificantes tienen niveles máximos a pH 8 (Tabla 6.2, Figuras 6.5, 6.6, 6.7). En condiciones neutras y alcalinas, el aumento de DH afectó negativamente la actividad emulsificante, mientras que mejoró significativamente la estabilidad de la emulsión (Figuras 6.6 y 6.7). Para ambas propiedades, se detectó un mínimo dentro del rango de pH 4-5, independientemente del grado de hidrólisis, correspondiente al pH isoelectrico de la proteína de soja (Taheri et al., 2014; Zhao and Hou, 2009).

Tabla 6.2 Parámetros óptimos (S, pH, DH) que maximizan la función objetivo. \*S: Sustrato; DH: Grado de hidrólisis; IAE: Índice de Actividad Emulsionante; IEE: Índice de Estabilidad Emulsificante; FO: Valor de la función objetivo. SPI Aislado de Proteína de Soja. En negrita y color parámetros del óptimo absoluto.

Objetivo	S	pH	DH, %	IAE, m <sup>2</sup> /g	IEE, min	FO
Óptimo Subtilisina	SPI	8	2	10.61	25.38	1.55
Óptimo Tripsina	<b>SPI</b>	<b>8</b>	<b>6.5</b>	<b>12.16</b>	<b>44.39</b>	<b>1.99</b>

Por tanto, según el procedimiento de optimización, la emulsión a pH 8 preparada a partir de hidrolizado de soja con tripsina y a DH 6.5% presentó una combinación óptima de condiciones de proceso para obtener los mejores índices IAE e IEE (Tabla 6.2). Los índices de emulsión previstos para esta emulsión fueron de 12.16 m<sup>2</sup>/g y 44.40 min. Estas condiciones óptimas fueron validadas experimentalmente por un estudio de estabilidad física y oxidativa como se detalla en el siguiente apartado.

### 6.1.3.3. Estudio de estabilidad física y oxidativa de la emulsión estabilizada con el hidrolizado con capacidad emulsificante óptima

En este apartado se evaluó la capacidad para estabilizar emulsiones de aceite en agua del hidrolizado seleccionado anteriormente. El procedimiento de optimización descrito en el Apartado 6.1.3.2., predice que una emulsión a pH 8, estabilizada con hidrolizado de SPI a DH 6.5% con tripsina es la que mayor estabilidad física posee. Se preparó la emulsión, codificada como SHT6.5, y se sometió a un estudio acelerado de estabilidad física y oxidativa durante 10 días a 20°C, según los procedimientos descritos en el Apartado 6.1.2.2.4. Para comparar el efecto del hidrolizado, también se sometió al

mismo estudio una emulsión de control, preparada con aislado de proteína de soja sin hidrolizar, codificada como SPI.

#### 6.1.3.3.1. Estabilidad física de la emulsión

Se determinó el potencial zeta para obtener información sobre la carga superficial en la interfase aceite-agua de las emulsiones y, de esta manera, obtener una medida de su estabilidad inicial. Tanto la emulsión SHT6.5 como la de control presentaron valores iniciales (absolutos) altos de potencial zeta,  $-52.57 \pm 3.26$  mV y  $-48.71 \pm 2.40$  mV, respectivamente. El potencial negativo se debe al pH de las emulsiones, por encima del punto isoeléctrico de la proteína. En general, con valores de potencial zeta superiores a 30 mV o inferiores a -30 mV, la agregación de partículas se evita debido a repulsiones electrostáticas (Astete et al., 2009). Un valor absoluto más alto del potencial zeta implica una mayor estabilidad de la emulsión (Hou et al., 2019), ya que, refleja mejor repulsión entre las gotas de aceite, y su agregación también se minimiza (Wu et al., 2018). Los resultados están en línea con otros estudios en emulsiones con proteína de soja y sus hidrolizados (Wang et al., 2020; Zhu et al., 2020).

La Figura 6.9 muestra la evolución del tamaño de gota, representada por el diámetro de Sauter ( $D_{3,2}$ ) a lo largo del periodo de almacenamiento. Este diámetro  $D_{3,2}$  representa el diámetro de una esfera que tiene la misma relación volumen/área superficial que una gota de la emulsión. Este diámetro tiene relevancia especialmente en estudios donde el área superficial disponible es importante, como es este caso. Ya que, la relación volumen/área afectará a la adsorción e interacciones del emulsificante y posibles oxidantes. La distribución del tamaño de partícula de la emulsión SHT6.5 fue monomodal y el diámetro  $D_{3,2}$  de la emulsión SHT6.5 aumentó continuamente con el tiempo a una velocidad de  $0.02 \mu\text{m}$  por día hasta el día 6. A partir de este día, el tamaño de las gotas experimentó un ligero aumento de  $0.07 \mu\text{m}$  hasta  $0.221 \pm 0.01 \mu\text{m}$  (Figura 6.9). La emulsión de control (SPI) presentó un comportamiento similar, con una distribución monomodal de tamaños durante el período de almacenamiento, aunque a partir del día 6 muestra una ligera tendencia hacia una distribución bimodal más evidente a día 10, donde se detectó un segundo pico centrado en  $D_{3,2}$  igual a  $7.4 \mu\text{m}$  (Figura 6.10). Esto se debe a la unión de las gotas de aceite en unidades más grandes

que produce la desestabilización física de la emulsión, que podría estar acompañada por un aumento de la oxidación lipídica. Como se muestra en la Figura 6.9, los diámetros de Sauter para la emulsión SHT6.5 fueron significativamente más bajos que los de la emulsión de control durante todo el período de almacenamiento. Estos tamaños de gota más pequeños en la emulsión SHT6.5 hacen que sea físicamente más estable, ya que, el tamaño de gota más pequeño conforma un área interfacial mayor que facilita una absorción del emulsificante también mayor que la conformada en la emulsión SPI. Un tamaño de gota más pequeño supone mejorar la estabilidad frente a la agregación de las gotas en la emulsión. Esto se debe al hecho de que las fuerzas de atracción que normalmente promueven la floculación o coalescencia se debilitan al disminuir el tamaño de gota.

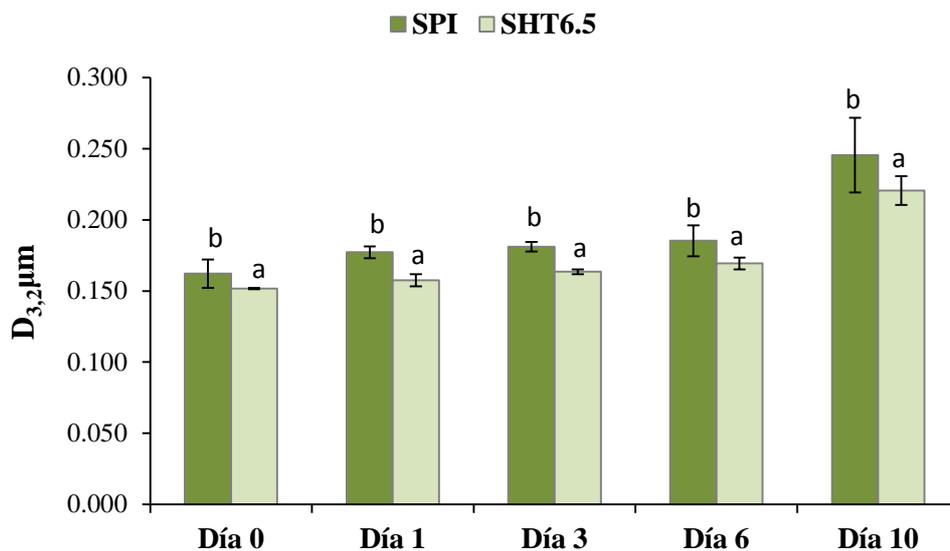


Figura 6.9 Tamaño de partícula ( $D_{3,2}$ ) de las emulsiones estabilizadas con aislado de proteína de soja (SPI) e hidrolizado de proteína de soja (SHT6.5) durante el periodo de almacenamiento a 20°C. \*Letras diferentes representan diferencias significativas entre SPI y SHT6.5 ( $p < 0.05$ ).

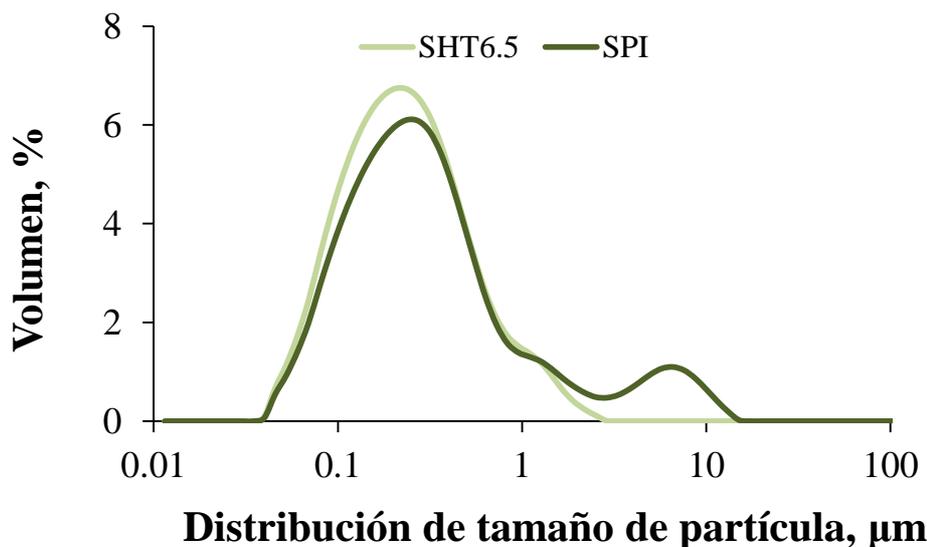


Figura 6.10 Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones de aceite de pescado en agua estabilizadas con aislado de proteína de soja intacta (SPI) e hidrolizado de proteína de soja (SHT6.5) a día 10 de almacenamiento.

Esta tendencia a un menor tamaño de partícula en la emulsión SHT6.5 con respecto a la emulsión de control, puede apreciarse de forma más clara en la Figura 6.11, que muestra la evolución del diámetro de Brouckere o diámetro medio en volumen ( $D_{4,3}$ ) de ambas emulsiones durante el periodo de almacenamiento. Este diámetro refleja el tamaño de las partículas que constituyen la mayor parte del volumen de la muestra. Es más sensible a la presencia de partículas grandes en la distribución de tamaño. Para la emulsión SHT6.5 el  $D_{4,3}$  se incrementó de  $0.296 \pm 0.004 \mu\text{m}$  a día 1 hasta  $0.324 \pm 0.021 \mu\text{m}$  en el día 10. Mientras que en la emulsión de control con soja sin hidrolizar SPI, el  $D_{4,3}$  tuvo un valor a día 1 de  $0.346 \pm 0.017 \mu\text{m}$ , significativamente por encima del obtenido para la emulsión SHT6.5 al final del periodo de almacenamiento a día 10. La emulsión de control SPI a día 10 alcanzó un valor de  $D_{4,3}$  de  $0.520 \pm 0.060 \mu\text{m}$ .

Por otro lado, la Figura 6.12 muestra los  $D_{90}$  que representan el tamaño de partícula correspondiente al percentil 90. Esto es el valor de diámetro que divide la población de gotas de manera que el tamaño del 90% de las gotas es menor que ese valor. Este valor para la emulsión SHT6.5 se sitúa por debajo de los  $0.700 \mu\text{m}$  hasta el día 10 donde se incrementa a  $0.858 \pm 0.063 \mu\text{m}$ , mientras que, en la emulsión SPI los valores de  $D_{90}$  son más elevados, por encima de  $0.75 \mu\text{m}$ , hasta alcanzar a día 10 un valor de  $1.145 \pm 0.186 \mu\text{m}$ . Ambos valores se sitúan en un rango de tamaño de gota en línea con los tamaños de

emulsiones alimentarias que se producen en homogeneizadores de alta presión, 0.1-2  $\mu\text{m}$ . Evidentemente, la tendencia durante el periodo de almacenamiento de 10 días es similar a la apreciada en los diámetros  $D_{3,2}$  y  $D_{4,3}$ .

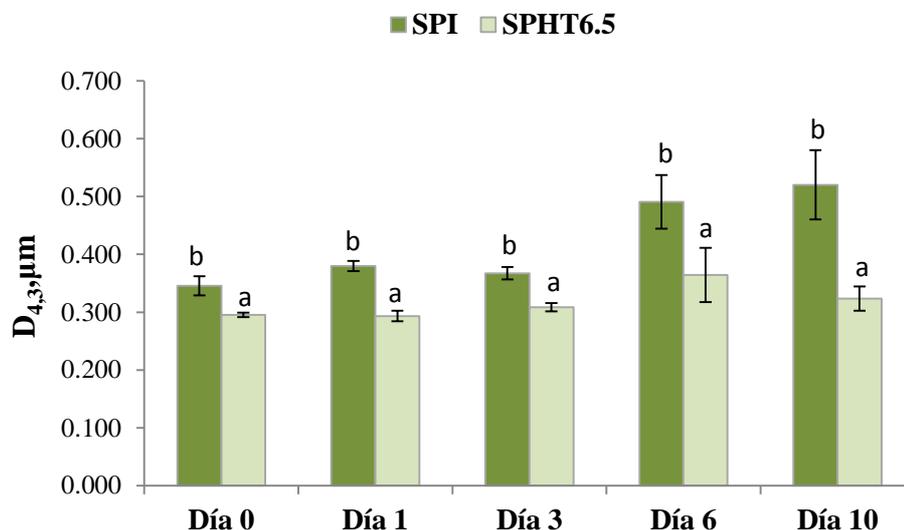


Figura 6.11 Tamaño de partícula ( $D_{4,3}$ ) de las emulsiones estabilizadas con aislado de proteína de soja (SPI) e hidrolizado de proteína de soja (SHT6.5) durante el periodo de almacenamiento a 20°C. \*Letras diferentes representan diferencias significativas entre SPI y SHT6.5 ( $p < 0.05$ ).

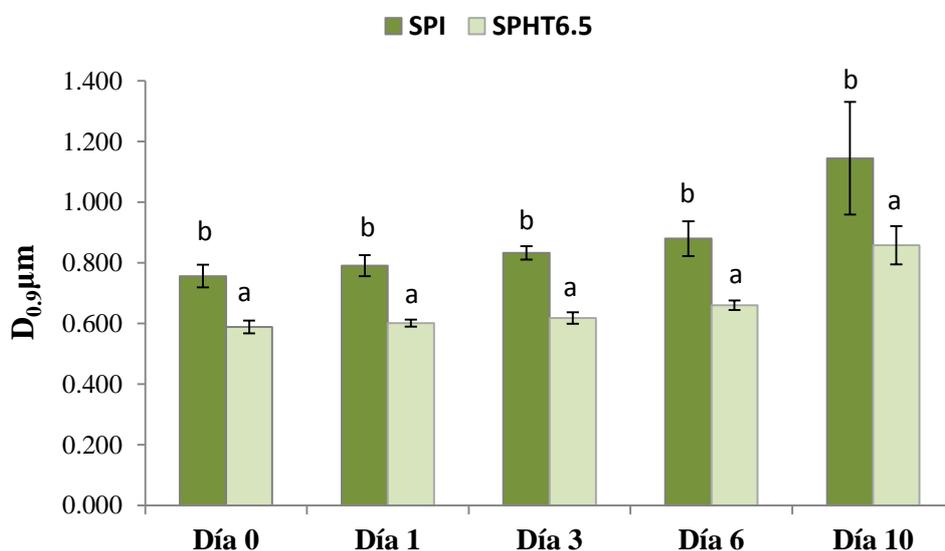


Figura 6.12 Tamaño de partícula ( $D_{90}$ ) de las emulsiones estabilizadas con aislado de proteína de soja (SPI) e hidrolizado de proteína de soja (SHT6.5) durante el periodo de almacenamiento a 20°C. \*Letras diferentes representan diferencias significativas entre SPI y SHT6.5 ( $p < 0.05$ ).

Por tanto, se aprecia que la hidrólisis del aislado de proteína de soja mejoró sus propiedades emulsionantes con respecto a la proteína nativa. Los péptidos en la emulsión SHT6.5, disminuyen la tensión interfacial y facilitan la formación de una interfase estable entre el aceite y el agua al adsorberse en la superficie de las gotas de aceite formadas durante la homogeneización, y crean una membrana protectora que inhibe la coalescencia de las gotas de aceite (Freitas de Oliveira et al., 2015).

Se obtuvieron resultados similares a los de este estudio para una emulsión de aceite en agua estabilizada con proteína de arroz hidrolizada con tripsina a DH 6.36% (Pan et al., 2019). En ese estudio, se obtuvieron hidrolizados de proteína de arroz mediante hidrólisis enzimática con diferentes proteasas (neutrasa, tripsina y subtilisina) y se evaluó la estabilidad de las emulsiones producidas con los diferentes hidrolizados. Los hidrolizados de tripsina formaron una emulsión más estable, se adsorbían fácilmente en la interfase en comparación con los hidrolizados de subtilisina y neutrasa. En el tamaño de partícula obtuvieron un aumento de  $0.04 \mu\text{m}$  en el tamaño de gota durante el almacenamiento de 7 días. En el día 1 de almacenamiento, el  $D_{3,2}$  fue de  $0.27 \pm 0.01 \mu\text{m}$  y  $0.31 \pm 0.02 \mu\text{m}$  en el día 7 (Pan et al., 2019). En otro estudio, con hidrolizados de proteína de soja, reportan una buena estabilidad física de las emulsiones (Chen et al., 2019). En ese estudio, los tamaños de gota son más elevados que en esta investigación debido a que utilizaron el doble de concentración de aceite en emulsión. La proteína de soja fue hidrolizada con pepsina y obtuvieron  $D_{4,3}$  iniciales de  $1.37 \pm 0.18 \mu\text{m}$ . Estos fueron los más estables físicamente tras 24 horas en comparación con las emulsiones estabilizadas con proteína sin hidrolizar y con hidrolizados con papaína (Chen et al., 2019). En general, para lograr una buena estabilidad física, es importante que las emulsiones enriquecidas con ácidos grasos Omega-3 tengan un tamaño de gota medio por debajo de  $0.5 \mu\text{m}$  (Walker et al., 2015). Estudios previos con proteína vegetal no hidrolizada para estabilizar emulsiones de Omega-3 y Omega-6, con proporciones de proteína y aceite similares a las de este estudio, reportan diámetros  $D_{3,2}$ , desde  $0.3 \mu\text{m}$  (Gumus et al., 2017; Hu et al., 2003b; Qiu et al., 2015) hasta más de  $1 \mu\text{m}$  (Wang et al., 2020; Zhu et al., 2020).

#### 6.1.3.3.2. Estabilidad oxidativa de la emulsión

Para evaluar la estabilidad oxidativa de la emulsión estabilizada con el hidrolizado de proteína de soja, SHT6.5, se determinó el índice de peróxidos del aceite extraído de la misma y se comparó con el de la emulsión de control con SPI intacta, durante el periodo de almacenamiento de 10 días. La Figura 6.13 a), muestra la evolución del valor de peróxidos (PV) de ambas emulsiones en función del tiempo. Para la emulsión SHT6.5, el valor de peróxidos inicial (PVi) es similar al obtenido para el aceite de pescado refinado (<1 mmol de O<sub>2</sub>/kg de aceite). Está ampliamente aceptado que el proceso de emulsificación aumenta la susceptibilidad de las gotas de aceite a la oxidación de lípidos (McClements, 2005), ya que, aumenta el contacto entre los ácidos grasos poliinsaturados con el oxígeno y otros agentes prooxidativos. En este sentido, la interfase actúa como una efectiva barrera contra la oxidación (Genot et al., 2013). En nuestro caso, este efecto se mejora por las propiedades emulsionantes y antioxidantes del hidrolizado de proteína de soja (Gibbs et al., 2004; Di Giorgio et al., 2019; McClements and Decker, 2000; Moure et al., 2006; Peña-Ramos and Xiong, 2002; Zhang et al., 2018; Zhao and Xiong, 2015).

Como se muestra en la Figura 6.13 a), el PV para la emulsión SHT6.5 mostró un aumento constante desde el primer día de almacenamiento, hasta alcanzar un valor de 56.65 mmol/kg de aceite a día 10. Tendencias similares en la evolución de la concentración de compuestos de oxidación primaria se han encontrado en emulsiones de aceite de pescado en agua estabilizadas con hidrolizado de soja ( $\beta$ -conglucina) (Phoon et al., 2014) y con lecitina, ampliamente utilizado como emulsionante natural (Ogawa et al., 2003). En emulsiones estabilizadas de aceite de maíz en agua con lecitina, la concentración de peróxidos aumentó durante un periodo de almacenamiento más largo (Ogawa et al., 2003). Los autores indican que es posible que los iones Fe<sup>2+</sup> o Fe<sup>3+</sup> endógenos se unan a la capa de lecitina en la emulsión, y a través de la atracción electrostática entre las gotas recubiertas de lecitina cargadas negativamente y los iones de hierro cargados positivamente, se podría promover la oxidación lipídica de las emulsiones (Ogawa et al., 2003). Las diferencias en los valores de PV entre este trabajo y los estudios mencionados se deben al proceso de incubación realizado en el análisis

para determinar PV. Por otro lado, los niveles de PV de la emulsión de control (SPI) aumentaron más rápidamente que los de SHT6.5 hasta el tercer día de almacenamiento. La hidrólisis liberó parcialmente grupos hidrófobos de la proteína de soja que quedan más accesibles para ejercer su efecto antioxidante y mejorar la estabilidad oxidativa de la emulsión comparado con el efecto de la proteína sin hidrolizar (Zhang et al., 2018). En un estudio de caracterización de emulsiones estabilizadas con aislado de proteína de soja sin hidrolizar durante un periodo de 10 días de almacenamiento, los valores de peróxidos aumentaron drásticamente a partir del segundo día de almacenamiento llegando a alcanzar hasta un valor de aproximadamente 130 mmol/kg de aceite a día 10 (Cui et al., 2014). Otros estudios sobre la capacidad para inhibir la oxidación lipídica de la proteína de soja e hidrolizado de proteína de soja a DH 5%, sometidos a estrés oxidativo en emulsiones y durante un periodo de 14 días de almacenamiento, encontraron que ambos podían retardar la formación de TBARS (medida de oxidación lipídica mediante el método de determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) en las emulsiones (Zhao and Xiong, 2015). Para las emulsiones estabilizadas con el hidrolizado de proteína de soja esa tendencia era mejor que con la proteína sin hidrolizar (Zhao and Xiong, 2015). Esto, si se compara con los resultados obtenidos en el presente estudio con SHT6.5, pone de manifiesto el efecto de la hidrólisis sobre la mejora de la capacidad antioxidante de la proteína de soja.

A partir del tercer día de almacenamiento, los valores de PV fueron ligeramente inferiores a los observados para SHT6.5, pero no existen diferencias significativas entre las emulsiones al final del periodo de almacenamiento. Aunque esta tendencia podría reflejar una mayor estabilidad del SPI contra la oxidación de lípidos, no es así de acuerdo con la evolución mostrada por el índice de anisidina (Figura 6.13 b)). El SPI presentó niveles más altos de anisidina (AV) durante todo el período de almacenamiento y experimentaron un fuerte aumento a partir del sexto día. El comportamiento conflictivo entre los valores de peróxidos y anisidina mostrados por la muestra SPI puede explicarse por el progreso de las reacciones de oxidación. La oxidación de los lípidos produce compuestos de oxidación primarios, peróxidos, que posteriormente se descomponen en productos de oxidación secundarios. Estos últimos no pueden ser cuantificados mediante el análisis de PV, pero se reflejan en el valor de anisidina (AV).

García-Moreno et al., 2016a, en su estudio de estabilidad oxidativa de emulsiones de aceite de pescado en agua estabilizadas con hidrolizados de proteína de pescado también observaron esta tendencia, concluyendo que la tasa de descomposición de peróxidos en productos de oxidación secundarios era mayor que la tasa de formación.

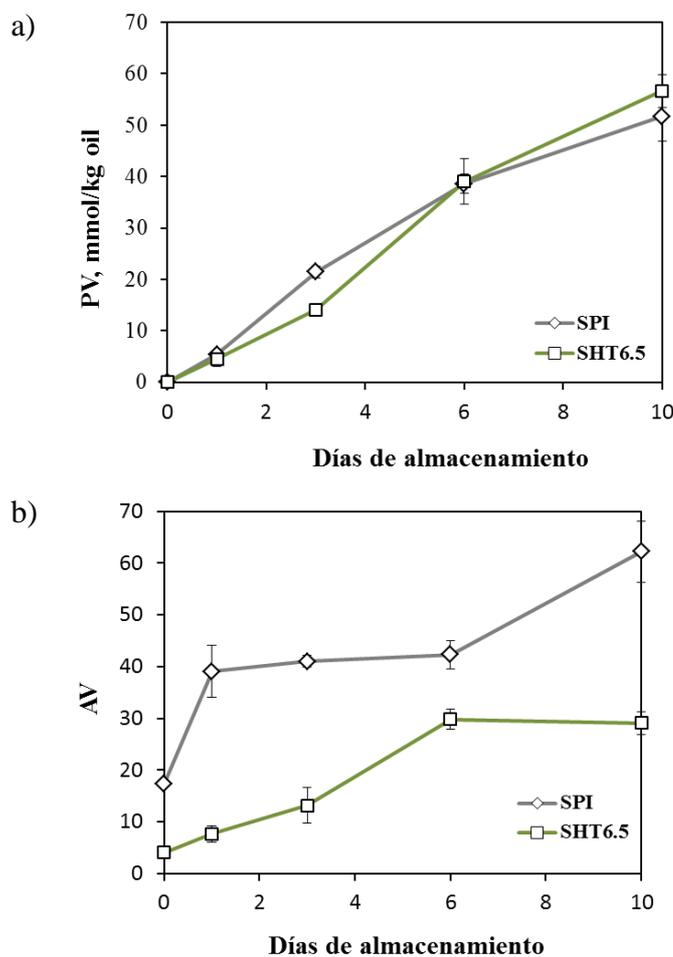


Figura 6.13 a) Evolución del valor de peróxidos (PV) y b) valor de anisidina (AV) para la emulsión estabilizada con hidrolizado de proteína de soja (SHT6.5) y la emulsión de control con aislado de proteína de soja sin hidrolizar (SPI).

El valor de anisidina (AV), por tanto, mide los compuestos de oxidación secundarios y es más sensible a aldehídos, principalmente 2-alquenes y 2, 4-alcadienes, presentes en el aceite emulsionado (Jacobsen, 2010). La emulsión de control (SPI) mostró un AV significativamente mayor que la emulsión SHT6.5 (Figura 6.13 b)). Eso podría ser debido al hecho de que la hidrólisis libera parcialmente grupos hidrófobos de la proteína, y el hidrolizado, podría mostrar una capacidad más eficiente de eliminación de radicales libres y actividad quelante de hierro en comparación con la proteína intacta

(Zhang et al., 2014, 2015, 2018). Los péptidos derivados de la hidrólisis, debido a su estructura, son menos propensos al plegamiento conformacional que las proteínas y esto asegura que la mayoría de sus grupos reactivos estén siempre disponibles para reacciones antioxidantes (Aluko, 2015).

La mejor estabilidad oxidativa mostrada por el hidrolizado de proteína de soja (SHT6.5) con respecto a la proteína sin hidrolizar, se confirma por la evolución del valor de TOTOX, que cuantifica la generación global de productos de oxidación. El valor de oxidación total (TOTOX) es un índice de oxidación integral calculado a partir de la suma ponderada del valor de peróxidos (PV) y el valor de p-anisidina (AV), como se describe en el Apartado 6.1.2.2.4.2.2.

Según la Figura 6.14, que representa el valor TOTOX en función del tiempo, la emulsión SHT6.5 exhibió una mayor estabilidad a la oxidación lipídica durante todo el período de almacenamiento. El fuerte aumento entre los días 3 y 6 también se refleja en este índice, aunque los valores generales de TOTOX del hidrolizado fueron inferiores a los observados para el aislado de proteína (SPI).

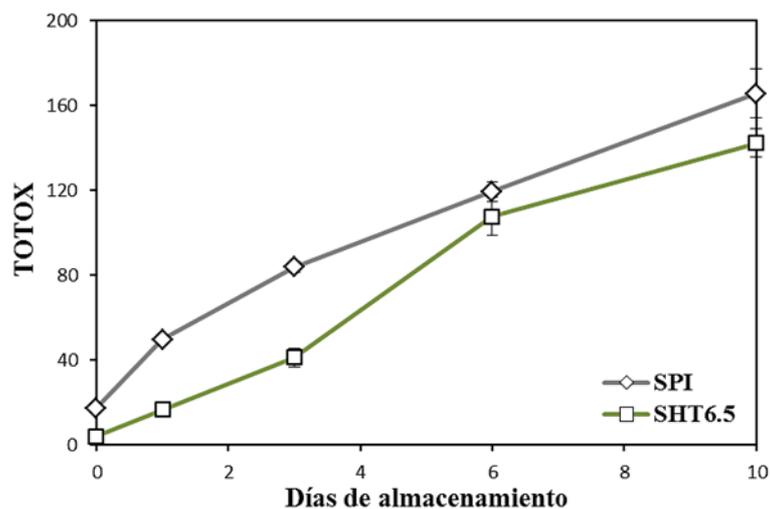


Figura 6.14 Evolución del valor de TOTOX para la emulsión SHT6.5 y de control (SPI).

Los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad de la emulsión preparada con el hidrolizado con capacidad emulsificante óptima, muestran que se logró mayor estabilidad física y oxidativa en comparación con la emulsión empleando aislado de

proteína de soja intacta en los seis primeros días de almacenamiento. Sin embargo, cabe esperar una mejora de la estabilidad oxidativa si los hidrolizados con propiedades emulsificantes presentaran mejor capacidad antioxidante. Por este motivo, es necesario determinar las propiedades antioxidantes de los hidrolizados. El hidrolizado que consiga estabilizar la emulsión de manera más eficaz será el que reúna ambas propiedades, emulsificante y antioxidante, en la proporción y condiciones adecuadas.

#### **6.1.3.4. Estudio de las propiedades antioxidantes**

Como se trató en el apartado de antecedentes bibliográficos, las propiedades funcionales de los hidrolizados de proteínas dependen en gran medida de la fuente de la que procede la proteína y de las condiciones de la hidrólisis como el DH y tipo de enzima (Chalamaiah et al., 2012; Ipsen et al., 2001). La hidrólisis enzimática influye en el peso molecular, la hidrofobicidad y en sus grupos polares lo que afecta a su capacidad como antioxidantes (Camacho et al., 2001; Kristinsson and Rasco, 2000; Wu et al., 2003). También se ha discutido como los hidrolizados de proteína de lactosuero, soja y bacaladilla pueden poseer propiedades antioxidantes que inhiban o prevengan la oxidación lipídica en sistemas alimentarios complejos. En este apartado, se evalúa la influencia del grado de hidrólisis (DH 2, 4, 6, 10, 14%), el tipo de enzima utilizada (subtilisina, tripsina) y sustrato proteico (WPC, SPI, BP) sobre la capacidad antioxidante de esos hidrolizados. La determinación se realizó mediante tres métodos de análisis: Actividad inhibidora de radicales libres, poder reductor de  $\text{Fe}^{3+}$  y poder quelante de  $\text{Fe}^{2+}$ .

##### **6.1.3.4.1. Actividad inhibidora de radicales libres**

Para la determinación de la actividad inhibidora de radicales libres se ha utilizado el método de análisis que evalúa la capacidad de cada hidrolizado para inhibir al radical DPPH. Esto se expresa en términos de concentración inhibitoria media del hidrolizado ( $\text{IC}_{50}$ ) en mg/ml. Es decir, la concentración de hidrolizado necesaria para inhibir al radical DPPH en un 50%.

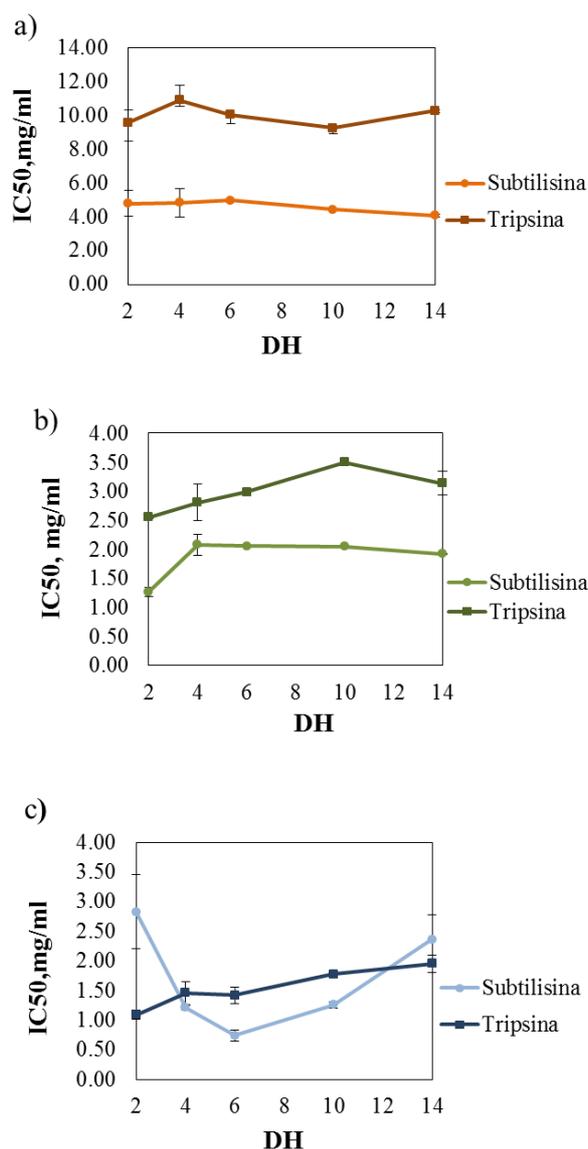


Figura 6.15 Actividad inhibidora de DPPH en función del grado de hidrólisis alcanzado (DH) y la enzima utilizada (subtilisina o tripsina) de: a) hidrolizados de concentrado de proteína de lactosuero (WPH), b) hidrolizados de aislado de proteína de soja (SPH) y c) hidrolizados de proteína de bacaladilla (BPH).

La Figura 6.15 representa la actividad inhibidora de DPPH, en valores de IC<sub>50</sub>, para los hidrolizados de concentrado de proteína de lactosuero (WPH), aislado de proteína de soja (SPH) y proteína de bacaladilla (BPH) en función del grado de hidrólisis alcanzado (DH) y la enzima utilizada, subtilisina o tripsina. Estos resultados muestran una mayor capacidad para inhibir al radical DPPH para los hidrolizados de SPH y BPH en comparación con los de WPH. El mejor valor de IC<sub>50</sub> obtenido fue con el hidrolizado de proteína de bacaladilla con subtilisina a DH 6% ( $0.74 \pm 0.09$  mg/ml). SPH y WPH

presentan el mejor valor también con subtilisina a DH 2% ( $1.26 \pm 0.08$  mg/ml) y DH 14% ( $4.09 \pm 0.07$  mg/ml) respectivamente (Figura 6.15). En general, los hidrolizados con subtilisina muestran mayor capacidad para inhibir al radical DPPH que los hidrolizados con tripsina. En diferentes estudios, se ha encontrado que la actividad inhibidora del radical DPPH de los hidrolizados derivados de subtilisina es mayor que la de otros hidrolizados (Arise et al., 2019; Ngo et al., 2010; Qian et al., 2008; Sarmadi and Ismail, 2010). La enzima subtilisina, en comparación con otras proteasas (tripsina, neutrasa, papaína), proporciona mayores rendimientos en la producción de péptidos antioxidantes (Kim et al., 2001; Park et al., 2001), esto es debido a que produce secuencias de péptidos más cortas y pueden reaccionar más fácilmente con radicales libres (Karimi et al., 2020; Ngo et al., 2010; Qian et al., 2008). Así, en un estudio en el que se hidrolizó la proteína de piel de rana usando subtilisina, neutrasa, pepsina, papaína,  $\alpha$ -quimotripsina y tripsina, el hidrolizado de subtilisina mostró la mejor actividad inhibidora de DPPH, expresada en porcentaje de inhibición ( $56.3 \pm 2.32\%$ ), en comparación con los hidrolizados con las otras proteasas (Qian et al., 2008). Sin embargo, estudios con sustratos proteicos procedentes de sardina y jurel que comparan hidrolizados con subtilisina y tripsina no muestran diferencias significativas en la capacidad para obtener péptidos con actividad inhibidora de DPPH de una enzima a otra (Morales-Medina et al., 2016). No obstante, en esos estudios con hidrolizados de pescado, a medida que el DH aumentaba, la capacidad para captar radicales libres disminuía (Morales-Medina et al., 2016). Tendencia que va en línea con otros estudios de proteína de pescado (García-Moreno et al., 2014b; Klompong et al., 2007). En esta investigación, el incremento de DH en los hidrolizados de proteína de bacaladilla sigue esa misma línea. En los hidrolizados de soja y lactosuero esa tendencia a la disminución de la actividad inhibidora del radical DPPH con el aumento del DH no es tan clara (Figura 6.15 a) b)). En un estudio con pulpa de soja tampoco se apreciaron diferencias significativas en la actividad inhibidora del radical DPPH en hidrolizados con subtilisina con DH que variaron de 16.85 a 33.6% (Sbroggio et al., 2016). Incluso en otros estudios se observó que aumentaba la actividad a DH elevados (DH 20-40%) (Peng et al., 2010; Zhang et al., 2010). La mejora de la actividad de captación de radicales libres DPPH a valores de DH más altos puede atribuirse al aumento de la capacidad para donar electrones e hidrógeno de los péptidos con menor tamaño, ya que, a medida que el grado de

hidrólisis aumenta el tamaño de los péptidos se reduce (García-Moreno et al., 2017; Kim et al., 2019). Todos estos estudios reportan resultados diversos, y ponen de manifiesto que, la actividad antioxidante de los hidrolizados, se ve afectada no solo por el tamaño y el tipo de proteasa empleada en la hidrólisis enzimática, sino también por la secuencia y la composición de aminoácidos.

#### 6.1.3.4.2. Poder reductor de $\text{Fe}^{3+}$

Se determinó la capacidad de los hidrolizados WPH, SPH y BPH para reducir  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ . Para el ensayo de poder reductor, la presencia de agentes reductores en los hidrolizados se determinó analizando la reducción del complejo  $\text{Fe}^{3+}$ /ferrocianuro a una forma ferrosa. Es decir, se determinó la capacidad de los hidrolizados para donar un electrón o hidrógeno a una especie prooxidante convirtiéndola en un compuesto más estable. Mediante esta donación de electrones, se puede regenerar una molécula antioxidante oxidada (Shahidi and Zhong, 2010).

La Figura 6.16 muestra los resultados obtenidos en la determinación del poder reductor de los hidrolizados WPH, SPH y BPH en función del DH y la enzima utilizada. El hidrolizado que presenta mejor poder reductor es el obtenido mediante hidrólisis de WPC con subtilisina con un DH de 14% ( $6.63 \pm 2.20$  mg/ml) seguido del hidrolizado de WPC a DH 10% con subtilisina ( $7.95 \pm 2.15$  mg/ml) (Figura 6.16 a)). El fuerte poder reductor de los hidrolizados de WPC puede deberse al aumento de la disponibilidad de iones de hidrógeno producidos por la hidrólisis con subtilisina (Kong and Xiong, 2006; Morales-Medina et al., 2016). Del mismo modo, con SPI y BP los mejores valores se obtuvieron también con subtilisina a DH 10% ( $14.33 \pm 3.68$  mg/ml) y DH 6% ( $9.8 \pm 0.36$  mg/ml), respectivamente (Figura 6.16 b) y c)). Los BPH y WPH presentan mejores valores en comparación con los SPH. Esto es debido a diferencias en los perfiles de aminoácidos en los péptidos de los hidrolizados, procedentes fuentes proteicas distintas, y su tamaño molecular que les confieren mayor o menor capacidad de reducción (García-Moreno et al., 2014b; Theodore et al., 2008). En general, los hidrolizados de subtilisina muestran mejores valores de capacidad reductora respecto a los de tripsina, pero no de forma tan pronunciada como en la determinación anterior de la actividad inhibidora de radicales libres. También en estudios con proteínas de germen de trigo y

proteínas de WPC tratadas con subtilisina fueron capaces de reducir  $\text{Fe}^{3+}$  de manera eficaz (Peng et al., 2010; Zhu et al., 2006), mientras que en estudios con proteína de pescado los hidrolizados de subtilisina el poder reductor fue significativamente más bajo que con otras enzimas, lo que puede ser debido a los grados de hidrólisis más elevados (DH >22 %) (Egerton et al., 2018; Klompong et al., 2007). En un estudio con proteína de jurel no se encontraron cambios significativos ( $p>0.05$ ) en el poder reductor entre los hidrolizados de subtilisina y Flavorzyme a DH comprendidos entre 5 y 15%, sin embargo, a DH más elevados, 25%, los hidrolizados de subtilisina mostraban menor capacidad (Egerton et al., 2018).

Respecto a la influencia del grado de hidrólisis, el aumento de DH en el rango de 2 a 14 % se aprecia una ligera mejora de la capacidad reductora. Otros autores también obtuvieron una mejora con el incremento de DH en el poder reductor para la mayoría de hidrolizados de aislado de proteína de soja (Freitas de Oliveira et al., 2015) y para hidrolizados de proteína de lactosuero (Peng et al., 2010). Sin embargo, en hidrolizados con proteínas de sardina el poder aumentó hasta un máximo en DH 5% pero en hidrolizados de proteína de pintarroja disminuyó conforme aumentaba el DH lo que indica que el sustrato proteico influye en la capacidad reductora de los hidrolizados (García-Moreno et al., 2016a).

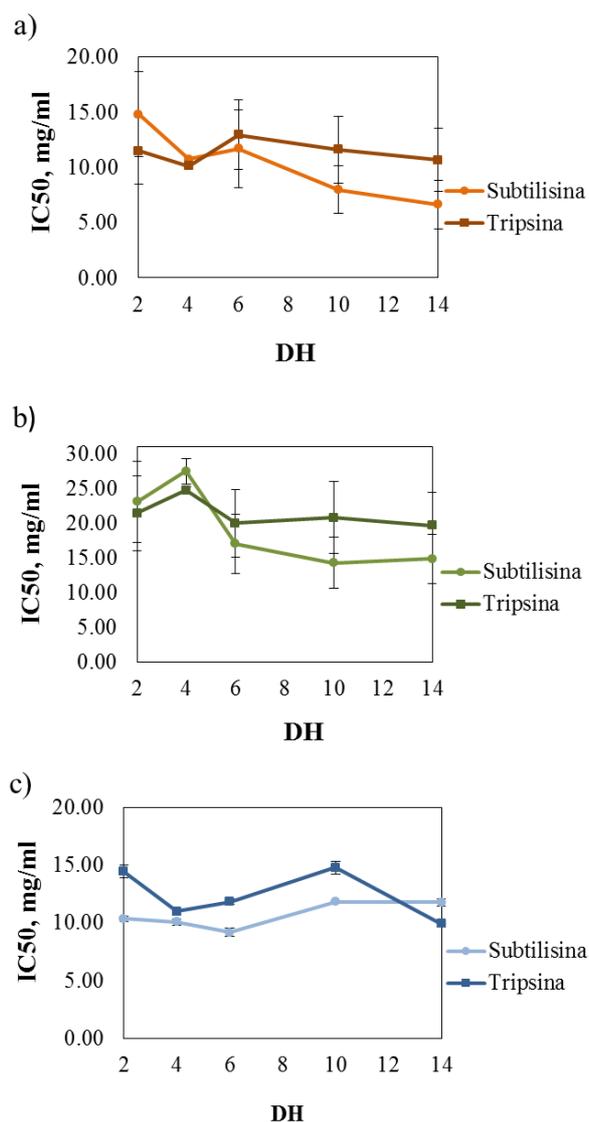


Figura 6.16 Poder reductor en función del grado de hidrólisis alcanzado (DH) y la enzima utilizada (subtilisina o tripsina) de: a) hidrolizados de concentrado de proteína de lactosuero (WPH), b) hidrolizados de aislado de proteína de soja (SPH) y c) hidrolizados de proteína de bacaladilla (BPH).

#### 6.1.3.4.3. Poder quelante de Fe<sup>2+</sup>

Los iones de metales de transición como el Fe<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup> pueden actuar como catalizadores de reacciones de oxidación facilitando la conversión del anión superóxido y de peróxido de hidrógeno en un radical hidroxilo, que puede iniciar la peroxidación de lípidos (Li et al., 2012). Así, los hidrolizados con capacidad para quelar los iones metálicos podrían disminuir la oxidación de lípidos.

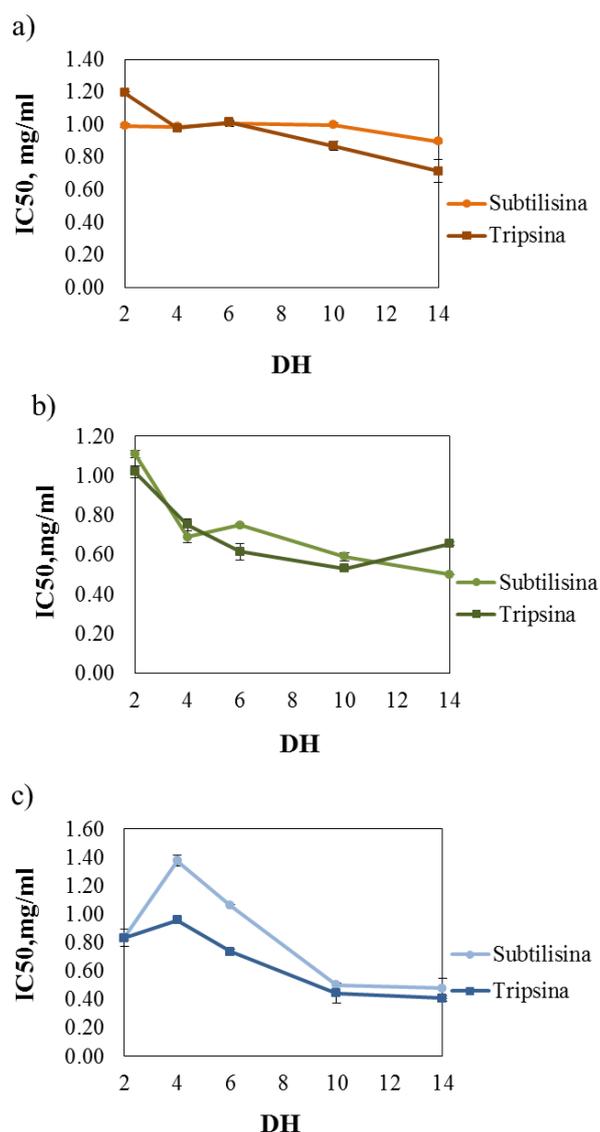


Figura 6.17 Poder quelante en función del grado de hidrólisis alcanzado (DH) y la enzima utilizada (subtilisina o tripsina) de: a) hidrolizados de concentrado de proteína de lactosuero (WPH), b) aislado de proteína de soja (SPH) y c) proteína de bacaladilla (BPH).

La Figura 6.17 muestra los valores de capacidad quelante de metales, en valores de IC<sub>50</sub>, de los hidrolizados en función del DH y la enzima. En general, los hidrolizados WPH, SPH y BPH muestran una gran capacidad para actuar como quelantes de iones metálicos (Figura 6.17). Sobre todo los BPH con tripsina, con el mejor IC<sub>50</sub> a DH 14% (0.41±0.02 mg/ml). Los IC<sub>50</sub> de los WPH, SPH y BPH oscilan entre 1.35±0.04 mg/ml y 0.41±0.02 mg/ml. La actividad quelante aumentó con el incremento de DH y esto indica que un mayor grado de escisión de los enlaces peptídicos produce hidrolizados con mayor actividad quelante de metales (Freitas de Oliveira et al., 2015). Estos resultados

están en consonancia con estudios tanto en aislado de proteína de lactosuero hidrolizados con subtilisina, en los que la actividad quelante de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  aumentaba con el DH (Peng et al., 2010). Como en hidrolizados de SPI con una proteasa procedente de *Chryseobacterium sp.* (Freitas de Oliveira et al., 2015) y en proteínas de pescado, en los que el aumento del DH también incrementaba la actividad quelante de los hidrolizados (Klompong et al., 2007; Morales-Medina et al., 2016).

Al igual que con las propiedades emulsificantes, también sería deseable ajustar a modelos estadísticos las propiedades antioxidantes con el objetivo de predecir un óptimo antioxidante. Sin embargo, no es posible actualmente obtener modelos fiables que optimicen las propiedades antioxidantes. Esto es debido a que en la capacidad antioxidante, resulta determinante la naturaleza química de los péptidos derivados de la hidrólisis enzimática. De este modo, las propiedades antioxidantes de los hidrolizados WPH, SPH y BPH son más dependientes de la secuencia de aminoácidos, que del tamaño de los péptidos.

#### **6.1.3.5. Selección de los hidrolizados con mejor capacidad emulsificante y antioxidante**

Para la obtención de hidrolizados con características adecuadas para la estabilización de lípidos funcionales en alimentos, es necesario combinar las capacidades antioxidantes y emulsificantes. En base a los resultados obtenidos en los Apartados 6.1.3.2., 6.1.3.3. y 6.1.3.4., se eligieron tres hidrolizados candidatos de cada sustrato proteico, WPC, SPI y BP, con las características necesarias para lograr la estabilización de lípidos en matrices alimentarias como son las emulsiones de aceites enriquecidos en ácidos grasos Omega-3.

##### **6.1.3.5.1. Hidrolizados procedentes de concentrado de proteína de lactosuero**

En relación a la capacidad antioxidante, los hidrolizados de proteína de lactosuero con mejores valores de DPPH y de poder reductor se encontraron a grados de hidrólisis entre 10 y 14% hidrolizados con subtilisina. Concretamente a DH 14% se obtuvieron valores de  $\text{IC}_{50}$  de  $4.09 \pm 0.07$  y  $6.63 \pm 2.20$  mg/ml para actividad inhibidora de DPPH y poder reductor, respectivamente. Y a DH 10% de  $4.45 \pm 0.00$  y  $7.95 \pm 2.15$  mg/ml,

respectivamente. En poder quelante, los mejores resultados se obtuvieron con tripsina en el rango de DH de 10 a 14%. Con valores de  $IC_{50}$  de  $0.72 \pm 0.07$  mg/ml con DH 14% y  $0.87 \pm 0.03$  mg/ml para DH 10%.

Por otro lado, para poder seleccionar un hidrolizado de entre los que presenten mayor capacidad antioxidante, se tienen en cuenta los modelos obtenidos anteriormente en el Apartado 6.1.3.2. Con los modelos matemáticos se pueden optimizar las propiedades emulsificantes en el rango de DH 10-14% en el que los hidrolizados con subtilisina muestran las capacidades antioxidantes mayores. En la Tabla 6.3 se muestran los valores de pH óptimos para grados de hidrólisis entre 10 y 14% analizados y el valor de la función objetivo en los WPH hidrolizados con subtilisina. Se obtuvieron valores máximos en las propiedades emulsificantes (IAE e IEE) para el hidrolizado de WPC con subtilisina a DH 10 a pH de emulsión igual a 8 (Tabla 6.3.).

Tabla 6.3 Óptimos de pH para hidrolizados de WPC con subtilisina. DH: grado de hidrólisis; IAE: Índice de Actividad Emulsificante; IEE: Índice de Estabilidad Emulsificante. FO: Valor de la función objetivo.

WPC Subtilisina				
DH, %	pH	IAE, $m^2/g$	IEE, min	FO
<b>10</b>	<b>8</b>	<b>9.97</b>	<b>24.81</b>	<b>1.36</b>
11	8	9.89	24.73	1.35
12	8	9.81	24.66	1.34
13	8	9.73	24.59	1.33
14	8	9.66	24.52	1.33

De este modo, el hidrolizado de WPC con subtilisina DH 10% (WPH10) se eligió para el estudio de estabilidad en emulsiones de aceite enriquecidas en ácidos grasos Omega-3 a pH 8. Las capacidades antioxidante y emulsificante del hidrolizado con WPC a DH 10% hidrolizado con subtilisina se reflejan en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4 Propiedades antioxidantes y emulsificantes del hidrolizado de concentrado de proteína de lactosuero a DH 10% con subtilisina (WPH10) seleccionado para el estudio de estabilidad física y oxidativa en emulsiones.

	Inhibición DPPH, mg/ml	Poder reductor, mg/ml	Poder quelante, mg/ml	IAE, $m^2/g$	IEE, min
<b>WPH10</b>	$4.45 \pm 0.00$	$7.95 \pm 2.15$	$0.95 \pm 0.01$	9.97	24.81

### 6.1.3.5.2. Hidrolizados procedentes de aislado de proteína de soja

Los hidrolizados de SPI presentan el mejor valor de DPPH ( $1.26 \pm 0.08$  mg/ml) a DH 2% con subtilisina y en poder quelante y reductor los hidrolizados con subtilisina a DH 14% ( $0.50 \pm 0.00$  mg/ml) y DH 10% ( $14.33 \pm 3.68$  mg/ml) respectivamente. De acuerdo con los modelos de optimización de las propiedades emulsificantes obtenidos en el Apartado 6.1.3.2., se pueden optimizar las propiedades emulsificantes de los hidrolizados con subtilisina que son los que muestran las capacidades antioxidantes mayores. En la Tabla 6.5 se muestran los valores de pH óptimos para cada grado de hidrólisis analizado y el valor de la función objetivo en los SPH hidrolizados con subtilisina. El valor de pH que maximiza los valores de IAE e IEE es igual a 8 y el hidrolizado a DH 2% es el que presenta el mejor valor de la función objetivo (Tabla 6.5).

Tabla 6.5 Óptimos de pH para hidrolizados de SPI con subtilisina. DH: grado de hidrólisis; IAE: Índice de Actividad Emulsificante; IEE: Índice de Estabilidad Emulsificante. FO: Valor de la función objetivo.

SPI Subtilisina				
DH, %	pH	IAE, m <sup>2</sup> /g	IEE, min	FO
<b>2</b>	<b>8</b>	<b>10.09</b>	<b>32.40</b>	<b>1.55</b>
3	8	9.93	32.33	1.54
4	8	9.77	32.25	1.52
5	8	9.62	32.18	1.51
6	8	9.46	32.11	1.49
7	8	9.30	32.04	1.48
8	8	9.14	31.97	1.46
9	8	8.98	31.90	1.45
10	8	8.82	31.83	1.44
11	8	8.66	31.75	1.42
12	8	8.50	31.68	1.41
13	8	8.34	31.61	1.39
14	8	8.18	31.54	1.38

Por tanto, para el estudio de estabilidad en emulsiones el hidrolizado de SPI elegido fue a DH 2% con subtilisina (SPH2). Las capacidades antioxidante y emulsificante del hidrolizado SPH2 para emulsión a pH 8 se reflejan en la Tabla 6.6.

Tabla 6.6 Propiedades antioxidantes y emulsificantes del hidrolizado de aislado de proteína de soja a DH 2% con subtilisina (SPH2) seleccionado para el estudio de estabilidad física y oxidativa en emulsiones.

	Inhibición DPPH, mg/ml	Poder reductor, mg/ml	Poder quelante, mg/ml	IAE, m <sup>2</sup> /g	IEE, min
<b>SPH2</b>	1.26 ± 0.08	23.11 ± 5.90	1.11 ± 0.02	10.09	32.40

#### 6.1.3.5.3. Hidrolizados procedentes de proteína de bacaladilla de descarte

En el estudio de la capacidad emulsificante de los hidrolizados de WPC, SPI y BP, los BPH solamente emulsificaban a pH 2 para los DH 2, 4 y 6%. A otros pH, 4, 6 y 8, la emulsión se desestabiliza e incluso ni llega a emulsificar. Por este motivo no fue posible su ajuste a un modelo matemático. Se eligió bacaladilla hidrolizada para esta investigación en base a estudios previos que se realizaron en el grupo de investigación que demostraban su capacidad emulsificante (García-Moreno et al., 2017). También ha dado resultados favorables en emulsificante a pH 2, y en antioxidante a DH 4% hidrolizada con tripsina como se ha discutido en los Apartados 6.1.3.1. y 6.1.3.4.

En cuanto a la capacidad antioxidante, los mejores valores de IC<sub>50</sub> (mg/ml) son para los hidrolizados de subtilisina a DH 6% con DPPH de 0.74±0.09 mg/ml y poder reductor de 9.18±0.36 mg/ml y para capacidad quelante el hidrolizado a DH 14% con tripsina (0.41±0.02 mg/ml). El inconveniente es que esos hidrolizados no presentan buena capacidad emulsificante y se descartaron por ese motivo. El hidrolizado de bacaladilla a DH 4% con tripsina (BPH4) presenta buenos valores de antioxidante como se refleja en la Tabla 6.7.

La bacaladilla hidrolizada a DH 4% con tripsina y a pH 2 en la emulsión, presenta el mejor comportamiento emulsificante con valores de IAE e IEE de 14.94±1.36 m<sup>2</sup>/g y 81.97±6.16 minutos respectivamente. De este modo, se eligió el hidrolizado de BP a DH 4% con tripsina (BPH4) para el estudio de estabilidad en emulsiones.

Tabla 6.7 Propiedades antioxidantes y emulsificantes del hidrolizado de proteína de bacaladilla a DH 4% con tripsina (BPH4) seleccionado para el estudio de estabilidad física y oxidativa en emulsiones.

	Inhibición DPPH, mg/ml	Poder reductor, mg/ml	Poder quelante, mg/ml	IAE, m <sup>2</sup> /g	IEE, min
<b>BPH4</b>	1.46 ± 0.20	11.00 ± 0.34	0.95 ± 0.01	14.94±1.36	81.97±6.16

#### 6.1.4. Conclusiones

La hidrólisis enzimática de proteínas de concentrado de proteína de lactosuero, aislado de proteína de soja y de proteína de bacaladilla produjo hidrolizados con propiedades emulsificantes.

De forma general, grados de hidrólisis bajos y condiciones de pH alejadas del punto isoeléctrico mejoraron las propiedades emulsificantes. Los modelos matemáticos obtenidos fueron capaces de ajustar los datos experimentales de los hidrolizados de concentrado de proteína de lactosuero y aislado de proteína de soja, lo que permitió identificar al hidrolizado de soja producido con tripsina a DH 6.5% como el hidrolizado con mejores propiedades emulsificantes.

La emulsión producida con el hidrolizado de soja con tripsina a DH 6.5% presentó una buena estabilidad física. Para lograr una mejor estabilidad oxidativa es necesario considerar las capacidades antioxidantes de los hidrolizados de concentrado de proteína de lactosuero, aislado de proteína de soja y proteína de bacaladilla.

La hidrólisis enzimática de las proteínas en estudio generó hidrolizados con buenas propiedades antioxidantes. En general, los hidrolizados procedentes de los tres sustratos proteicos estudiados mostraron una gran capacidad para actuar como quelantes de iones metálicos. Los hidrolizados de aislado de proteína de soja y proteína de bacaladilla muestran una mayor capacidad para inhibir al radical DPPH en comparación con los de concentrado de proteína de lactosuero. Respecto al poder reductor, los hidrolizados de proteína de bacaladilla y concentrado de proteína de lactosuero presentan mejor capacidad que los hidrolizados de aislado de proteína de soja. De forma general los hidrolizados con subtilisina presentaron mejores propiedades antioxidantes que los hidrolizados con tripsina.

Los hidrolizados de cada sustrato proteico estudiado que presentaron mejores propiedades emulsificantes y antioxidantes en conjunto son el hidrolizado de concentrado de proteína de lactosuero a DH 10% con subtilisina (50°C, pH8) (WPH10), el hidrolizado de aislado de proteína de soja a DH 2% con subtilisina (50°C, pH8) y el

hidrolizado de proteína de bacaladilla a DH 4% con tripsina (50°C, pH8) (BPH4) (Tabla 6.8).

Tabla 6.8 Hidrolizados del estudio con mejores propiedades antioxidantes y emulsificantes en conjunto.

Hidrolizado	Inhibición DPPH, mg/ml	Poder reductor, mg/ml	Poder quelante, mg/ml	IAE, m <sup>2</sup> /g	IEE, min
<b>WPH10</b>	4.45 ± 0.00	7.95 ± 2.15	0.95 ± 0.01	9.97	24.81
<b>SPH2</b>	1.26 ± 0.08	23.11 ± 5.90	1.11 ± 0.02	10.09	32.40
<b>BPH4</b>	1.46 ± 0.20	11.00 ± 0.34	0.95 ± 0.01	14.94±1.36	81.97±6.16



## **6.2. Estudio de la estabilidad física y oxidativa de emulsiones de aceites ricos en ácidos grasos Omega-3 con hidrolizados de proteínas alimentarias**

### **6.2.1. Objetivos y tareas**

El objetivo de esta sección es evaluar la estabilidad física y oxidativa de emulsiones de aceite de pescado, rico en ácidos grasos Omega-3, en agua estabilizadas con los hidrolizados de proteínas alimentarias con mejores propiedades emulsificantes y antioxidantes, seleccionados en el Apartado 6.1.3.5., WPH10, SPH2 y BPH4.

En primer lugar, se determinaron los perfiles de aminoácidos y la distribución de tamaño molecular de los tres hidrolizados para una caracterización más completa. Posteriormente, se evaluó la capacidad de estos hidrolizados para estabilizar emulsiones de aceite de pescado rico en ácidos grasos Omega-3. Para ello, se produjeron tres emulsiones con WPH10, SPH2 y BPH4, y se evaluaron sus características físicas y oxidativas tras someterlas a una oxidación acelerada durante 10 días de almacenamiento en oscuridad y a una temperatura de 20°C.

### **6.2.2. Procedimiento experimental**

Comprende la determinación del perfil de aminoácidos, tamaño molecular y análisis proximal de WPH10, SPH2 y BPH4, la producción de las emulsiones de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 en agua y su caracterización física y oxidativa.

#### **6.2.2.1. Determinación del perfil de aminoácidos, tamaño molecular y análisis proximal de WPH10, SPH2 y BPH4**

La determinación del perfil de aminoácidos y del tamaño molecular de los hidrolizados WPH10, SPH2 y BPH4 puede proporcionar información que completa y justifica las características emulsificantes y antioxidantes que poseen. El perfil de aminoácidos de los hidrolizados se determinó según el procedimiento descrito en el Apartado 5.2.2.1.

La distribución de tamaño molecular se determinó según el procedimiento descrito en el Apartado 5.2.2.2.

En el análisis proximal de los tres hidrolizados el contenido de proteína se determinó por el método Kjeldahl, asumiendo un factor de conversión de nitrógeno a proteína de 6.25 (Adler-Nissen, 1986) y el contenido de grasa se determinó según el método de extracción Soxhlet.

#### **6.2.2.2. Producción de las emulsiones**

Se prepararon tres emulsiones de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 en agua, estabilizadas con los hidrolizados seleccionados de concentrado de proteína de lactosuero DH 10% (WPH10), de aislado de proteína de soja DH 2% (SPH2) y de proteína de bacaladilla DH 4% (BPH4). Las emulsiones contenían 2% (p/p) de proteína y 5% (p/p) de aceite de pescado según la metodología empleada por García-Moreno et al. (2016a) como se refleja en el Apartado 5.2.3. Los hidrolizados se disolvieron en agua destilada. De acuerdo con las condiciones óptimas identificadas en la sección anterior, el pH se ajustó a 2 para BPH4 y a 8 para SPH2 y WPH10 mediante la adición de soluciones de HCl 1M y NaOH 1M. En primer lugar, la preemulsión se realizó agitando en Ultra Turrax (IKA Werke GmbH & .Co., Staufen, Alemania) a 16000 rpm durante 2 minutos y se añadió el aceite de pescado durante el primer minuto (Figura 5.2). Después, la homogeneización se realizó en un homogeneizador de alta presión (Panda Plus 2000, GEA Niro Soavi, Lübeck, Alemania) a 450/75 bar en tres ciclos (Figura 5.3). Para acelerar la oxidación de lípidos, se añadió a las emulsiones una solución de FeSO<sub>4</sub> 100 mM (4 µl por 1 g de emulsión). También se agregó una solución de 0.0125 g/ml de azida de sodio para evitar el deterioro microbiano durante el almacenamiento. Las emulsiones se almacenaron en oscuridad a 20 °C durante 10 días en botellas de vidrio de 30 ml y 26 mm de diámetro interno. Cada botella contenía 10 ml de emulsión. Se tomaron muestras en los días 0, 1, 3, 6 y 10 para las medidas de estabilidad física y oxidativa.

### **6.2.2.3. Caracterización física de las emulsiones**

Para evaluar la estabilidad física de las emulsiones de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 sometidos a oxidación acelerada durante 10 días a 20°C, se determinó el potencial zeta, la distribución de tamaño de partícula, test de creaming y se evaluó la estructura de las emulsiones de forma cualitativa.

#### **6.2.2.3.1. Potencial zeta**

Se determinó el potencial zeta de emulsiones estabilizadas con WPH10, SPH2 y BPH4 a día 1 para obtener información sobre la carga superficial de las gotas en la interfase aceite-agua, lo que da una idea de la estabilidad inicial de las emulsiones. El potencial zeta se determinó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Apartado 5.2.4.1.

#### **6.2.2.3.2. Distribución del tamaño de gota**

Como medida de la estabilidad física de las emulsiones durante el periodo de almacenamiento de 10 días se determinó el tamaño de gota en las emulsiones estabilizadas con WPH10, SPH2 y BPH4 a día 0, 1, 3, 6 y 10 de almacenamiento. Su determinación se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en el Apartado 5.2.4.2. Los resultados se obtuvieron en diámetro del percentil 90 ( $D_{90}$ ), diámetro medio en volumen o de Brouckere ( $D_{4,3}$ ) y diámetro en volumen/superficie o de Sauter ( $D_{3,2}$ ).

#### **6.2.2.3.3. Test de creaming y caracterización cualitativa de la estructura de las emulsiones**

En el Apartado 5.2.4.3. se describe el procedimiento para realizar el test de creaming que evalúa estados avanzados de agregación en las emulsiones que pueden dar lugar a separación de fases.

Para completar el estudio de estabilidad física, se realizó una evaluación cualitativa de la estructura de las emulsiones estabilizadas con WPH10, SPH2 y BPH4 mediante microscopía óptica según el procedimiento descrito en el Apartado 5.2.4.3.

#### **6.2.2.4. Estabilidad oxidativa de las emulsiones**

La estabilidad oxidativa de las emulsiones de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 sometidas a oxidación acelerada durante 10 días a 20°C, se evaluó mediante el análisis de los productos de oxidación primaria con la determinación del valor de peróxidos (PV), análisis de productos secundarios de oxidación mediante la determinación del índice de anisidina (AI) y su cuantificación e identificación mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (Dynamic Headspace).

##### **6.2.2.4.1. Determinación del valor de peróxidos (PV) y valor de anisidina (AV)**

Se determinó el PV y AV de las emulsiones estabilizadas con WPH10, SPH2 y BPH4 a día 0, 1, 3, 6 y 10 de almacenamiento mediante los procedimientos descritos anteriormente en los Apartados 5.2.5.1. y 5.2.5.2.

##### **6.2.2.4.2. Cuantificación e identificación de productos de oxidación secundarios volátiles (Dynamic Headspace GC-MS)**

Para la determinación e identificación de compuestos volátiles, derivados de la descomposición de los compuestos de oxidación primaria, se empleó la técnica Dynamic Headspace GC-MS descrita en el Apartado 5.2.5.3. La toma de muestra se realizó también en los días 0, 1, 3, 6 y 10 de almacenamiento.

### **6.2.3. Resultados y discusión**

Según se ha descrito en el apartado de procedimiento experimental, para una caracterización más completa de los hidrolizados WPH10, SPH2 y BPH4 se determinó su perfil de aminoácidos y tamaño molecular. Posteriormente, se caracterizaron las tres emulsiones de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 estabilizadas con los hidrolizados en estudio y se evaluó la estabilidad física y oxidativa de cada una de ellas.

#### **6.2.3.1. Análisis proximal, perfil de aminoácidos y tamaño molecular de los hidrolizados**

La Tabla 6.9 muestra la composición de los hidrolizados WPH10, SPH2 y BPH4. El hidrolizado SPH2 fue el de mayor contenido de proteína seguido de BPH4 y después de

WPH10, tal y como ocurre en los sustratos proteicos originales. El contenido en lípidos de BPH4 fue mayor que el de SPH2 y WPH10, a pesar de que la bacaladilla es una de las especies de descarte menos grasas del mar Mediterráneo (García-Moreno et al., 2013). En cuanto al perfil de aminoácidos, todos los hidrolizados presentaron altas concentraciones de ácido aspártico, glutámico, alanina, lisina y leucina (Tabla 6.9). Aminoácidos con carga negativa, como el aspártico y glutámico, pueden donar electrones y actuar como agentes quelantes de metales. Y aminoácidos como la lisina, con carga positiva, son capaces de unirse y neutralizar radicales libres cargados negativamente (Aluko, 2015). La alanina y leucina, también presentes en altas concentraciones en los hidrolizados estudiados, son aminoácidos hidrofóbicos a los que se le atribuyen también capacidades reductoras de iones férricos y quelación de metales. Además los aminoácidos hidrofóbicos mejoran la interacción de los hidrolizados con el entorno lipófilo y aumenta la capacidad de captación de radicales de los péptidos (Aluko, 2015). Los aminoácidos esenciales en BPH4 y WPH10 representaron alrededor del 45% del total, mientras que SPH2 tuvo un valor ligeramente inferior (41%) (Tabla 6.9). La proporción de aminoácidos hidrófobos fue un 5% mayor en WPH10, como ya se trató, estos aminoácidos también pueden tener influencia positiva en la actividad emulsificante de los hidrolizados.

En general, los tres hidrolizados estudiados presentaron altas proporciones de péptidos de bajo peso molecular (Figura 6.18). Particularmente, BPH tenía más del 60% de los péptidos entre 0.5 y 3 kDa. En otros hidrolizados de pescado a DH bajos también se han observado proporciones similares de péptidos de bajo peso molecular (García-Moreno et al., 2016a). Esta fracción de péptidos es un factor importante que afecta a la inhibición de radicales libres y a la actividad quelante de iones metálicos (Sila and Bougatef, 2016).

En el hidrolizado de SPH2, el bajo grado de hidrólisis (DH 2%) es responsable de la mayor proporción de péptidos con alto peso molecular. Esto es importante ya que, la presencia de péptidos grandes (>2kDa), generalmente mejora las propiedades emulsificantes del hidrolizado (Schröder et al., 2017) debido a su mejor capacidad para

absorberse y desplegarse en la interfase aceite-agua. Aunque las propiedades emulsificantes también dependen de la composición y la secuencia de los aminoácidos.

Tabla 6.9 Composición proximal y de aminoácidos del hidrolizado de concentrado de proteína de lactosuero (WPH10), hidrolizado de aislado de proteína de soja (SPH2) y del hidrolizado de proteína de bacaladilla (BPH4). \* Indica aminoácidos hidrofóbicos. Las medias con diferentes superíndices en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

	<b>WPH10</b>	<b>SPH2</b>	<b>BPH4</b>
Humedad, % peso	5.32 ± 0.17 <sup>c</sup>	2.75 ± 0.13 <sup>b</sup>	3.35 ± 0.06 <sup>a</sup>
Proteína, % peso	32.65 ± 0.78 <sup>c</sup>	83.90 ± 0.91 <sup>b</sup>	76.76 ± 0.43 <sup>a</sup>
Lípidos, % peso	2.29 ± 0.01 <sup>c</sup>	4.79 ± 0.06 <sup>b</sup>	9.35 ± 0.15 <sup>a</sup>
Cenizas, % peso	8.08 ± 0.11 <sup>c</sup>	5.75 ± 0.18 <sup>b</sup>	7.31 ± 0.08 <sup>a</sup>
<b>Composición de aminoácidos, % Molar</b>			
<b>Aminoácidos Esenciales</b>			
HIS	3.23 ± 0.09 <sup>c</sup>	10.24 ± 0.36 <sup>b</sup>	12.57 ± 0.05 <sup>a</sup>
ARG	2.16 ± 0.25 <sup>b</sup>	5.37 ± 0.16 <sup>a</sup>	5.21 ± 0.05 <sup>a</sup>
THR	7.28 ± 0.33 <sup>b</sup>	4.03 ± 0.20 <sup>a</sup>	4.56 ± 0.06 <sup>a</sup>
VAL*	5.97 ± 0.19 <sup>b</sup>	4.60 ± 0.04 <sup>a</sup>	4.86 ± 0.00 <sup>a</sup>
MET*	1.56 ± 0.06 <sup>c</sup>	1.01 ± 0.08 <sup>b</sup>	2.61 ± 0.01 <sup>a</sup>
LYS	8.17 ± 0.37 <sup>a</sup>	5.78 ± 0.13 <sup>b</sup>	7.63 ± 0.00 <sup>a</sup>
ILE*	5.57 ± 0.12 <sup>c</sup>	4.37 ± 0.05 <sup>b</sup>	3.81 ± 0.02 <sup>a</sup>
LEU*	10.14 ± 0.32 <sup>b</sup>	7.42 ± 0.09 <sup>a</sup>	7.09 ± 0.23 <sup>a</sup>
PHE*	2.57 ± 0.14 <sup>a</sup>	3.72 ± 0.26 <sup>b</sup>	2.84 ± 0.09 <sup>a</sup>
<b>Aminoácidos No Esenciales</b>			
ASP	10.23 ± 0.72 <sup>ab</sup>	11.35 ± 0.74 <sup>b</sup>	9.51 ± 0.23 <sup>a</sup>
SER	5.72 ± 0.52 <sup>ab</sup>	6.44 ± 0.06 <sup>b</sup>	5.48 ± 0.13 <sup>a</sup>
GLU	14.19 ± 0.63 <sup>c</sup>	16.54 ± 1.09 <sup>b</sup>	12.29 ± 0.29 <sup>a</sup>
GLY	7.19 ± 1.42 <sup>b</sup>	4.48 ± 0.88 <sup>a</sup>	6.26 ± 0.33 <sup>b</sup>
ALA*	6.99 ± 0.34 <sup>b</sup>	5.99 ± 0.53 <sup>b</sup>	8.31 ± 0.46 <sup>a</sup>
PRO	6.91 ± 0.10 <sup>c</sup>	5.82 ± 0.28 <sup>b</sup>	4.37 ± 0.05 <sup>a</sup>
TYR	2.12 ± 0.37 <sup>b</sup>	2.85 ± 0.20 <sup>a</sup>	2.61 ± 0.09 <sup>ab</sup>

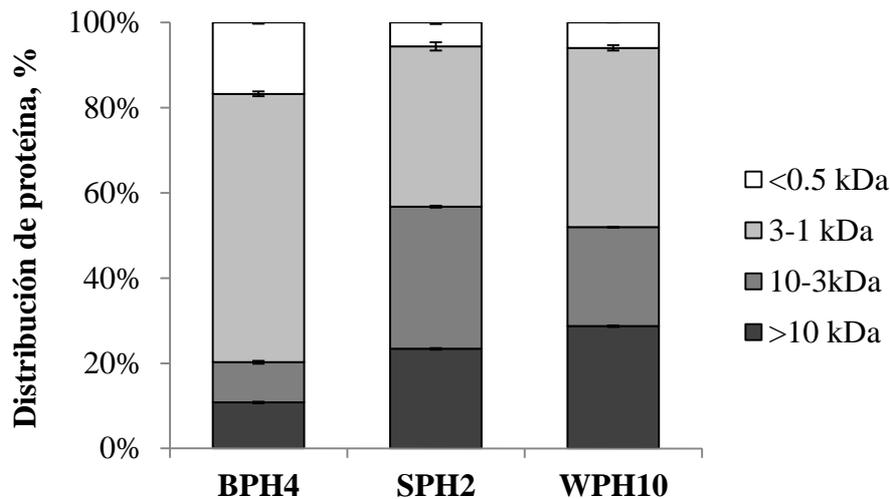


Figura 6.18 Distribución del peso molecular del hidrolizado de proteína de bacaladilla (BPH4), hidrolizado de proteína de soja (SPH2) e hidrolizado de proteína de lactosuero (WPH10).

La capacidad antioxidante es distinta para cada hidrolizado. La Tabla 6.10 muestra un resumen de las capacidades antioxidantes de los tres hidrolizados determinadas en la sección anterior. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el Apartado 6.1.3.4., sobre el estudio de las propiedades antioxidantes de los hidrolizados, el BPH4 presentó una notable capacidad antioxidante, presentando actividad inhibidora de radicales libres significativamente mayor que WPH10 y significativamente mayor capacidad quelante de metales que SPH2. La alta concentración de péptidos de bajo peso molecular y alta proporción de aminoácidos con potencial antioxidante, como alanina, tirosina, histidina o metionina (Aluko, 2015), contribuyen a las buenas características antioxidantes del hidrolizado BPH4. Por otro lado, WPH10 no mostró diferencias significativas en actividad quelante de metales en comparación con BPH4. SPH2 mostró valores de DPPH similares a los de BPH4 ( $p>0.05$ ) pero significativamente menor poder reductor y actividad quelante en comparación con BPH4 y WPH10. Esto se atribuye, como se trató en el Apartado 6.1.3.4, al DH menor de SPH2 que solo permite la exposición de un número limitado de aminoácidos con cadena lateral que donan electrones (Guan et al., 2018). Además, SPH2 presentó la mayor proporción de péptidos superiores a 3 kDa, lo que se ha relacionado con una menor capacidad reductora (Kim et al., 2019).

Tabla 6.10 Actividad antioxidante (valores de  $IC_{50}$ ) del hidrolizado de concentrado de proteína de lactosuero (WPH10), hidrolizado de aislado de proteína de soja (SPH2) e hidrolizado de proteína de bacaladilla (BPH4). Las medias con diferentes superíndices en la misma columna son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

	DPPH, mg/ml	Poder reductor, mg/ml	Poder quelante, mg/ml
<b>WPH10</b>	$4.45 \pm 0.00^b$	$7.95 \pm 2.15^a$	$0.95 \pm 0.01^a$
<b>SPH2</b>	$1.26 \pm 0.08^a$	$23.11 \pm 5.90^b$	$1.11 \pm 0.02^b$
<b>BPH4</b>	$1.46 \pm 0.20^a$	$11.00 \pm 0.34^a$	$0.95 \pm 0.01^a$

### 6.2.3.2. Caracterización y estabilidad física de las emulsiones de aceite rico en ácidos grasos Omega-3

Los valores de potencial zeta obtenidos en las emulsiones estabilizadas con los hidrolizados fueron  $36.3 \pm 0.06$ ,  $-46.8 \pm 0.72$  y  $-44.0 \pm 0.60$  mV para BPH4, SPH2 y WPH10 respectivamente. Son deseables altos valores absolutos de potencial zeta ( $>30$  mV) porque la repulsión electrostática impide la agregación de partículas y hace la emulsión más estable. Para las emulsiones estabilizadas con BPH4 se obtuvo un potencial positivo ya que esta emulsión se produjo a pH 2, por debajo del punto isoeléctrico (pI) de las proteínas de bacaladilla. Por el contrario, las emulsiones estabilizadas con SPH2 y WPH10 producidas a pH 8, por encima del pI de las proteínas, tuvieron valores negativos de potencial zeta. El potencial zeta más bajo en valor absoluto para la emulsión estabilizada con BPH4 implica una reducción de las repulsiones entre las gotas de aceite en comparación con las emulsiones estabilizadas con SPH2 y WPH10. Sin embargo, los valores negativos de potencial zeta obtenidos en las emulsiones de SPH2 y WPH10 pueden favorecer las reacciones de oxidación lipídica, ya que, las cargas superficiales negativas atraen iones metálicos que son potentes catalizadores de las reacciones de oxidación de lípidos (Mei et al., 1999). No obstante, la capacidad quelante de  $Fe^{2+}$  de estos hidrolizados, cuando están presentes en la interfase y en la fase acuosa, juega un papel importante en la prevención de la oxidación catalizada por iones metálicos. Esto es especialmente importante en la emulsión a pH bajo, donde el efecto prooxidante de los iones metálicos es aún mayor debido a su mayor solubilidad. Así, en emulsiones de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 estabilizadas con citrem a pH 3 presentaban menor estabilidad física y oxidativa que a pH6 en presencia de iones metálicos (Sørensen et al., 2008).

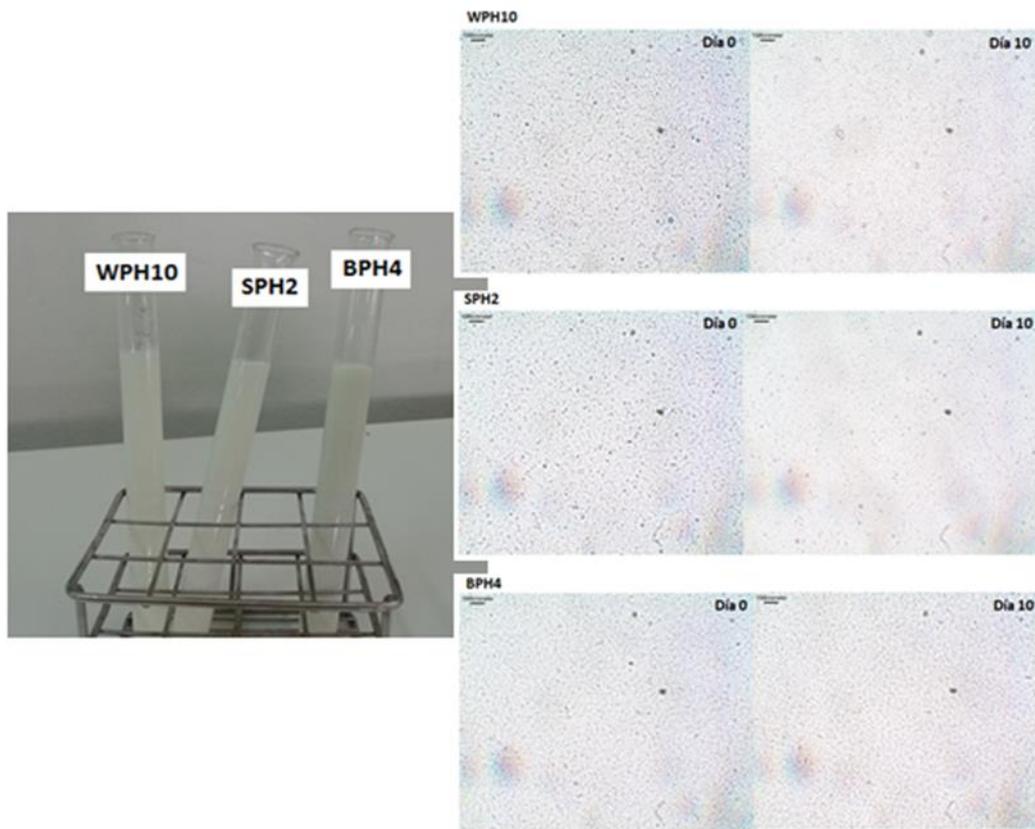


Figura 6.19 Imágenes de cámara digital y microscopía óptica de las emulsiones WPH10, SPH2 y BPH4 a día 0 y día 10 de almacenamiento a 20°C. Las barras de escala indican 10 µm.

Las emulsiones estabilizadas con los hidrolizados no presentaron creaming después de 10 días de almacenamiento. La Figura 6.19, muestra imágenes de cámara digital y microscopía óptica de las emulsiones de aceite de pescado en agua estabilizadas con los hidrolizados WPH10, SPH2 y BPH4 a día 0 y día 10 de almacenamiento a 20°C. No se aprecia creaming ni coalescencia durante el periodo de almacenamiento para ninguna de las tres emulsiones estudiadas.

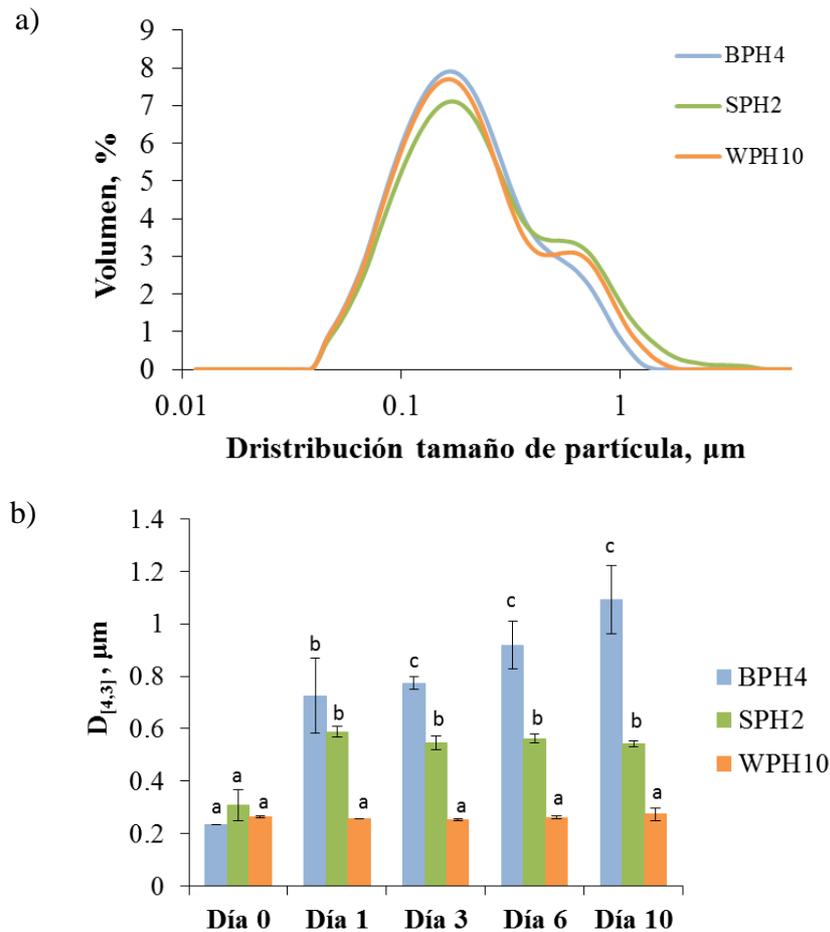


Figura 6.20 Distribución de tamaño de partícula a día 0 a) y variación en  $D_{4,3}$  b) de las emulsiones estabilizadas con hidrolizado de proteína de bacaladilla (BPH4), hidrolizado de aislado proteína de soja (SPH2) e hidrolizado de concentrado de proteína de suero (WPH10) durante el almacenamiento a  $20^{\circ}\text{C}$ .

Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la distribución del tamaño de gota para las diferentes emulsiones estabilizadas con cada hidrolizado (Figura 6.20). Inicialmente todas las emulsiones presentaron distribución monomodal sin diferencias significativas en los valores de  $D_{4,3}$  (Figura 6.20 b)). Después del primer día de almacenamiento, la emulsión estabilizada con BPH4 mostró una distribución bimodal con un segundo pico centrado alrededor  $11 \mu\text{m}$  (Figura 6.21). Este segundo pico fue en aumento durante el periodo de almacenamiento, lo que explica los valores crecientes de  $D_{4,3}$  (Figura 6.20 b)) hasta alcanzar un valor de  $1.09 \pm 0.13 \mu\text{m}$  tras 10 días de almacenamiento. Este comportamiento puede explicarse debido a la baja proporción de péptidos de mayor peso molecular. Los péptidos de mayor tamaño suelen ser más anfífilos lo que permite su mejor adsorción en la interfase aceite-agua (Gbogouri et al., 2004). Así, en emulsiones, al 5% de aceite, estabilizadas con hidrolizado de sardina

DH 3% se obtuvieron diámetros similares inicialmente, pero la estabilidad física fue mayor alcanzando un diámetro  $D_{4,3}$  de  $0.349 \pm 0.002 \mu\text{m}$  tras siete días de almacenamiento (García-Moreno et al., 2016a).

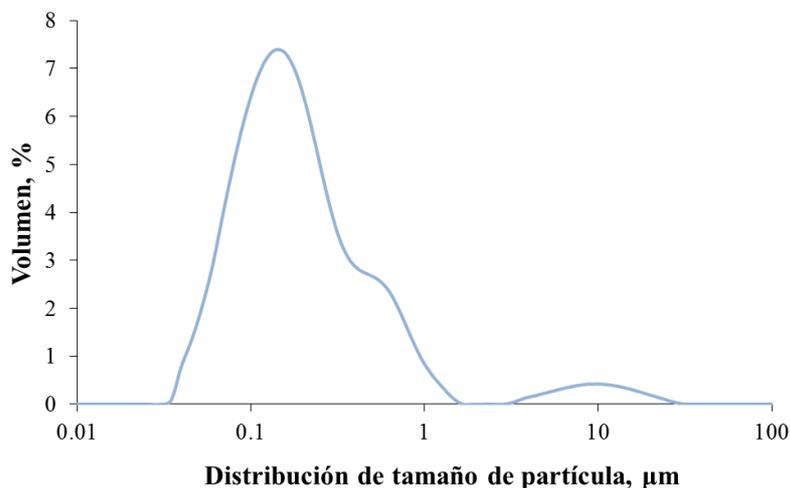


Figura 6.21 Distribución del tamaño de partícula de la emulsión de aceite de pescado en agua estabilizada con hidrolizado de proteína de bacaladilla DH 4% (BPH4) a día 1 de almacenamiento.

La emulsión estabilizada con SPH2 también mostró un aumento inicial en  $D_{4,3}$  después del primer día de almacenamiento (Figura 6.20 b)). Sin embargo, en este caso, la distribución de tamaño se mantuvo estable desde el día 1 hasta el final del periodo de almacenamiento. Con el diámetro  $D_{4,3}$  se aprecia mejor el comportamiento que con el  $D_{3,2}$ , ya que, este diámetro refleja el tamaño de las partículas que constituyen la mayor parte del volumen de la muestra. Además, el diámetro  $D_{4,3}$  es más sensible a la presencia de partículas grandes en la distribución. Por lo que se perciben mejor las variaciones de tamaño de las diferentes gotas de aceite en emulsión. Por este motivo no se aprecian tan claramente las variaciones de tamaño con el diámetro de Sauter de manera que el  $D_{3,2}$  se mantuvo en un promedio de  $0.155 \pm 0.003 \mu\text{m}$  (Figura 6.22). En un estudio en emulsiones similares, con 1% hidrolizado y 5% aceite, estabilizadas con hidrolizado de proteína de haba con DH 4%, obtuvieron un tamaño de gota más pequeño,  $D_{3,2}$  de  $0.052 \pm 0.001 \mu\text{m}$ . Sin embargo, la estabilidad física de la emulsión después de siete días fue menor, el tamaño de gota se incrementó al doble del tamaño inicial (Liu et al., 2019). En otro estudio en emulsiones estabilizadas con hidrolizados

de proteína de soja, obtienen  $D_{4,3}$  superiores a  $1 \mu\text{m}$  tras 24 horas de almacenamiento. Pero las concentraciones de hidrolizado (3%) y aceite (10%) eran superiores lo que influye en el tamaño de gota (Chen et al., 2019).

La emulsión preparada con WPH10 presentó una excelente estabilidad física. La mejora observada en la emulsión estabilizada con WPH10 en comparación con las emulsiones de BPH4 y SPH2, se debe a la mayor proporción de péptidos más grandes (Figura 6.18) y de aminoácidos hidrófobos en el hidrolizado WPH10 (Tabla 6.8), que tienen influencia positiva en su actividad emulsificante y, por tanto, en su capacidad para la estabilización física de la emulsión. La distribución monomodal inicial permaneció inalterada hasta el final del periodo de almacenamiento con  $D_{4,3}$   $0.263 \pm 0.008 \mu\text{m}$  y  $D_{3,2}$   $0.144 \pm 0.002 \mu\text{m}$ . Además, el tamaño del 90% de las gotas de esa emulsión ( $D_{90}$ ) a día 10 fue de  $0.607 \pm 0.003 \mu\text{m}$ . Mientras que a día 10 los valores de  $D_{90}$  de las emulsiones SPH2 y BPH4 fueron de  $0.782 \pm 0.003 \mu\text{m}$  y  $0.867 \pm 0.050 \mu\text{m}$ , respectivamente. Drapala et al. (2018), obtuvieron tamaños ligeramente mayores para emulsiones estabilizadas por hidrolizados de proteína de lactosuero a la misma concentración de proteína y con buena estabilidad. Los valores más elevados en comparación con esta investigación se deben al mayor contenido en aceite, 10%, de las emulsiones.

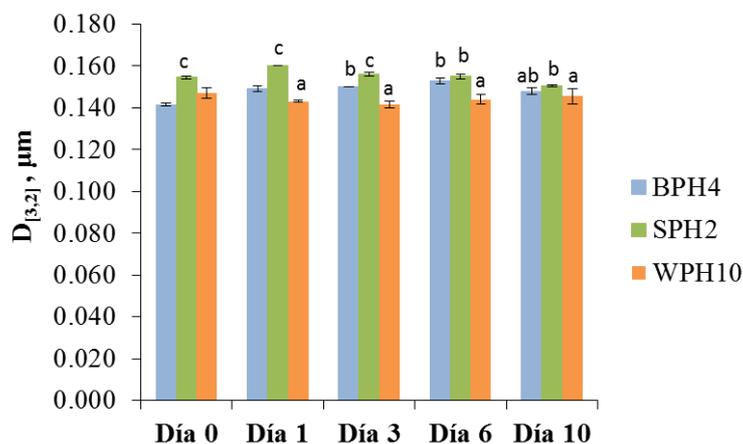


Figura 6.22 Tamaño de partícula  $D_{3,2}$  de las emulsiones estabilizadas con hidrolizado de proteína de bacaladilla (BPH4), hidrolizado de aislado de proteína de soja (SPH2) e hidrolizado de concentrado de proteína de lactosuero (WPH10) durante el periodo de almacenamiento a  $20^\circ\text{C}$ .

### 6.2.3.3. Estabilidad oxidativa de las emulsiones de aceite rico en ácidos grasos Omega-3

La estabilidad oxidativa de las emulsiones de aceite rico en ácidos grasos Omega-3, sometidas a oxidación acelerada durante 10 días a 20°C, se evaluó mediante la determinación del valor de peróxidos (PV) y el análisis de productos secundarios de oxidación mediante la determinación del índice de anisidina (AI) y, su cuantificación e identificación, mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (Dynamic Headspace).

#### 6.2.3.3.1. Determinación del contenido en peróxidos (PV)

La Figura 6.23 muestra la evolución del PV de las emulsiones estabilizadas con WPH10, SPH2 y BPH4 durante el periodo de almacenamiento. El PV inicial de las emulsiones SPH2 y WPH10 fue de 2.3 y 3.3 mmol de O<sub>2</sub>/kg aceite, respectivamente. Estos valores fueron levemente más altos que los valores obtenidos para el aceite refinado (<1 mmol O<sub>2</sub>/kg de aceite). El alto esfuerzo cortante y la incorporación del oxígeno generados durante la producción de la emulsión podrían ser los responsables de la ligera oxidación lipídica observada (Horn et al., 2012). La emulsión BPH4 presentó un PV inicial significativamente mayor, 11.44±0.39 mmol O<sub>2</sub>/kg de aceite. En este caso, además del proceso de emulsificación, también influiría en los valores de PV obtenidos, la oxidación de los lípidos presentes en el hidrolizado. Esto va en consonancia con los resultados obtenidos para emulsiones de aceite de pescado en agua estabilizados con proteínas de pescado como la sardina, con un contenido en lípidos del 2.0±0.1%, y la pintarroja, con un 0.7±0.1%, cuyos PV iniciales fueron de 7.5 meq O<sub>2</sub>/kg y 3.7 meq O<sub>2</sub>/kg, respectivamente (García-Moreno et al., 2016a). Teniendo en cuenta que el contenido en lípidos del hidrolizado de BP (Tabla 6.9) era más elevado que el de sardina y pintarroja, va en consonancia que el PV inicial de esta investigación sea mayor para las emulsiones de BPH4.

La evolución del contenido de peróxidos en las emulsiones durante el periodo de almacenamiento difiere significativamente dependiendo del hidrolizado empleado (Figura 6.23). La emulsión de BPH4 sufrió una oxidación intensa durante los primeros

tres días de almacenamiento. El proceso de oxidación se inició en los lípidos contenidos en el hidrolizado durante el proceso de producción de la emulsión. Esto confirmaría la importancia de tener un hidrolizado libre de grasa para producir emulsiones oxidativamente estables. El pH ácido de la emulsión de BPH4 también podría contribuir a la oxidación debido a la mayor solubilidad del hierro a pH bajos (Berton-Carabin et al., 2014). García-Moreno et al. (2016a), observaron un fuerte incremento en los valores de PV para las emulsiones de aceite de pescado en agua estabilizadas con hidrolizados de proteína de pescado a pH 2. Las diferencias en los valores de PV de este trabajo con bacaladilla y el estudio anterior se deben al proceso de incubación llevado a cabo en los análisis para determinar el PV. Ghelichi et al. (2017), estabilizaron emulsiones de aceite de pescado utilizando citrem como emulsionante e hidrolizado de proteína de carpa como antioxidante. El contenido de grasa del hidrolizado de proteína de carpa era elevado (~11%), sin embargo, el PV de estas emulsiones se mantuvo en valores relativamente bajos durante el almacenamiento. Esto era debido a la baja concentración de hidrolizado empleado en las emulsiones, 2 mg por ml de fase acuosa.

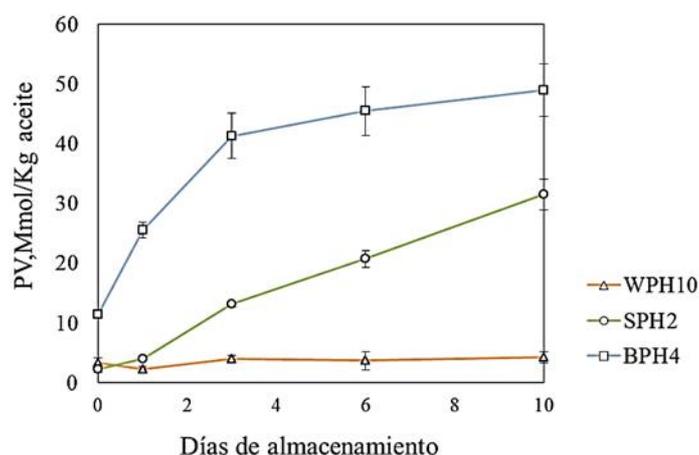


Figura 6.23 Valor de peróxidos (PV) de las emulsiones estabilizadas con hidrolizados de concentrado de proteína de lactosuero (WPH10), aislado de proteína de soja (SPH2) y proteína de bacaladilla (BPH4) durante el periodo de almacenamiento de 10 días a 20°C en oscuridad.

Para las emulsiones estabilizadas con SPH2, se observó que tras el primer día de almacenamiento, el PV aumentó constantemente hasta alcanzar un valor de 31.46 mmol/kg de aceite en el día 10 (Figura 6.23). Se observó una tendencia similar en la evolución de la concentración de compuestos de oxidación primaria en emulsiones de

aceite de colza estabilizada con hidrolizado de proteína de haba (Liu et al., 2019). La Figura 6.23 muestra que el PV más bajo durante el periodo de almacenamiento se obtuvo para la emulsión estabilizada con WPH10. Para esta emulsión, el PV ( $3.49 \pm 0.76$  mmol/kg de aceite) permaneció constante durante 10 días de almacenamiento. Otros autores (Drapala et al., 2018), observaron un aumento significativo en los hidroperóxidos después de 7 días de almacenamiento para emulsiones producidas para una fórmula infantil estabilizadas con un hidrolizado de proteína de lactosuero comercial con DH 10.7%. Estos valores elevados de PV podrían deberse a la alta concentración de sales de hierro utilizadas en la formulación de esas emulsiones,  $8 \mu\text{g/ml}$ , en comparación con los  $0.04 \mu\text{g/ml}$  empleados en este estudio.

#### **6.2.3.3.2. Productos de oxidación secundaria**

El índice de anisidina (AV), como se ha tratado en el capítulo anterior, mide los compuestos de oxidación secundarios, principalmente 2-alquenes y 2, 4-alcadienos y es más sensible a aldehídos insaturados. De manera similar a PV, la emulsión estabilizada con BPH4 presentó un valor de anisidina inicial significativamente más alto que las estabilizadas con WPH10 y SPH2, como se muestra en la Figura 6.24. Esto podría atribuirse a la oxidación previa de los lípidos presentes en el hidrolizado y al pH más bajo de la emulsión de BPH4. Esta emulsión, mostró un aumento constante en el AV durante el periodo de almacenamiento. Esa tendencia es similar al aumento observado en sus valores de PV. Sin embargo, las emulsiones estabilizadas con WPH10 y SPH2 no mostraron un aumento significativo en AV durante los 10 días de almacenamiento.

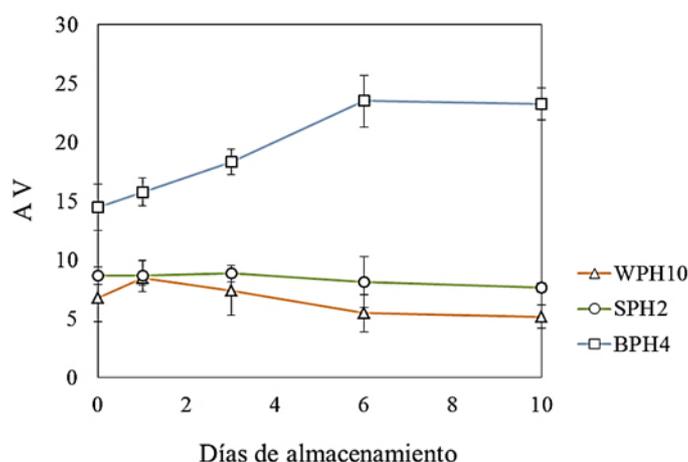


Figura 6.24 Valor de anisidina (AV) de las emulsiones estabilizadas con hidrolizados de concentrado de proteína de lactosuero (WPH10), aislado de proteína de soja (SPH2) y proteína de bacaladilla (BPH4) durante el periodo de almacenamiento de 10 días a 20°C en oscuridad.

Asimismo, los resultados obtenidos en la determinación de productos de oxidación secundaria (volátiles) indicaron que la emulsión estabilizada con BPH4 fue la más oxidada durante el periodo de almacenamiento. Esta emulsión presentó el contenido inicial más alto y el mayor aumento durante el almacenamiento de los siguientes volátiles: 2-etilfurano (Figura 6.25 a), 1-penten-3-ol (Figura 6.25 b), pentanal (Figura 6.25 c), hexanal (Figura 6.25 d), (t, t)-2,4-heptadienal (Figura 6.25 e), 1-penten-3-ona, (t)-2-pentenal, heptanal, (c)-4-heptenal, benzaldehído, octanal, nonanal, (t, t)-2,4-octadieno, (t, c)-2,6-nonadienal (Figura 6.26). Los volátiles 2-etilfurano, 1-penten-3-ona, 1-penten-3-ol, (t)-2-pentenal, (t)-2-hexenal, (t, t)-2,4-heptadienal y (t, c)-2,6-nonadienal derivan de la oxidación de los ácidos grasos Omega-3, lo que sugiere claramente la mayor oxidación de EPA y DHA en la emulsión estabilizada con BPH4. El resto de los volátiles mencionados derivan de la oxidación de Omega-6 y ácidos grasos Omega-9.

La emulsión estabilizada con SPH2 fue la segunda más oxidada, como se observa para pentanal (Figura 6.25 c) y hexanal (Figura 6.25 d). Además, esta emulsión, en comparación con la emulsión estabilizada con BPH4 y WPH10, presentó mayor contenido de los siguientes volátiles: 3-metilbutanal (Figura 6.25 f), 3-metil-1-butanol (Figura 6.25 g), 1-pentanol (Figura 6.25 h), 2-pentilfurano (Figura 6.25 i). Cabe señalar que 3-metil-butanal y 3-metil-1-butanol, son productos terciarios de oxidación de

lípidos formados por la reacción de carbonilos reactivos derivados de lípidos (aldehídos) y grupos amino de los péptidos. De hecho, el aumento en la concentración de estos volátiles a día 6 de almacenamiento (Figura 6.25 f, g) encajan con la disminución observada en pentanal y hexanal después de 6 días (Figura 6.25 c, d). Estos resultados están en consonancia con estudios previos que muestran la presencia de 3-metilbutanal (Sabeena Farvin et al., 2014) y 3-metil-1-butanol (Ghelichi et al., 2017) en emulsiones de aceite de pescado en agua que contienen hidrolizados de proteína de pescado. También 2-pentilfurano está presente en mayor concentración en la emulsión estabilizada con SPH2 en comparación con las estabilizadas con WPH10 y BPH4 (Figura 6.25 i). Sin embargo, aunque 2-pentilfurano se deriva de la oxidación de los ácidos grasos Omega-3, su concentración en la emulsión estabilizada de SPH2 es considerablemente menor en comparación con la concentración de otros volátiles derivados de los ácidos grasos Omega-3, por ejemplo 1-penten-3-ol, en la emulsión estabilizada con BPH4.

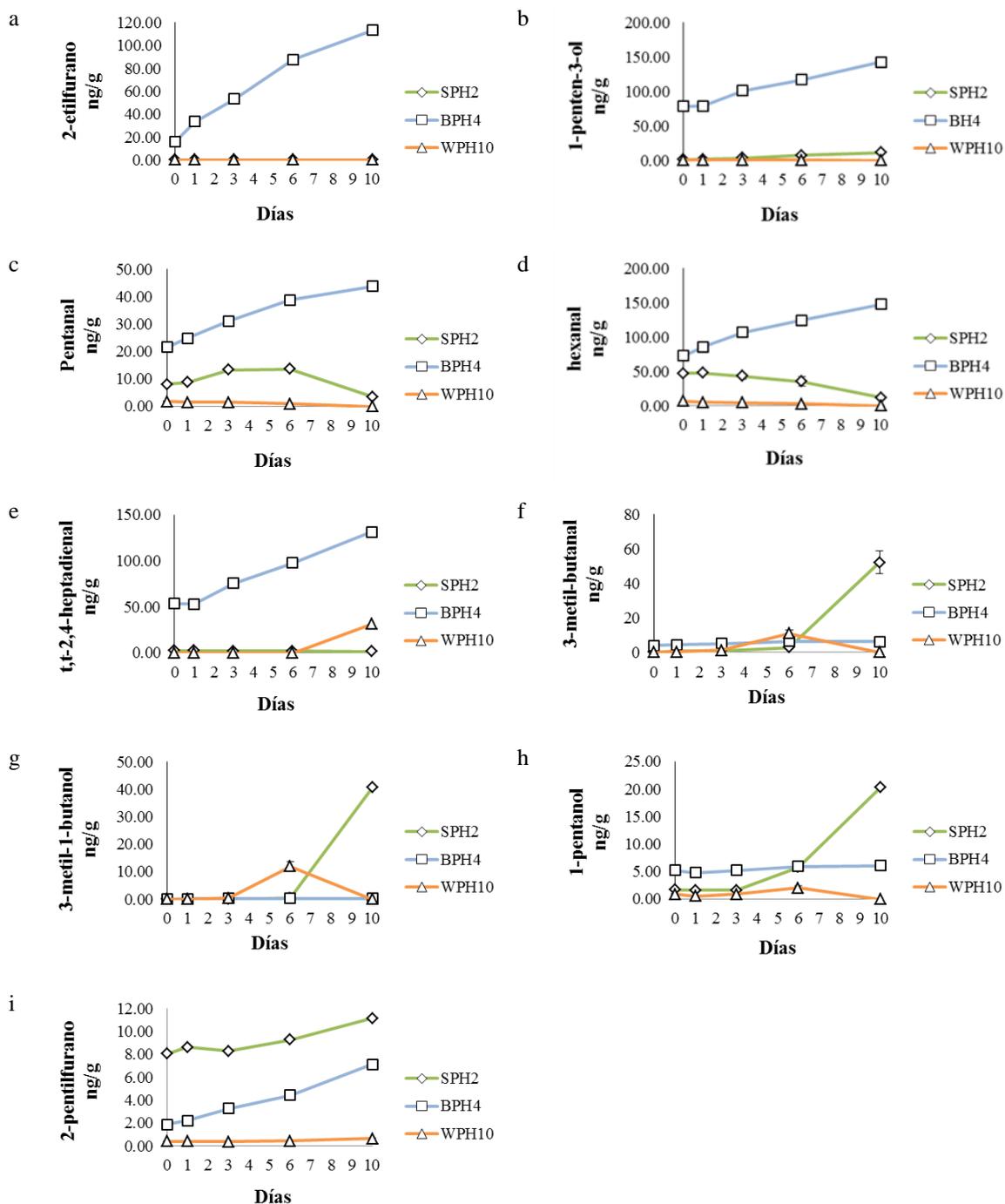


Figura 6.25 Concentración de (a) 2-etilfurano, (b) 1-penten-3-ol, (c) pentanal, (d) hexanal, (e) (t,t) -2,4-heptadienal, (f) 3- metil-butanal, (g) 3-metil-butanol, (h) 1-pentanol, (i), 2-pentilfurano (ng/g<sub>emulsión</sub>) en emulsiones de aceite de agua al 5% de pescado estabilizadas con hidrolizados de proteína de bacaladilla (BPH4), aislado de proteína de soja (SPH2) o concentrado de proteína de lactosuero (WPH10). Almacenamiento de 10 días a 20°C en oscuridad. Los resultados son los valores medios de las mediciones por triplicado  $\pm$  desviaciones estándar.

En conclusión, la emulsión estabilizada con WPH10 fue la más estable oxidativamente.

Esto no puede atribuirse a una actividad antioxidante superior para este hidrolizado

(Tabla 6.10). Además, la emulsión estabilizada con WPH10 tenía un potencial zeta negativo que puede favorecer la atracción de iones metálicos a la interfase donde pueden interactuar con hidroperóxidos y catalizar la oxidación de lípidos. Aun así, la estabilidad oxidativa mejorada de la emulsión estabilizada de WPH10 en comparación con las emulsiones de BPH4 y SPH2, se explica por su mayor estabilidad física (Figura 6.19). Del mismo modo, García-Moreno et al.(2016a) atribuyen la estabilidad oxidativa superior de las emulsiones de aceite de pescado en agua estabilizadas con hidrolizados de proteína de sardina a un efecto de barrera física de la interfase mejorada por la capa de proteína ubicada en ella. Esto se correlaciona bien con el mayor contenido de péptidos más grandes de WPH10 (Figura 6.18), que pueden adsorberse mejor y desplegarse en la interfase reduciendo la difusión de prooxidantes y proporcionando estabilidad física y oxidativa a la emulsión.

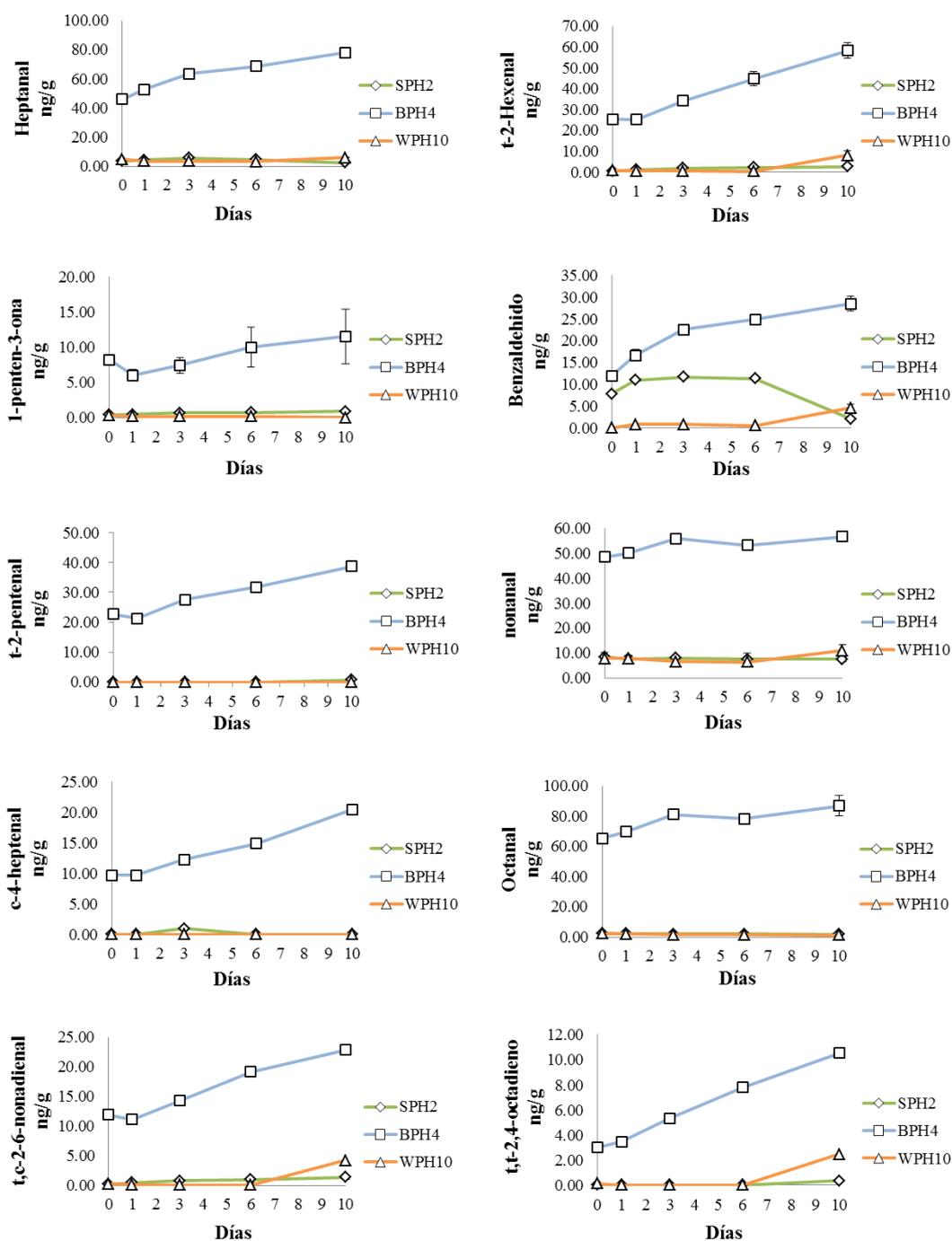


Figura 6.26 Concentración de heptanal, t-2-hexenal, 1-penten-3-one, benzaldehído, t-2-pentenal, nonanal, c-4-heptenal, octanal, t,c-2,6-nonadienal y t,t-2,4-octadieno ( $\text{ng/g}_{\text{emulsión}}$ ) en emulsiones de aceite de pescado en agua al 5% estabilizadas con hidrolizados de proteína de bacaladilla (BPH), soja (SPH) o proteína de suero (WPH). Almacenamiento de 10 días a  $20^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad. Los resultados son los valores medios de las mediciones por triplicado  $\pm$  desviaciones estándar.

#### 6.2.4. Conclusiones

Los hidrolizados de proteínas alimentarias obtenidos de fuentes sostenibles son una alternativa adecuada para estabilizar aceites ricos en ácidos grasos Omega-3 para su incorporación en matrices alimentarias. Los hidrolizados BPH4, SPH2 y WPH10 exhiben buena capacidad antioxidante. No obstante, los resultados reflejan que la estabilidad física de las emulsiones juega un papel importante en su estabilidad oxidativa. WPH10 fue el hidrolizado que presentó mejor comportamiento al lograr tamaños de partícula más pequeños y mantener la distribución monomodal durante el tiempo de almacenamiento de 10 días a 20°C. La evolución del contenido de peróxidos en las emulsiones durante el periodo de almacenamiento varió significativamente dependiendo del hidrolizado empleado. La emulsión de BPH4 sufrió una oxidación intensa en primeros días de almacenamiento reflejada en el incremento del PV, mientras que en la emulsión estabilizada con SPH2 el aumento fue más leve y constante a lo largo del tiempo de almacenamiento. La emulsión estabilizada con WPH10 presentó los valores de peróxidos más bajos y se mantuvo constante durante todo el periodo de almacenamiento. En los productos de oxidación secundarios se confirmó que la emulsión BPH4 es la más oxidada seguida de SPH2 y WPH10. Así, la estabilidad física y oxidativa de las emulsiones varía según  $BPH4 < SPH2 < WPH10$ .

Por tanto, de los tres hidrolizados estudiados, el hidrolizado WPH10 es el mejor candidato para estabilizar emulsiones de aceites ricos en ácidos grasos Omega-3. Aunque, SPH2 también tiene potencial para estabilizar este tipo de emulsiones. El hidrolizado SPH2 puede ser adecuado pero para estabilizar emulsiones utilizadas en microencapsulación de aceites ricos en ácidos grasos Omega-3, donde el tiempo de almacenamiento es limitado. Sin embargo, se necesitarían más estudios para mejorar la estabilidad física y oxidativa de emulsiones de aceites ricos en ácidos grasos Omega-3 estabilizadas con BPH4. Sería interesante un pretratamiento del hidrolizado para desgrasarlo y eliminar el contenido lipídico que puede influir en la oxidación prematura de las emulsiones.

Por tanto, el hidrolizado WPH10 se ha elegido para el siguiente estudio en el que se evaluarán distintas cargas de aceite/hidrolizado en el proceso de secado por atomización

para microencapsular emulsiones de aceite de pescado en agua para su incorporación a matrices alimentarias.

## **6.3. Microencapsulación de emulsiones de aceites ricos en ácidos grasos Omega-3 estabilizadas con hidrolizados de proteínas alimentarias mediante secado por atomización**

### **6.3.1. Objetivos y tareas**

El objetivo de este capítulo es evaluar el efecto del hidrolizado de proteína de lactosuero a DH 10% con subtilisina (WPH10) y la influencia de la concentración de aceite rico en ácidos grasos Omega-3, en la estabilidad física y oxidativa de microencapsulados producidos mediante secado por atomización. El hidrolizado WPH10 se seleccionó en la sección anterior por su mayor capacidad para estabilizar física y oxidativamente emulsiones de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 en comparación con los hidrolizados SPH2 y BPH4.

En este estudio se producen doce microencapsulados diferentes que se caracterizan física y oxidativamente para evaluar el efecto de la concentración de aceite y de diferentes ratios de aceite/hidrolizado WPH10, es decir, aceite/emulsificante-antioxidante. Posteriormente, se evalúa la estabilidad oxidativa de los microencapsulados con más carga de aceite por ser los casos más desfavorables oxidativamente.

### **6.3.2. Procedimiento experimental**

En primer lugar, se microencapsularon emulsiones de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 en agua a distintas cargas de aceite/WPH10. Posteriormente, se caracterizaron los microencapsulados mediante la determinación del contenido de humedad y actividad de agua. Se estudió la estabilidad oxidativa mediante la determinación del PV.

#### **6.3.2.1. Producción de microencapsulados**

Se microencapsularon emulsiones de aceite de pescado en agua a distintas cargas de aceite/WPH10. En estos ensayos se fue aumentando progresivamente el ratio aceite/WPH10 y se mantuvo constante el porcentaje de encapsulante (28%) (Morales-Medina et al., 2016) (Tabla 6.10). Como agente encapsulante para microencapsular las

emulsiones de aceite de pescado en agua, se ha empleado jarabe de glucosa DE 38 C\*Dry 1934 procedente de Cargill GmbH (Krefeld, Alemania). Se tuvo en cuenta que la cantidad de sólidos no excediera de un máximo para la correcta disolución de los componentes de la fase acuosa y posterior formación de la emulsión. Para reducir el tamaño de partícula y lograr una mejor estabilidad de las microcápsulas, es recomendable una cantidad de sólidos totales entorno al 30-45% en la emulsión antes del secado (Drusch et al., 2007; Gomes and Kurozawa, 2020; Keogh et al., 2001).

Tabla 6.11 Composición de las emulsiones de aceite de pescado rico en ácidos grasos Omega-3 a microencapsular.

Emulsión de partida	Relación Aceite/WPH10	Aceite, %	WPH10, %	Encapsulante, %	Sólidos, %
R4-2/0.5	4	2	0.5	28	32
R4-4/1		4	1	28	35
R4-8/2		8	2	28	42
R6-3/0.5	6	3	0.5	28	33
R6-6/1		6	1	28	37
R6-12/2		12	2	28	46
R8-4/0.5	8	4	0.5	28	34
R8-8/1		8	1	28	39
R8-16/2		16	2	28	50

Para la producción de las emulsiones de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 para microencapsular, la fase acuosa se preparó disolviendo el agente encapsulante en la solución de hidrolizado preparada según las concentraciones de la Tabla 6.11.

El pH se ajustó a 8 para todas las emulsiones de partida mediante la adición de soluciones de HCl 1M y NaOH 1M. En primer lugar, la preemulsión se realizó agitando en Ultra Turrax (IKA Werke GmbH & .Co., Staufen, Alemania) a 16000 rpm durante 2 minutos y se añadió el aceite de pescado durante el primer minuto (Figura 5.2). Después, la homogeneización se realizó en un homogeneizador de alta presión (Panda Plus 2000, GEA Niro Soavi, Lübeck, Alemania) a 450/75 bar en tres ciclos (Figura 5.3).

La producción de las microcápsulas se llevó a cabo mediante secado por atomización en el secadero de laboratorio Büchi B-190 Spray Dryer de Büchi Labortechnik (Flawill, Suiza). Los secados se realizaron según el protocolo descrito en el Apartado 5.2.6.

### **6.3.2.2. Caracterización de los microencapsulados**

Los microencapsulados se caracterizaron mediante la determinación del contenido de humedad y actividad de agua descritos en los Apartados 5.2.7.1. y 5.2.7.2. También, se determinó la eficiencia de encapsulación y grasa superficial, para evaluar el rendimiento del proceso, y la distribución del tamaño de partícula de los microencapsulados reconstituidos mediante los procedimientos descritos en el Apartado 5.2.7.3. y en el Apartado 5.2.7.4. respectivamente.

Para completar la caracterización de los microencapsulados, se determinó el índice de peróxidos inmediatamente después de la formación de las cápsulas (PV inicial) para tener una referencia inicial del impacto del proceso de secado en la oxidación del aceite microencapsulado. La determinación del PV inicial (PVi) de los microencapsulados se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el Apartado 5.2.8.

### **6.3.2.3. Estabilidad oxidativa**

Para el desarrollo de productos alimentarios enriquecidos en ácidos grasos Omega-3 mediante la incorporación de microcápsulas de aceite de pescado, se pretende lograr que el contenido en aceite de las cápsulas sea elevado. Sin embargo, a nivel oxidativo puede presentar un inconveniente una elevada concentración de aceite. Así, se determinó el contenido de peróxidos de las microcápsulas durante un periodo de 6 semanas en oscuridad a una temperatura de almacenamiento de 25°C. De este modo, se pueden obtener resultados que reflejen el comportamiento oxidativo de los microencapsulados, su vida útil y la viabilidad para su incorporación a alimentos. El valor de peróxidos se determinó en las semanas 0, 2, 4 y 6 de almacenamiento según el procedimiento descrito en el Apartado 5.2.8.

### **6.3.3. Resultados y discusión**

Se evaluó el efecto del hidrolizado WPH10 y la influencia de la concentración de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 en la estabilidad física y oxidativa de los microencapsulados producidos mediante secado por atomización.

### 6.3.3.1. Caracterización de los microencapsulados

Los microencapsulados de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 estabilizados con el hidrolizado WPH10 se caracterizaron mediante la determinación de su contenido en humedad, actividad del agua, eficiencia de encapsulación y grasa superficial, el análisis del tamaño de partícula, además del contenido de peróxidos del aceite tras el proceso de secado por atomización.

#### 6.3.3.1.1. Contenido en humedad y actividad de agua

El contenido en humedad y los valores de actividad de agua de los microencapsulados se muestran en la Tabla 6.12.

Tabla 6.12 Contenido en humedad (%) de los microencapsulados. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los microencapsulados con la misma relación Aceite/Emulsificante en emulsión. La nomenclatura de los encapsulados corresponde con la de su emulsión de partida.

Microencapsulados	Humedad, %	$a_w$
R4-2/0.5	$2.3 \pm 0.0^b$	$0.172 \pm 0.000^b$
R4-4/1	$1.2 \pm 0.1^a$	$0.157 \pm 0.002^a$
R4-8/2	$4.0 \pm 0.4^c$	$0.230 \pm 0.001^c$
R6-3/0.5	$1.0 \pm 0.0^a$	$0.159 \pm 0.001^a$
R6-6/1	$2.0 \pm 0.0^b$	$0.183 \pm 0.003^b$
R6-12/2	$3.8 \pm 0.2^c$	$0.177 \pm 0.001^b$
R8-4/0.5	$2.4 \pm 0.0^a$	$0.128 \pm 0.002^a$
R8-8/1	$3.3 \pm 0.4^b$	$0.150 \pm 0.000^b$
R8-16/2	$2.4 \pm 0.1^a$	$0.176 \pm 0.000^c$

El contenido de humedad es una propiedad de las microcápsulas relacionada con su estabilidad y con la eficiencia del secado. La disminución en el contenido de humedad que tiene lugar durante la encapsulación tiene un efecto protector contra la oxidación de los lípidos debido a la reducción de la movilidad molecular (Vaucher et al., 2019). Un alto contenido en humedad tiende a aglomerar el polvo seco, induce el crecimiento microbiano y la oxidación de lípidos (Chang and Nickerson, 2018). Los niveles de humedad están controlados por las características de los encapsulantes, como el jarabe de glucosa en este caso, que reduce significativamente el contenido en humedad durante el secado (Takeungwongtrakul et al., 2015). Los valores de humedad (%) de las microcápsulas con más carga de aceite (R4-8/2, R6-12/2, R8-16/2), hacen previsible su

estabilidad microbiológica además de retardar la oxidación lipídica (Tabla 6.12), ya que, el contenido de humedad deseado para polvos secos estables en la industria alimentaria es aproximadamente del 3 al 4% (Chang and Nickerson, 2018). El porcentaje de humedad medio de los microencapsulados fue de  $2.48 \pm 0.62\%$ . En estudios con microencapsulados de aceite de pescado similares y producidos mediante secado por atomización, el contenido en humedad inicial de las cápsulas era inferior ( $1.49 \pm 0.02\%$ ) (Drusch et al., 2006). Esto se debe a las condiciones diferentes de secado y tipo de atomizador utilizado. Sin embargo, en microcápsulas de aceite de coco preparadas con maltodextrinas, caseinato de sodio, WPC y lecitina y con un atomizador de similares características y a temperaturas de secado similares a las de este estudio, tenían un contenido de humedad de  $2.54 \pm 0.45\%$  (Hee et al., 2015), valor muy similar también al de esta investigación.

Al igual que el contenido en humedad, la actividad del agua ( $a_w$ ) de las microcápsulas puede afectar al deterioro microbiano y a la oxidación lipídica determinando la vida útil de un producto alimentario. Cuando  $a_w$  presenta valores entre 0.2 y 0.3 la degradación oxidativa está limitada (Chang and Nickerson, 2018), ya que, se consigue el retraso en la descomposición de hidroperóxidos (Velasco et al., 2003). Los valores de  $a_w$  obtenidos son aceptables al oscilar entre  $0.128 \pm 0.002$  y  $0.230 \pm 0.001$  (Tabla 6.12).

#### **6.3.3.1.2. Análisis del tamaño de emulsión reconstituida**

La distribución del tamaño de las emulsiones reconstituidas está relacionada con la humectabilidad y dispersibilidad, características importantes para la incorporación de microencapsulados a alimentos (Gomes and Kurozawa, 2020). Además, la eficiencia de la microencapsulación depende del tamaño de las gotas de aceite en las emulsiones previas y de su estabilidad física durante el secado y la formación de partículas (Serfert et al., 2013).

Tabla 6.13 Tamaño de gota de las emulsiones para microencapsular y de las emulsiones reconstituidas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras con la misma relación Aceite/WPH10. Números diferentes indican diferencias significativas entre muestras con la misma proporción de WPH10.

Microencapsulados	Emulsión de partida $D_{0,9}$ , $\mu\text{m}$	Emulsión reconstituida $D_{0,9}$ , $\mu\text{m}$
R4-2/0.5	$0.667 \pm 0.001^{b,1,2}$	$0.750 \pm 0.001^{a,1}$
R4-4/1	$0.683 \pm 0.001^{b,1}$	$0.887 \pm 0.003^{c,1}$
R4-8/2	$0.632 \pm 0.013^{a,1}$	$0.856 \pm 0.016^{b,1}$
R6-3/0.5	$0.642 \pm 0.018^{a,1}$	$0.818 \pm 0.001^{a,2}$
R6-6/1	$0.878 \pm 0.001^{b,2}$	$1.040 \pm 0.022^{b,1}$
R6-12/2	$0.903 \pm 0.012^{b,2}$	$1.292 \pm 0.091^{c,1}$
R8-4/0.5	$0.701 \pm 0.007^{a,2}$	$1.002 \pm 0.028^{a,3}$
R8-8/1	$1.457 \pm 0.017^{b,3}$	$1.870 \pm 0.122^{b,2}$
R8-16/2	$2.000 \pm 0.280^{c,3}$	$1.954 \pm 0.240^{b,2}$

Las emulsiones a microencapsular presentaron valores del percentil 90 de tamaño de gota ( $D_{90}$ ) menores o iguales a  $2 \mu\text{m}$  que aseguran suficiente estabilidad para el proceso de secado por atomización (Tamm et al., 2015) (Tabla 6.13). A medida que aumentaba la relación aceite/WPH10 y la concentración de aceite el  $D_{90}$  se incrementaba. Para las emulsiones reconstituidas (Tabla 6.13) se observó un aumento significativo en el tamaño que indica cierta coalescencia del aceite no encapsulado después de reconstituir la emulsión (Drusch et al., 2007; Soottitantawat et al., 2003).

En la Tabla 6.14, se muestran los valores de  $D_{4,3}$  y  $D_{3,2}$  de los microencapsulados. En general, se observó que a mayores concentraciones de aceite se obtuvieron diámetros mayores en las emulsiones reconstituidas (Tabla 6.13, Tabla 6.14). La Figura 6.27 a) muestra esta tendencia de manera más clara con los valores del diámetro medio en volumen ( $D_{4,3}$ ) en función de la carga de aceite en la emulsión reconstituida para cada ratio aceite/WPH10. En ella, se aprecia el aumento del tamaño con el incremento del ratio aceite/WPH10 y con la carga de aceite. Otros estudios también encontraron la misma tendencia al incremento en el tamaño de gota con el aumento del contenido de aceite procedente de algas, aceite de linaza, aceite de pescado y de oliva virgen extra, debido a la mayor coalescencia del aceite en los microencapsulados tras el secado (Bajaj et al., 2017; Polavarapu et al., 2011; Tonon et al., 2011; Zhang et al., 2020).

Por otro lado, la Figura 6.27 b) muestra los valores del diámetro medio en volumen ( $D_{4,3}$ ) en función de la carga de WPH10 en la emulsión reconstituida para cada ratio aceite/WPH10. Se observa la misma tendencia a un incremento en el tamaño conforme aumenta el ratio aceite/WPH10. Sin embargo, en los ratios aceite/WPH10 iguales a 4 y 6 se aprecia una estabilización del tamaño de gota en las emulsiones reconstituidas R4-8/2 y R6-12/2 con mayor carga de hidrolizado WPH10 (2%) (Figura 6.27, Tabla 6.14). Esto indica la influencia positiva del aumento de la concentración del hidrolizado de proteína en el tamaño de gota conforme aumenta la concentración de aceite en un rango determinado. Por tanto, para un rango de concentración de aceite de 2-8% en la emulsión reconstituida, aumentando la concentración del hidrolizado WPH10, se puede contribuir a la disminución del tamaño de gota lo que beneficiaría la estabilidad física de los microencapsulados. Esta misma tendencia a la estabilidad con el aumento de la concentración de hidrolizado de proteínas alimentarias, también se refleja en un estudio en emulsiones de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 para microencapsular, estabilizadas con hidrolizados de sardina y jurel con una variación de la concentración de proteína hidrolizada de 0.5 al 2% (Morales-Medina et al., 2016).

Tabla 6.14 Tamaño de gota en  $D_{4,3}$  y  $D_{3,2}$  de las emulsiones reconstituidas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras con la misma relación Aceite/WPH10. Números diferentes indican diferencias significativas entre muestras con la misma proporción de WPH10.

Microencapsulados	Emulsión reconstituida $D_{4,3}$ , $\mu\text{m}$	Emulsión reconstituida $D_{3,2}$ , $\mu\text{m}$
R4-2/0.5	$0.345 \pm 0.001^{a,1}$	$0.154 \pm 0.001^{a,1}$
R4-4/1	$0.430 \pm 0.018^{b,1}$	$0.170 \pm 0.001^{b,1}$
R4-8/2	$0.346 \pm 0.007^{a,1}$	$0.159 \pm 0.003^{a,1}$
R6-3/0.5	$0.402 \pm 0.001^{a,2}$	$0.164 \pm 0.001^{a,1}$
R6-6/1	$0.514 \pm 0.020^{b,1}$	$0.199 \pm 0.008^{a,12}$
R6-12/2	$0.497 \pm 0.043^{b,1}$	$0.196 \pm 0.021^{a,12}$
R8-4/0.5	$0.487 \pm 0.011^{a,3}$	$0.180 \pm 0.006^{a,2}$
R8-8/1	$0.695 \pm 0.069^{ab,2}$	$0.223 \pm 0.024^{a,2}$
R8-16/2	$0.759 \pm 0.095^{b,2}$	$0.261 \pm 0.045^{a,1}$

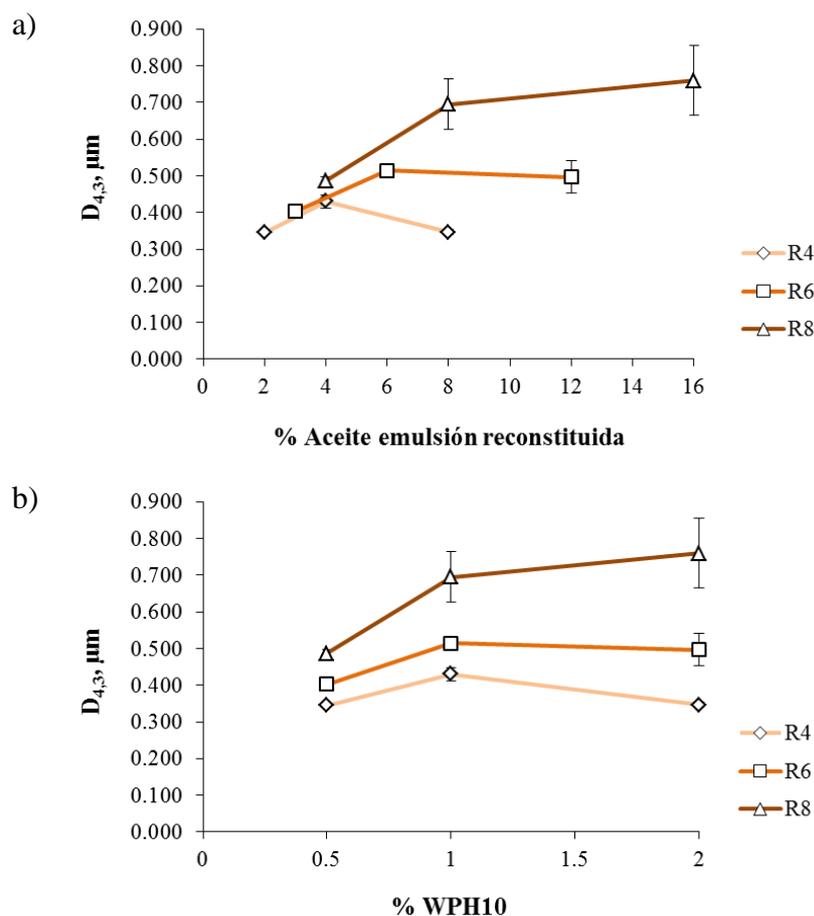


Figura 6.27 Diámetro de gota en volumen  $D_{4,3}$  en las emulsiones reconstituidas en función de: a) la carga de aceite y b) la carga de WPH10 para cada ratio (R) Aceite/WPH10: R4, R6 y R8.

### 6.3.3.1.3. Eficiencia de encapsulación y grasa superficial

La Tabla 6.15 muestra los valores de eficiencia de encapsulación (EE) y grasa superficial (GS) de los microencapsulados. En general, se consiguieron buenos resultados de eficiencia de encapsulación y en consecuencia, bajos contenidos de grasa superficial. Sólo para los microencapsulados R6-12/2, con concentración de aceite del 26% y R8-16/2, con el 32% de aceite, el valor de EE fue inferior al 90% (Tabla 6.15). Esto se atribuye a varios factores como una proporción insuficiente de encapsulante en los microencapsulados con las cargas más elevadas de aceite, que no puede formar una pared densa y compacta alrededor del aceite en emulsión (Zhang et al., 2020). También la aglomeración y compresión de gotas de mayor tamaño al aumentar la concentración de aceite y el tiempo de microencapsulación altera su estructura y morfología y provoca una liberación del aceite (Bae and Lee, 2008). Del mismo modo, ocurre en un estudio con microencapsulados mediante secado por atomización de aceites procedentes de

algas, que mostraron que las microcápsulas con un contenido de aceite del 33.3% tenían una EE mayor que las microcápsulas con un contenido de aceite del 50% (Zhang et al., 2020). También otros autores comprobaron con microencapsulados de aceite de linaza empleando proteínas de legumbres que el contenido de aceite fue un factor determinante que afectó a la EE. La EE disminuyó significativamente a concentraciones de aceite más elevadas (Avramenko et al., 2016; Karaca et al., 2013).

Tabla 6.15 Eficiencia de encapsulación (EE) y grasa superficial (GS) de los microencapsulados. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras con la misma relación Aceite/Emulsificante.

Microencapsulados	EE, %	GS, %
R4-2/0.5	96.63 ± 0.12 <sup>b,2</sup>	3.37 ± 0.12 <sup>b,2</sup>
R4-4/1	98.02 ± 0.07 <sup>c,3</sup>	1.98 ± 0.07 <sup>c,3</sup>
R4-8/2	93.75 ± 0.10 <sup>a,3</sup>	6.25 ± 0.10 <sup>a,3</sup>
R6-3/0.5	96.82 ± 0.05 <sup>c,2</sup>	3.18 ± 0.05 <sup>c,2</sup>
R6-6/1	93.41 ± 0.03 <sup>b,1</sup>	6.59 ± 0.03 <sup>b,1</sup>
R6-12/2	85.36 ± 0.20 <sup>a,2</sup>	14.64 ± 0.20 <sup>a,2</sup>
R8-4/0.5	94.83 ± 0.15 <sup>c,1</sup>	5.17 ± 0.15 <sup>c,1</sup>
R8-8/1	94.25 ± 0.07 <sup>b,2</sup>	5.75 ± 0.07 <sup>b,2</sup>
R8-16/2	76.55 ± 0.23 <sup>a,1</sup>	23.45 ± 0.23 <sup>a,1</sup>

Atendiendo al tamaño de gota, se ha comprobado en el apartado anterior, que los microencapsulados con mayor contenido de aceite también presentaban diámetros más grandes y su EE es menor. El efecto general del tamaño de gota de la emulsión sobre la eficiencia de la encapsulación puede deberse a dos fenómenos competitivos (Jafari et al., 2007). Por un lado, las gotas más grandes tienen un área superficial total más reducida para la retención de aceite, lo que daría como resultado una mejor eficiencia de encapsulación (Gomes and Kurozawa, 2020). Pero por otro lado, cuanto mayor sea el tiempo necesario para la formación de la película alrededor de las gotas durante el proceso de secado, mayor será la pérdida de aceite a encapsular y mayor será el contenido de aceite de la superficie (Gomes and Kurozawa, 2020; Jafari et al., 2007).

La muestra que presentó mejor EE fue la del microencapsulado R4-4/1 (98.02±0.07 %) con un contenido en aceite en la emulsión reconstituida del 4% y un 1% de WPH10. Rusli et al. (2006), también utilizaron en emulsiones a microencapsular una proporción de aislado de proteína de lactosuero del 1% y similar de aceite de pescado (4.5%) con

jarabe de glucosa (DE 28-30) como encapsulante pero lograron eficiencias de encapsulación menores, 81-86%. Varios autores han observado que un aumento en el valor de DE (dextrosa equivalente) de los encapsulantes se correlaciona positivamente con un aumento en la eficiencia de la microencapsulación (Danviriyakul et al., 2002; Drusch et al., 2012; Hogan et al., 2001). En esta investigación se seleccionó el jarabe de glucosa con DE 38. Puede resultar entonces, que oligosacáridos más pequeños, DE 38, producen cápsulas menos porosas y más uniformes en comparación con encapsulantes con menor grado de DE 28-30 (Hogan et al., 2001; Tamm et al., 2015, 2016a). También, la proteína hidrolizada, además de intervenir en la correcta emulsificación y como barrera antioxidante, colabora con el encapsulante en la retención del aceite reduciendo el tiempo para formar una pared semipermeable en la interfase aceite-aire durante el secado (Jafari et al., 2008). Los hidrolizados de proteínas se adsorben eficientemente en la superficie de la gota de aceite lo que dificulta su difusión a la superficie de la partícula durante el secado por atomización (Nesterenko et al., 2012).

Las altas eficiencias de microencapsulación obtenidas incluso en las emulsiones encapsuladas con mayor carga de aceite favorecerán su estabilidad oxidativa. El aceite que queda no encapsulado es propenso a la oxidación, de modo que, cuanto menos aceite superficial quede en las microcápsulas más disminuirá el riesgo de difusión de la oxidación lipídica (Drusch and Berg, 2008).

#### **6.3.3.1.4. Contenido de peróxidos del aceite de rico en ácidos grasos Omega-3 microencapsulado**

Como se muestra en la Tabla 6.16, el contenido de peróxidos tras el proceso de microencapsulación refleja que el procedimiento de secado dio lugar a una ligera degradación oxidativa. La principal desventaja de la microencapsulación por secado por atomización es la temperatura elevada necesaria, que puede conducir a la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (Kolanowski et al., 2006). Además, como se trató en la sección anterior, el proceso de producción de las emulsiones a microencapsular, que puede suponer la incorporación de oxígeno y la generación de esfuerzos cortantes durante la homogeneización, es responsable de la ligera oxidación lipídica observada. En otros trabajos de investigación con microencapsulados de aceite de pescado también se ha observado esta tendencia (Heinzelmann et al., 2000; Kolanowski et al., 2006; Morales-Medina et al., 2016; Özyurt and Durmu, 2020; Vaucher et al., 2019; Zhang et

al., 2015). También Gharsallaoui et al. (2010), observaron cierta floculación en emulsiones estabilizadas con proteína de guisante utilizando como encapsulante maltodextrina y este fenómeno puede ocurrir durante el proceso de secado cuando aumenta el contenido en sólidos totales. La proximidad de las gotas de aceite por la formación de flóculos en las emulsiones reconstituidas puede facilitar las interacciones entre las gotas y promover la oxidación lipídica (Serfert et al., 2013).

Tabla 6.16 Valor inicial de peróxidos en los microencapsulados. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras con la misma relación Aceite/Emulsificante. Números diferentes indican diferencias significativas entre muestras con la misma proporción de WPH10.

Microencapsulados	PVi, Mmol/Kg aceite
R4-2/0.5	5.77 ± 0.88 <sup>a,2</sup>
R4-4/1	6.91 ± 0.25 <sup>b,2</sup>
R4-8/2	7.75 ± 0.47 <sup>c,1</sup>
R6-3/0.5	2.84 ± 0.50 <sup>a,1</sup>
R6-6/1	5.84 ± 0.76 <sup>b,1</sup>
R6-12/2	7.37 ± 2.40 <sup>b,1</sup>
R8-4/0.5	2.10 ± 0.51 <sup>a,1</sup>
R8-8/1	6.16 ± 0.91 <sup>b,1,2</sup>
R8-16/2	6.70 ± 1.53 <sup>b,1</sup>

El aceite de partida contenía un PV inferior a 1 mmol O<sub>2</sub>/kg de aceite y los valores iniciales de los microencapsulados oscilaron en un rango entre 2.10±0.51 y 7.75±0.47 mmol O<sub>2</sub>/kg de aceite en función de la cantidad de aceite microencapsulado y el contenido de WPH10 (Tabla 6.16). La emulsión reconstituida menos oxidada fue la que contenía un 4% de aceite y 0.5% de WPH10. Tamm et al. (2016a), también obtuvieron buenos valores de peróxidos tras el secado ( $\leq 3.5$  mmol O<sub>2</sub>/kg de aceite) en las emulsiones microencapsuladas de aceite de pescado estabilizadas con  $\beta$ -lactoglobulina y  $\beta$ -lactoglobulina hidrolizada a DH 6% (10% de aceite y 0.5% de proteína). Los mejores valores que los obtenidos en esta investigación se deben a que las eficiencias de encapsulación que obtuvieron eran mejores (97.3-99.7%), a pesar de la concentración de aceite más elevada. Otros estudios también obtuvieron buenos resultados en estabilidad oxidativa tras el secado por atomización con proteínas derivadas de lactosuero (Serfert et al., 2013; Tamm et al., 2015, 2016b). La acumulación superficial de proteínas en la interfase aire-agua conduce a una composición superficial modificada que resulta

beneficiosa contra la oxidación lipídica (Drusch et al., 2012). Aunque un exceso de proteína puede ser perjudicial en microcápsulas producidas mediante secado por atomización. Ya que, la cubierta encapsulante puede formarse muy rápidamente, esto hace que se aumente la resistencia a la evaporación, lo que puede resultar en un aumento rápido de la temperatura de las partículas durante el secado y que se prolongue la exposición del aceite no encapsulado a alta temperatura, con el consecuente aumento de peróxidos en los microencapsulados (Drusch et al., 2012; Tonon et al., 2011). Por tanto, deben tenerse en cuenta las características interfaciales y, en consecuencia, las proporciones de aceite y proteína para mantener la estructura de la emulsión durante todo el proceso de secado (Drusch et al., 2012).

### 6.3.3.2. Estabilidad oxidativa de los microencapsulados

En los procesos de microencapsulación de aceites con propiedades bioactivas como el caso de los ácidos grasos Omega-3, es interesante lograr encapsular la mayor cantidad de aceite para enriquecer lo máximo posible las matrices alimentarias a las que se incorporan. Por este motivo, dado que las eficiencias de microencapsulación y los valores de peróxidos iniciales de los microencapsulados con más carga de aceite (R4-8/2, R6-12/2, R8-16/2) eran adecuadas (Tabla 6.17), se propuso evaluar su contenido de peróxidos durante un periodo de 6 semanas en oscuridad a una temperatura de almacenamiento de 25°C. Estas emulsiones, son el caso más desfavorable por su mayor contenido en aceite que las hace más propensas a la oxidación. De este modo, se pueden obtener resultados que reflejen el comportamiento oxidativo de los microencapsulados y su vida útil, así como de su viabilidad para su incorporación a alimentos.

Tabla 6.17 Valor de peróxidos inicial (PVi) y eficiencia de encapsulación (EE) de los microencapsulados con mayor carga de aceite.

Microencapsulados	% Aceite en microcápsulas	PVi, Mmol/Kg aceite	EE, %
R4-8:2	19	7.75 ± 0.47 <sup>a</sup>	93.75 ± 0.10 <sup>c</sup>
R6-12:2	26	7.37 ± 2.40 <sup>a</sup>	85.36 ± 0.20 <sup>b</sup>
R8-16:2	32	6.70 ± 1.53 <sup>a</sup>	76.55 ± 0.23 <sup>a</sup>

En los valores iniciales de peróxidos (PVi) no existen diferencias significativas entre los tres encapsulados (R4-8/2, R6-12/2, R8-16/2), de modo que parten de la misma

oxidación inicial tras el proceso de secado. Las diferencias en las eficiencias de encapsulación si son significativas (Tabla 6.17).

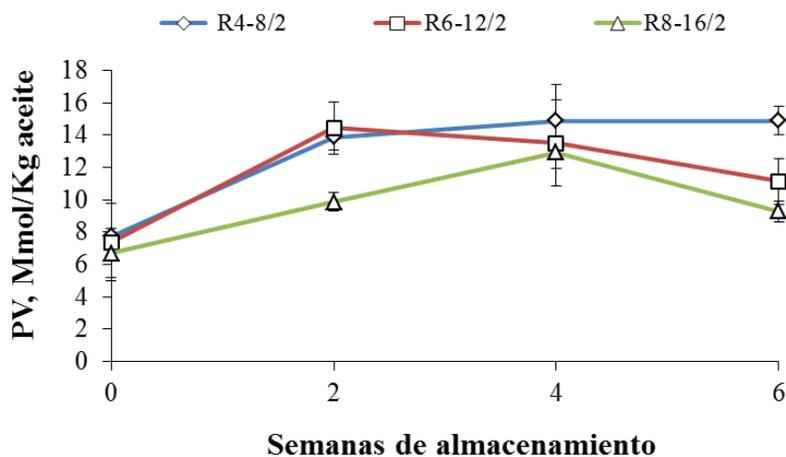


Figura 6.28 Evolución del valor de peróxidos (PV) de los microencapsulados con más carga de aceite en la emulsión reconstituida (R4-8/2, R6-12/2, R8-16/2) durante seis semanas de almacenamiento en oscuridad y a 25°C.

La Figura 6.28 muestra la evolución del valor de peróxidos (PV) de los microencapsulados con más concentración de aceite en la emulsión reconstituida (8%, 12%, 16%) durante las 6 semanas de almacenamiento en oscuridad y a 25°C. En las dos primeras semanas de almacenamiento, se aprecia el mayor incremento en el PV en los tres microencapsulados y, a partir de la segunda semana se produce una ligera estabilización hasta la sexta semana. En los microencapsulados R6-12/2 e R8-16/2 se refleja una ligera disminución en PV con respecto a la tendencia del microencapsulado R4-8/2. Esta disminución implica que la tasa de descomposición de peróxidos en productos de oxidación secundarios en R6-12/2 e R8-16/2 era mayor que su tasa de formación (García-Moreno et al., 2016a). De este modo, tiene sentido que los microencapsulados con menor eficiencia de encapsulación y más carga de aceite (R6-12/2 e R8-16/2) presenten una estabilidad oxidativa inferior al microencapsulado R4-8/2, con menor contenido en aceite en su formulación y menor proporción de aceite superficial, es decir aceite no encapsulado, 8% aceite en la emulsión reconstituida, 19% aceite en el microencapsulado, 93.75% EE. Aun así, los valores de peróxidos obtenidos para los tres microencapsulados estabilizados con el hidrolizado WPH10 tras 6 semanas de almacenamiento son bastante prometedores. En la proteína de lactosuero sin

hidrolizar, numerosos aminoácidos antioxidantes como cisteína y metionina están situados en el interior de la molécula y, por lo tanto, poco accesibles para los radicales libres (Elias et al., 2005). Por este motivo, la hidrólisis enzimática es efectiva para aumentar su accesibilidad y la eficacia antioxidante sin perder su capacidad quelante de metales prooxidantes (Tamm et al., 2015). Según los resultados obtenidos y la literatura disponible, la hidrólisis da como resultado una mejor accesibilidad de los aminoácidos con propiedades antioxidantes lo que genera una mayor estabilidad del aceite microencapsulado (Serfert et al., 2013; Tamm et al., 2015). La mayor accesibilidad de los aminoácidos antioxidantes mejora la efectividad de los péptidos adsorbidos en la interfase aceite-agua, donde se inicia la oxidación de lípidos y se promueven las reacciones de oxidación (McClements and Decker, 2000; Tamm et al., 2016b).

En otros estudios ya mencionados, la oxidación lipídica de aceite de pescado también se ve significativamente reducida en los microencapsulados estabilizados con hidrolizados de proteína de lactosuero con DH 6% y con jarabe de glucosa como encapsulante, tras 11 y 12 semanas de almacenamiento a temperaturas de 20-22°C (Tamm et al., 2015, 2016b), y con valores de peróxidos similares (< 20Mmol/kg de aceite) a los de este estudio en la semana 6 de almacenamiento.

#### **6.3.4. Conclusiones**

El hidrolizado de proteína de concentrado de lactosuero WPH10 es un buen emulsificante y antioxidante para la estabilización de microcápsulas de aceite rico en ácidos grasos Omega-3.

Durante el proceso de secado por atomización no se degradó el aceite y las microcápsulas fueron físicamente estables.

El hidrolizado WPH10 es efectivo en un amplio rango de concentraciones de aceite microencapsulado y, junto con encapsulantes como el jarabe de glucosa, produce microencapsulados con altas eficiencias de encapsulación. Además, ayuda a ralentizar los procesos de oxidación del aceite microencapsulado durante un periodo de almacenamiento de 6 semanas a una temperatura de 25°C.

## **7. CONCLUSIONES**



1. El hidrolizado que presenta mejores propiedades emulsificantes, es el obtenido mediante la reacción de hidrólisis enzimática de aislado de proteína de soja con la enzima tripsina (EC 3.4.21.4) a una temperatura de 50°C y pH 8, a DH final de 6.5% y con un pH de emulsión también igual a 8. Los índices de actividad y estabilidad emulsionante del hidrolizado (IAE, IEE) obtenidos mediante el procedimiento de optimización tienen unos valores de 12.16 m<sup>2</sup>/g y 44.39 min, respectivamente.
  
2. Los hidrolizados con mejores propiedades emulsificantes y antioxidantes son:
  - El hidrolizado obtenido mediante la reacción de hidrólisis enzimática de concentrado de proteína de lactosuero con la enzima subtilisina (EC 3.4.21.62) a una temperatura de 50°C y pH 8, a DH 10% y con un pH de emulsión de 8. En el procedimiento de optimización de las propiedades emulsificantes del hidrolizado se obtiene un IAE con un valor de 9.97 m<sup>2</sup>/g y un IEE de 24.81 min. En la determinación de las propiedades antioxidantes del hidrolizado se obtiene un valor de concentración mínima inhibitoria de radicales libres de 4.45±0.00 mg/ml. En poder reductor, la concentración de hidrolizado capaz de reducir iones de Fe<sup>3+</sup> dando lugar a una absorbancia de 0.5, es de 7.95±2.15 mg/ml y la concentración del hidrolizado capaz de quelar la mitad de los iones Fe<sup>2+</sup> en el ensayo de determinación de capacidad quelante es de 0.95±0.01 mg/ml.
  - El hidrolizado obtenido mediante la reacción de hidrólisis enzimática de aislado de proteína de soja con la enzima subtilisina (EC 3.4.21.62) a una temperatura de 50°C y pH 8, a DH 2% y con un pH de emulsión de 8. En el procedimiento de optimización de las propiedades emulsificantes del hidrolizado se obtiene un IAE con un valor de 10.09 m<sup>2</sup>/g y un IEE de 32.40 min. En la determinación de las propiedades antioxidantes del hidrolizado se obtiene un valor de concentración mínima inhibitoria de radicales libres de 1.26±0.00 mg/ml. En poder reductor, la concentración de hidrolizado capaz de reducir iones de Fe<sup>3+</sup> dando lugar a una absorbancia de 0.5, es de 23.11±5.90 mg/ml y la concentración del hidrolizado capaz de quelar la

- mitad de los iones  $\text{Fe}^{2+}$  en el ensayo de determinación de capacidad quelante es de  $1.11 \pm 0.02$  mg/ml.
- El hidrolizado obtenido mediante la reacción de hidrólisis enzimática de proteína de bacaladilla procedente de descartes de pesca con la enzima tripsina (EC 3.4.21.4) a una temperatura de  $50^\circ\text{C}$  y pH 8, a DH 4% y con un pH de emulsión de 2. En la determinación de las propiedades emulsificantes del hidrolizado se obtiene un IAE con un valor de  $14.94 \pm 1.36$   $\text{m}^2/\text{g}$  y un IEE de  $81.97 \pm 6.16$  min. En la determinación de las propiedades antioxidantes del hidrolizado se obtiene un valor de concentración mínima inhibitoria de radicales libres de  $1.46 \pm 0.20$  mg/ml. En poder reductor, la concentración de hidrolizado capaz de reducir iones de  $\text{Fe}^{3+}$  dando lugar a una absorbancia de 0.5, es de  $11.00 \pm 0.34$  mg/ml y la concentración del hidrolizado capaz de quelar la mitad de los iones  $\text{Fe}^{2+}$  en el ensayo de determinación de capacidad quelante es de  $0.95 \pm 0.01$  mg/ml.
3. La emulsión a pH 8, con un contenido de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 del 5% (p/p), y, con un 2% (p/p) de hidrolizado de concentrado de proteína de lactosuero a DH 10%, obtenido mediante hidrólisis enzimática con la enzima subtilisina (EC 3.4.21.62) a una temperatura de  $50^\circ\text{C}$  y pH 8, es la más estable física y oxidativamente. Durante un periodo de almacenamiento de 10 días a  $20^\circ\text{C}$  se mantiene la distribución monomodal inicial del tamaño de gota y el valor de peróxidos se mantiene constante con un valor de peróxidos de  $3.49 \pm 0.76$  mmol/kg de aceite.
  4. El hidrolizado de concentrado de proteína de lactosuero a DH 10%, obtenido mediante hidrólisis enzimática con la enzima subtilisina (EC 3.4.21.62) a una temperatura de  $50^\circ\text{C}$  y pH 8, es efectivo como agente emulsificante-antioxidante para microencapsulación de emulsiones a pH 8 de aceites ricos en ácidos grasos Omega-3 en agua mediante secado por atomización. El hidrolizado es efectivo y capaz de retrasar la oxidación lipídica de las microcápsulas, en un ratio de concentraciones de aceite/hidrolizado en la emulsión de partida de hasta 16/2, 32% (p/p) de aceite microencapsulado, empleando jarabe de glucosa DE 38

como agente encapsulante al 28% (p/p, emulsión de partida) y durante un periodo de almacenamiento de 6 semanas a una temperatura de 25°C. Los microencapsulados presentan un valor de humedad promedio de  $2.48 \pm 0.62\%$  y eficiencias de encapsulación entre  $76.55 \pm 0.23\%$  y  $98.02 \pm 0.07\%$ .



## **8. ANEXOS**



## 8.1. Ácidos grasos más comunes en la dieta humana

Ácido Graso Saturado	Fórmula	Abreviatura
Ácido decanoico (Cáprico)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	C10:0
Ácido dodecanoico (Láurico)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	C12:0
Ácido tetradecanoico (Mirístico)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	C14:0
Ácido hexadecanoico (Palmítico)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	C16:0
Ácido octadecanoico (Esteárico)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	C18:0
Ácido Graso Monoinsaturado	Fórmula	Abreviatura
Ácido cis-9- hexadecenoico (Palmitoleico)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	C16:1n-7
Ácido cis-9- octadecenoico (Oleico)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	C18:1n-9
Ácido Graso Poliinsaturado	Fórmula	Abreviatura
Ácido cis-9,cis-12- octadecadienoico (Linoleico)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	C18:2n-6
Ácido cis-9,cis-12-cis- 15 octadecatrienoico ( $\alpha$ -Linolénico)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	C18:3n-3
Ácido cis-5,cis-8,cis- 11, cis-14- eicosatetraenoico (Araquidónico)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	C20:4n-6
Ácido cis-5, cis-8,cis- 11,cis- 14,cis-17- eicosapentaenoico (EPA)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	C20:5n-3
Ácido cis-4,cis-7,cis- 10, cis-13,cis-16,cis-19 -docosahexaenoico (DHA)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	C22:6n-3

Figura 8.1 Ácidos grasos más comunes en la dieta humana.

## 8.2. Rutas metabólicas de los ácidos grasos Omega-6 y Omega-3

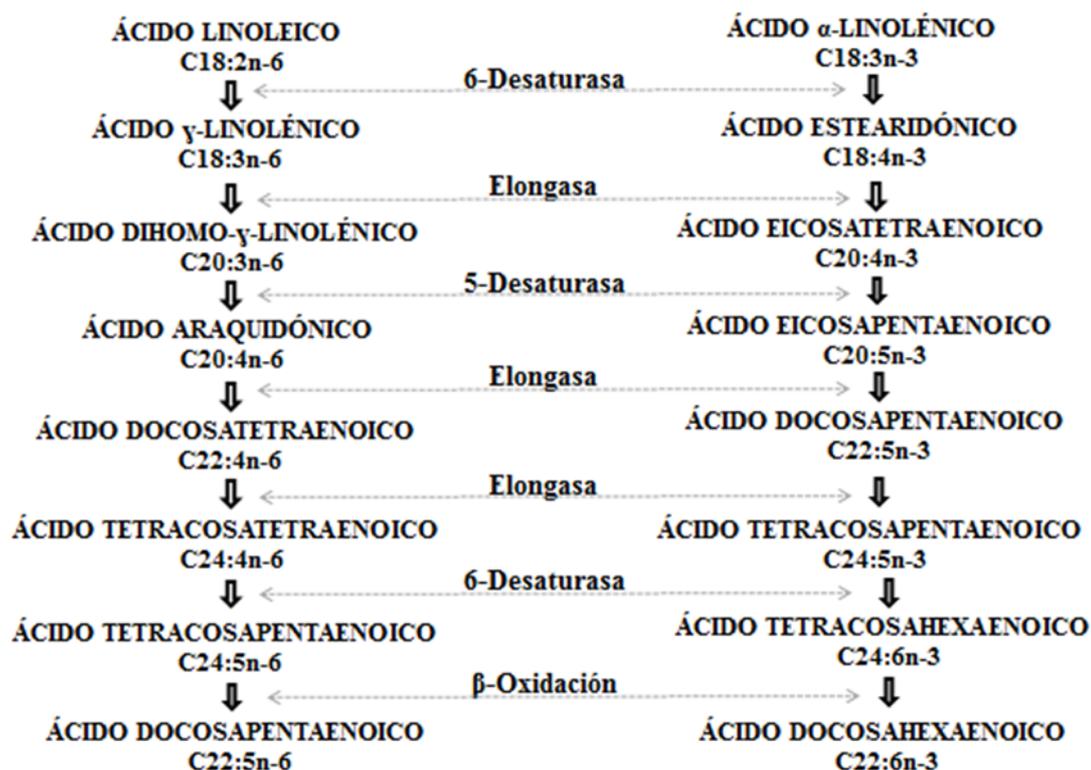


Figura 1.2 Rutas metabólicas de los ácidos grasos Omega-6 y Omega-3. Adaptado de Wall *et al.* (2010).

### 8.3. Principales componentes de los fosfoglicéridos más importantes de la membrana celular en el organismo humano

Fosfoglicérido	Categoría	Alcohol	Ácido Graso
Fosfatidilserina	Fosfolípidos	Serina	Palmítico C16:0    Esteárico C18:0
Fosfatidilinositol	Fosfolípidos	Inositol	Esteárico C18:0    Araquidónico C20:4n-6
Fosfatidiletanolamina	Fosfolípidos	Etanolamina	Palmítico C16:0
Fosfatidilcolina	Fosfolípidos	Colina	Palmítico C16:0

1.3 Principales componentes de los fosfoglicéridos más importantes de la membrana celular en el organismo humano. Adaptado de Sánchez and Ortega de la Torre (2017).



## **9. BIBLIOGRAFÍA**



Aceituno-Medina, M., Mendoza, S., Lagaron, J.M., and López-Rubio, A. (2013). Development and characterization of food-grade electrospun fibers from amaranth protein and pullulan blends. *Food Res. Int.* *54*, 667–674.

Adamson, N.J., and Reynolds, E.C. (1996). Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: Determination of enzyme specificity. *Enzyme Microb. Technol.* *19*, 202–207.

Adarme-Vega, T.C., Thomas-Hall, S.R., and Schenk, P.M. (2014). Towards sustainable sources for omega-3 fatty acids production. *Curr. Opin. Biotechnol.* *26*, 14–18.

Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., and Agboola, S. (2014a). Formation of whey protein isolate hydrolysate stabilised nanoemulsion. *Food Hydrocoll.* *41*, 169–177.

Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., and Agboola, S. (2014b). Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. *J. Food Eng.* *122*, 15–27.

Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic Hydrolysis of Food Protein* (London: Elsevier Applied Science Publishers LTD).

Åkesson, B., Gronowitz, S., Herslof, B., and Ohlson, R. (1978). Absorption of synthetic, stereochemically defined acylglycerols in the rat. *Lipids* *13*, 338–343.

Akoh, C.C. (2006). *Handbook of Functional Lipids*.

Akoh, C.C. (2008). *Food Lipids* (Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group).

Aluko, R.E. (2015). Amino acids, peptides, and proteins as antioxidants for food preservation. In *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, F. Shahidi, ed. (Elsevier Ltd), pp. 105–140.

Ansorena, D., and Astiasarán, I. (2013). Development of nutraceuticals containing marine algae oils. *Funct. Ingredients from Algae Foods Nutraceuticals* 634–657.

Anu Bhushani, J., and Anandharamakrishnan, C. (2014). Electrospinning and electrospaying techniques: Potential food based applications. *Trends Food Sci.*

Technol. 38, 21–33.

Aranceta, J., and Pérez-Rodrigo, C. (2012). Recommended dietary reference intakes, nutritional goals and dietary guidelines for fat and fatty acids: A systematic review. *Br. J. Nutr.* 107.

Arise, R.O., Idi, J.J., Mic-Braimoh, I.M., Korode, E., Ahmed, R.N., and Osemwegie, O. (2019). In vitro Angiotensin-1-converting enzyme,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory and antioxidant activities of *Luffa cylindrical* (L.) M. Roem seed protein hydrolysate. *Heliyon* 5, e01634.

Ashaolu, T.J. (2019). Applications of soy protein hydrolysates in the emerging functional foods: a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 421–428.

Astete, C.E., Sabliov, C.M., Watanabe, F., and Alexandru, B. (2009).  $\text{Ca}^{2+}$  Cross-linked alginate acid nanoparticles for solubilization of lipophilic natural colorants. *J. Agric. Food Chem.* 57, 7505–7512.

Aubourg, S.P., Pérez-Alonso, F., and Gallardo, J.M. (2004). Studies on rancidity inhibition in frozen horse mackerel (*Trachurus trachurus*) by citric and ascorbic acids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106, 232–240.

Avramenko, N.A., Chang, C., Low, N.H., and Nickerson, M.T. (2016). Encapsulation of flaxseed oil within native and modified lentil protein-based microcapsules. *Food Res. Int.* 81, 17–24.

Babakhani, A., Farvin, K.H.S., and Jacobsen, C. (2016). Antioxidative Effect of Seaweed Extracts in Chilled Storage of Minced Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*): Effect on Lipid and Protein Oxidation. *Food Bioprocess Technol.* 9, 352–364.

Bäck, M., and Hansson, G.K. (2019). Omega-3 fatty acids, cardiovascular risk, and the resolution of inflammation. *FASEB J.* 33, 1536–1539.

Bae, E.K., and Lee, S.J. (2008). Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *J. Microencapsul.* 25, 549–560.

Bajaj, P.R., Bhunia, K., Kleiner, L., Joyner (Melito), H.S., Smith, D., Ganjyal, G., and

- Sablani, S.S. (2017). Improving functional properties of pea protein isolate for microencapsulation of flaxseed oil. *J. Microencapsul.* *34*, 218–230.
- Bakry, A.M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M.Y., Mousa, A., and Liang, L. (2016). Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* *15*, 143–182.
- Barrow, C.J., Nolan, C., and Holub, B.J. (2009). Bioequivalence of encapsulated and microencapsulated fish-oil supplementation. *J. Funct. Foods* *1*, 38–43.
- Barrow, C.J., Wang, B., Adhikari, B., and Liu, H. (2013). Spray drying and encapsulation of omega-3 oils (Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited).
- Berdahl, D.R., and McKeague, J. (2015). Rosemary and sage extracts as antioxidants for food preservation (Elsevier Ltd).
- Bernardi, D.M., Bertol, T.M., Pflanzler, S.B., Sgarbieri, V.C., and Pollonio, M.A.R. (2016).  $\omega$ -3 in meat products: Benefits and effects on lipid oxidative stability. *J. Sci. Food Agric.* *96*, 2620–2634.
- Berton-Carabin, C.C., Ropers, M.H., and Genot, C. (2014). Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Involvement of the Interfacial Layer. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* *13*, 945–977.
- Betancor, M.B., Li, K., Sprague, M., Bardal, T., Sayanova, O., Usher, S., Han, L., KjellMåsøval, Torrissen, O., Napier, J.A., et al. (2017). An oil containing EPA and DHA from transgenic *Camelina sativa* to replace marine fish oil in feeds for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Effects on intestinal transcriptome, histology, tissue fatty acid profiles and plasma biochemistry. *PLoS One* 1–29.
- Bimbo, A.P. (2013). Sources of omega-3 fatty acids. *Food Enrich. with Omega-3 Fat. Acids* 27–107.
- Birch, C.S., and Bonwick, G.A. (2019). Ensuring the future of functional foods. *Int. J. Food Sci. Technol.* *54*, 1467–1485.
- Blanco, M., Domínguez-Timón, F., Pérez-Martín, R.I., Fraguas, J., Ramos-Ariza, P.,

Vázquez, J.A., Borderías, A.J., and Moreno, H.M. (2018). Valorization of recurrently discarded fish species in trawler fisheries in North-West Spain. *J. Food Sci. Technol.* *55*, 4477–4484.

De Boer, A., Urlings, M.J.E., and Bast, A. (2016). Active ingredients leading in health claims on functional foods. *J. Funct. Foods* *20*, 587–593.

Bork, C.S., Baker, E.J., Lundbye-Christensen, S., Miles, E.A., and Calder, P.C. (2019). Lowering the linoleic acid to alpha-linoleic acid ratio decreases the production of inflammatory mediators by cultured human endothelial cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* *141*, 1–8.

Boroski, M., Giroux, H.J., Sabik, H., Petit, H. V, Visentainer, J. V, Matumoto-pintro, P.T., and Britten, M. (2012). LWT - Food Science and Technology Use of oregano extract and oregano essential oil as antioxidants in functional dairy beverage formulations. *LWT - Food Sci. Technol.* *47*, 167–174.

Bruneel, C., Lemahieu, C., Fraeye, I., Ryckebosch, E., Muylaert, K., Buyse, J., and Foubert, I. (2013). Impact of microalgal feed supplementation on omega-3 fatty acid enrichment of hen eggs. *J. Funct. Foods* *5*, 897–904.

Caetano-Silva, M.E., Barros Mariutti, L.R., Bragagnolo, N., Bertoldo-Pacheco, M.T., and Netto, F.M. (2018). Whey Peptide-Iron Complexes Increase the Oxidative Stability of Oil-in-Water Emulsions in Comparison to Iron Salts. *J. Agric. Food Chem.* *66*, 1981–1989.

Calder, P.C. (2015). Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* *1851*, 469–484.

Calder, P.C. (2017). Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: From molecules to man. *Biochem. Soc. Trans.* *45*, 1105–1115.

Calvo, P., Castaño, Á.L., Lozano, M., and González-Gómez, D. (2012). Influence of the microencapsulation on the quality parameters and shelf-life of extra-virgin olive oil encapsulated in the presence of BHT and different capsule wall components. *Food Res.*

Int. 45, 256–261.

Camacho, F., González-Tello, P., Páez-Dueñas, M.P., Guadix, E.M., and Guadix, A. (2001). Correlation of base consumption with the degree of hydrolysis in enzymic protein hydrolysis. *J. Dairy Res.* 68, 251–265.

Canhada, S., Castro, K., Perry, I.S., and Luft, V.C. (2018). Omega-3 fatty acids' supplementation in Alzheimer's disease: A systematic review. *Nutr. Neurosci.* 21, 529–538.

Carneiro, H.C.F., Tonon, R. V., Grosso, C.R.F., and Hubinger, M.D. (2013). Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *J. Food Eng.* 115, 443–451.

Carocho, M., and Ferreira, I.C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 51, 15–25.

Carocho, M., Morales, P., and Ferreira, I.C.F.R. (2017). Aditivos Antioxidantes. In *Aditivos Alimentarios*, pp. 163–186.

Carocho, M., Morales, P., and Ferreira, I.C.F.R. (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 71, 107–120.

De Carvalho, C.C.C.R., and Caramujo, M.J. (2018). The various roles of fatty acids. *Molecules* 23.

Castro-Gómez, P., Garcia-Serrano, A., Visioli, F., and Fontecha, J. (2015). Relevance of dietary glycerophospholipids and sphingolipids to human health. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 101, 41–51.

Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R., and Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chem.* 135, 3020–3038.

Chang, C., and Nickerson, M.T. (2018). Encapsulation of omega 3-6-9 fatty acids-rich

oils using protein-based emulsions with spray drying. *J. Food Sci. Technol.* *55*, 2850–2861.

Charve, J., and Reineccius, G.A. (2009). Encapsulation performance of proteins and traditional materials for spray dried flavors. *J. Agric. Food Chem.* *57*, 2486–2492.

Cheison, S.C., Lai, M.Y., Leeb, E., and Kulozik, U. (2011). Hydrolysis of  $\beta$ -lactoglobulin by trypsin under acidic pH and analysis of the hydrolysates with MALDI-TOF-MS/MS. *Food Chem.* *125*, 1241–1248.

Chen, H., Muramoto, K., and Yamauchi, F. (1995). Structural Analysis of Antioxidative Peptides from Soybean Hydrolysis time ( h ). 574–578.

Chen, H.W., Kandutsch, A.A., and Heiniger, H.W. (1974). Stimulation of sterol synthesis. *Cancer Res.* *34*, 1034–1037.

Chen, L., Chen, J., Ren, J., and Zhao, M. (2011). Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pre-treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties. *Food Hydrocoll.* *25*, 887–897.

Chen, W., Wang, H., Zhang, K., Gao, F., Chen, S., and Li, D. (2016). Physicochemical Properties and Storage Stability of Microencapsulated DHA-Rich Oil with Different Wall Materials. *Appl. Biochem. Biotechnol.* *179*, 1129–1142.

Chen, W., Liang, G., Li, X., He, Z., Zen, M., Gao, D., Qin, F., Goff, H.D., and Chen, J. (2019). Impact of soy proteins, hydrolysates and monoglycerides at the oil/water interface in emulsions on interfacial properties and emulsion stability. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* *177*, 550–558.

Chua, J.Y., and Liu, S.Q. (2019). Soy whey: More than just wastewater from tofu and soy protein isolate industry. *Trends Food Sci. Technol.* *91*, 24–32.

Conway, V., Gauthier, S.F., and Pouliot, Y. (2013). Antioxidant activities of buttermilk proteins, whey proteins, and their enzymatic hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* *61*, 364–372.

Coorey, R., Novinda, A., Williams, H., and Jayasena, V. (2015). Omega-3 Fatty Acid

Profile of Eggs from Laying Hens Fed Diets Supplemented with Chia, Fish Oil, and Flaxseed. *J. Food Sci.* *80*, S180–S187.

Crupkin, M., and Zambelli, A. (2008). Detrimental impact of trans fats on human health: Stearic acid-rich fats as possible substitutes. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* *7*, 271–279.

Cui, X.H., Bi, H.D., Bian, X.L., Li, Z.W., and Wang, Z.Y. (2017). Effects of a Hydrolysate of Whey Protein Isolate on the Preservation of Surimi during Cold Storage. *Mod. Food Sci. Technol.* *33*, 2019.

Cui, Z., Kong, X., Chen, Y., Zhang, C., and Hua, Y. (2014). Food Hydrocolloids Effects of rutin incorporation on the physical and oxidative stability of soy protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocoll.* *41*, 1–9.

Danviriyakul, S., McClements, D.J., Decker, E., Nawar, W.W., and Chinachoti, P. (2002). Physical stability of spray-dried milk fat emulsion as affected by emulsifiers and processing conditions. *J. Food Sci.* *67*, 2183–2189.

Davis, M.J. (2010). Contrast coding in multiple regression analysis: Strengths, weaknesses, and utility of popular coding structures. *J. Data Sci.* *8*, 61–73.

Davis, J.P., Doucet, D., and Foegeding, E.A. (2005). Foaming and interfacial properties of hydrolyzed  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Colloid Interface Sci.* *288*, 412–422.

Decker, E.A., and Welch, B. (1990). Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food†. *J. Agric. Food Chem.* *38*, 674–677.

Desai, K.G.H., and Park, H.J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Dry. Technol.* *23*, 1361–1394.

Díaz, M., and Decker, E.A. (2004). Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. *J. Agric. Food Chem.* *52*, 8208–8213.

Dinicolantonio, J.J., and O’Keefe, J.H. (2018). Importance of maintaining a low omega-6/omega-3 ratio for reducing inflammation. *Open Hear.* *5*, 1–4.

- Dinicolantonio, J.J., and Okeefe, J. (2019). Importance of maintaining a low omega-6/omega-3 ratio for reducing platelet aggregation, coagulation and thrombosis. *Open Hear.* 6, 1–4.
- Djuardi, A.U.P., Yuliana, N.D., Ogawa, M., Akazawa, T., and Suhartono, M.T. (2020). Emulsifying properties and antioxidant activity of soy protein isolate conjugated with tea polyphenol extracts. *J. Food Sci. Technol.*
- Dobetti, L., and Pantaleo, V. (2008). Application of a hydrodynamic model to microencapsulation by coacervation. *J. Microencapsul.* 19, 139–151.
- Domínguez Díaz, L., Fernández-Ruiz, V., and Cámara, M. (2020). An international regulatory review of food health-related claims in functional food products labeling. *J. Funct. Foods* 68, 103896.
- Drapala, K.P., Mulvihill, D.M., and O'Mahony, J.A. (2018). Improving the oxidative stability of model whey protein hydrolysate-based infant formula emulsions with lecithin. *Int. J. Dairy Technol.* 71, 966–974.
- Drusch, S., and Berg, S. (2008). Extractable oil in microcapsules prepared by spray-drying: Localisation, determination and impact on oxidative stability. *Food Chem.* 109, 17–24.
- Drusch, S., and Mannino, S. (2009). Patent-based review on industrial approaches for the microencapsulation of oils rich in polyunsaturated fatty acids. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 237–244.
- Drusch, S., Serfert, Y., and Schwarz, K. (2006). Microencapsulation of fish oil with n-octenylsuccinate-derivatised starch: Flow properties and oxidative stability. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108, 501–512.
- Drusch, S., Serfert, Y., Scampicchio, M., Schmidt-Hansberg, B., and Schwarz, K. (2007). Impact of physicochemical characteristics on the oxidative stability of fish oil microencapsulated by spray-drying. *J. Agric. Food Chem.* 55, 11044–11051.
- Drusch, S., Rätzke, K., Shaikh, M.Q., Serfert, Y., Steckel, H., Scampicchio, M., Voigt,

I., Schwarz, K., and Mannino, S. (2009). Differences in free volume elements of the carrier matrix affect the stability of microencapsulated lipophilic food ingredients. *Food Biophys.* 4, 42–48.

Drusch, S., Serfert, Y., Berger, A., Shaikh, M.Q., Rätzke, K., Zaporojtchenko, V., and Schwarz, K. (2012). New insights into the microencapsulation properties of sodium caseinate and hydrolyzed casein. *Food Hydrocoll.* 27, 332–338.

EFSA (2010). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA J.* 8, 1–107.

EFSA (2012). Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA). *EFSA J.* 10, 1–48.

EFSA (2016). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to docosahexaenoic acid (DHA) and maintenance of normal (fasting) blood concentrations of triglycerides (ID 533, 691, 3150), protection of blood lipids from oxidative damage (ID 630), contr. *EFSA J.* 8, 1734.

Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., and Ross, R.P. (2018). Characterization of protein hydrolysates from blue whiting (*Micromesistius poutassou*) and their application in beverage fortification. *Food Chem.* 245, 698–706.

Elagizi, A., Lavie, C.J., Marshall, K., DiNicolantonio, J.J., O’Keefe, J.H., and Milani, R. V. (2018). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Health: A Comprehensive Review. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 61, 76–85.

Elias, R.J., McClements, D.J., and Decker, E.A. (2005). Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase  $\beta$ -lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 53, 10248–10253.

Elias, R.J., Kellerby, S.S., and Decker, E.A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48, 430–441.

Eratte, D., Wang, B., Dowling, K., Barrow, C.J., and Adhikari, B.P. (2014). Complex coacervation with whey protein isolate and gum arabic for the microencapsulation of omega-3 rich tuna oil. *Food Funct.* *5*, 2743–2750.

Eratte, D., Dowling, K., Barrow, C.J., and Adhikari, B. (2018). Recent advances in the microencapsulation of omega-3 oil and probiotic bacteria through complex coacervation: A review. *Trends Food Sci. Technol.* *71*, 121–131.

Erickson, M. (2008). Chemistry and Function of Phospholipids. In *Food Lipids*, C.C. Akoh, ed. pp. 39–55.

Espejo-Carpio, F.J. (2012). Peptidos Antihipertensivos De Leche De Cabra.

Espejo-Carpio, F.J., De Gobba, C., Guadix, A., Guadix, E.M., and Otte, J. (2013). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. *Int. Dairy J.* *32*, 175–183.

Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R.C., Nishijima, M., Raetz, C.R.H., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., Wakelam, M.J.O., and Dennis, E.A. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* *50*, S9–S14.

Fang, Z., and Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols - A review. *Trends Food Sci. Technol.* *21*, 510–523.

FAO (2008). Grasas y ácidos grasos en nutrición humana Consulta de expertos 91 ESTUDIO FAO ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

Farvin, S.K.H., Baron, C.P., Nielsen, N.S., and Jacobsen, C. (2010). Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 1-in vitro assays and evaluation in  $\omega$ -3 enriched milk. *Food Chem.* *123*, 1081–1089.

Fedorova-Dahms, I., Marone, P.A., Bauter, M., and Ryan, A.S. (2011). Safety evaluation of DHA-rich Algal Oil from *Schizochytrium* sp. *Food Chem. Toxicol.* *49*, 3310–3318.

Ferreira, G.F., Ríos Pinto, L.F., Maciel Filho, R., and Fregolente, L. V. (2019). A

review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles. *Renew. Sustain. Energy Rev.* *109*, 448–466.

Ferreira Ferreira da Silveira, T., Cajaíba, L.M., Valentin, L., Baréa, B., Villeneuve, P., and Castro, I.A. (2020). Effect of sinapic acid ester derivatives on the oxidative stability of omega-3 fatty acids rich oil-in-water emulsions. *Food Chem.* *309*, 125586.

Fimreite, D. (2004). WO2004009071. 29.01.2004.

Finco, A.M. de O., Mamani, L.D.G., Carvalho, J.C. de, de Melo Pereira, G.V., Thomaz-Soccol, V., and Soccol, C.R. (2016). Technological trends and market perspectives for production of microbial oils rich in omega-3. *Crit. Rev. Biotechnol.* *37*, 656–671.

Frankel, E.N., Huang, S.W., Kanner, J., and German, J.B. (1994). Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions. *J. Agric. Food Chem.* *42*, 1054–1059.

Frankel E.N. (2005). *Lipid oxidation* (Oily Press 2005).

Freitas de Oliveira, C., Corrêa, A.P.F., Coletto, D., Daroit, D.J., Cladera-Olivera, F., and Brandelli, A. (2015). Soy protein hydrolysis with microbial protease to improve antioxidant and functional properties. *J. Food Sci. Technol.* *52*, 2668–2678.

Frenot, A., and Chronakis, I. (2003). Precipitation of Carbonates. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* *8*, 64–75.

Fuster, M.D., Lampi, A.M., Hopia, A., and Kamal-Eldin, A. (1998). Effects of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols on the autooxidation of purified sunflower triacylglycerols. *Lipids* *33*, 715–722.

García-Moreno, P.J., Raúl Pérez-Gálvez, Morales-Medina, R., Guadix, A., and M., E.G. (2013). Discarded species in the West Mediterranean Sea as sources of Omega-3 PUFAs. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *115*, 982–989.

García-Moreno, P.J., Horn, A.F., and Jacobsen, C. (2014a). Influence of casein-phospholipid combinations as emulsifier on the physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* *62*, 1142–1152.

García-Moreno, P.J., Batista, I., Pires, C., Bandarra, N.M., Espejo-Carpio, F.J., Guadix, A., and Guadix, E.M. (2014b). Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. *Food Res. Int.* *65*, 469–476.

García-Moreno, P.J., Guadix, A., Guadix, E.M., and Jacobsen, C. (2016a). Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized with fish protein hydrolysates. *Food Chem.* *203*, 124–135.

García-Moreno, P.J., Stephansen, K., Van Der Kruijs, J., Guadix, A., Guadix, E.M., Chronakis, I.S., and Jacobsen, C. (2016b). Encapsulation of fish oil in nanofibers by emulsion electrospinning: Physical characterization and oxidative stability. *J. Food Eng.* *183*, 39–49.

García-Moreno, P.J., Pérez-Gálvez, R., Espejo-Carpio, F.J., Ruiz-Quesada, C., Pérez-Morilla, A.I., Martínez-Agustín, O., Guadix, A., and Guadix, E.M. (2017). Functional, bioactive and antigenicity properties of blue whiting protein hydrolysates: effect of enzymatic treatment and degree of hydrolysis. *J. Sci. Food Agric.* *97*, 299–308.

García-Moreno, P.J., Mendes, A.C., Jacobsen, C., and Chronakis, I.S. (2018). Biopolymers for the nanomicroencapsulation of bioactive ingredients by electrohydrodynamic processing. In *Polymers for Food Applications*, pp. 447–479.

García-Moreno, P.J., Jacobsen, C., Marcatili, P., Gregersen, S., Overgaard, M.T., Andersen, M.L., Sørensen, A.D.M., and Hansen, E.B. (2020). Emulsifying peptides from potato protein predicted by bioinformatics: Stabilization of fish oil-in-water emulsions. *Food Hydrocoll.* *101*.

Garg, M.L., Wood, L.G., Singh, H., and Moughan, P.J. (2006). Means of delivering recommended levels of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in human diets. *J. Food Sci.* *71*.

Gbogouri, G.A., Linder, M., Fanni, J., and Parmenter, M. (2004). C : Food Chemistry and Toxicology Influence of Hydrolysis Degree. Influence of Hydrolysis Degree on the Functional Properties of Salmon Byproducts Hydrolysates. *J. Food Sci.* *69g*, 615–622.

Geirsdottir, M., Sigurgísladottir, S., Hamaguchi, P.Y., Thorkelsson, G., Johannsson, R.,

- Hordur, G., and Kristjansson, M.M. (2011). Enzymatic Hydrolysis of Blue Whiting ( *Micromesistius poutassou* ); Functional and Bioactive Properties. *76*, 14–20.
- Genot, C., Kabri, T.-H., and Meynier, A. (2013). Stabilization of omega-3 oils and enriched foods using emulsifiers. In *Food Enrichment with Omega-3 Fatty Acids*, C. Jacobsen, N.S. Nielsen, A.F. Horn, and A.-D.M. Sørensen, eds. (INRA, France: Woodhead Publishing Limited), pp. 151–193.
- Gharsallaoui, A., Saurel, R., Chambin, O., Cases, E., Voilley, A., and Cayot, P. (2010). Utilisation of pectin coating to enhance spray-dry stability of pea protein-stabilised oil-in-water emulsions. *Food Chem.* *122*, 447–454.
- Ghelichi, S., Sørensen, A.D.M., García-Moreno, P.J., Hajfathalian, M., and Jacobsen, C. (2017). Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions fortified with enzymatic hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) roe. *Food Chem.* *237*, 1048–1057.
- Gibbs, B.F., Zougman, A., Masse, R., and Mulligan, C. (2004). Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Res. Int.* *37*, 123–131.
- Gil, A., and Chagoyán, O. (2017). Nutrigenómica.Regulación de la expresión génica mediada por nutrientes y otros componentes alimentarios. In *Tratado de Nutrición I.Bases Fisiológicas y Bioquímicas de La Nutrición*, A. Gil, ed. pp. 1041–1077.
- Gil, A., and Sanchez de Medina, F. (2017). Comunicación intercelular:hormonas, eicosanoides, factores de crecimiento y citokinas. In *Tratado de Nutrición I.Bases Fisiológicas y Bioquímicas de La Nutrición*, A. Gil, ed. pp. 81–131.
- Gil, A., and Sánchez de Medina, F. (2017). Funciones y metabolismo de los nutrientes. In *Tratado de Nutrición I.Bases Fisiológicas y Bioquímicas de La Nutrición*, A. Gil, ed. pp. 23–52.
- Di Giorgio, L., Salgado, P.R., and Mauri, A.N. (2019). Encapsulation of fish oil in soybean protein particles by emulsification and spray drying. *Food Hydrocoll.* *87*, 891–901.

Gomes, M.H.G., and Kurozawa, L.E. (2020). Improvement of the functional and antioxidant properties of rice protein by enzymatic hydrolysis for the microencapsulation of linseed oil. *J. Food Eng.* 267, 109761.

Groenewold, S., and Fonds, M. (2000). Effects on benthic scavengers of discards and damaged benthos produced by the beam-trawl fishery in the southern North Sea. 1395–1406.

Guadix, A., Guadix, E.M., Paez-Dueñas, M.P., González-Tello, P., and Camacho, F. (2000). Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins [ Article @ Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas ]. *Ars Pharm.* 41, 79–89.

Guan, H., Diao, X., Jiang, F., Han, J., and Kong, B. (2018). The enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by Corolase PP under high hydrostatic pressure and its effect on bioactivity and characteristics of hydrolysates. *Food Chem.* 245, 89–96.

Guillou, H., Zadavec, D., Martin, P.G.P., and Jacobsson, A. (2010). The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog. Lipid Res.* 49, 186–199.

Gumus, C.E., Decker, E.A., and McClements, D.J. (2017). Formation and Stability of  $\omega$ -3 Oil Emulsion-Based Delivery Systems Using Plant Proteins as Emulsifiers: Lentil, Pea, and Faba Bean Proteins. *Food Biophys.* 12, 186–197.

Harnedy, A., and Fitzgerald, R.J. (2011). Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish : A review. 4.

Hashempour-Baltork, F., Torbati, M., Azadmard-Damirchi, S., and Savage, G.P. (2016). Vegetable oil blending: A review of physicochemical, nutritional and health effects. *Trends Food Sci. Technol.* 57, 52–58.

He, S., Franco, C., and Zhang, W. (2013). Functions , applications and production of protein hydrolysates from fish processing. *FRIN* 50, 289–297.

Hee, Y.Y., Tan, C.P., Rahman, R.A., Adzahan, N.M., Lai, W.T., and Chong, and G.H.

(2015). Influence of Different Wall Materials on the Microencapsulation of Virgin Coconut Oil by Spray Drying. *Int. J. Food Eng.* *11*, 61–69.

Heffernan, N., Smyth, T.J., Fitzgerald, R.J., Soler-Vila, A., and Brunton, N. (2014). Antioxidant activity and phenolic content of pressurised liquid and solid-liquid extracts from four Irish origin macroalgae. *Int. J. Food Sci. Technol.* *49*, 1765–1772.

Heinzelmann, K., Franke, K., Velasco, J., and Márquez-Ruiz, G. (2000). Microencapsulation of fish oil by freeze-drying techniques and influence of process parameters on oxidative stability during storage. *Eur. Food Res. Technol.* *211*, 234–239.

Hermund, D.B., and Yes, B. (2015). Characterisation and antioxidant evaluation of Icelandic *F. vesiculosus* extracts in vitro and in fish-oil-enriched milk and mayonnaise. *J. Funct. Foods* *19*, 828–841.

Hermund, D., Jacobsen, C., Chronakis, I.S., Pelayo, A., Yu, S., Busolo, M., Lagaron, J.M., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H.G., Akoh, C.C., et al. (2019). Stabilization of Fish Oil-Loaded Electrosprayed Capsules with Seaweed and Commercial Natural Antioxidants: Effect on the Oxidative Stability of Capsule-Enriched Mayonnaise. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *121*, 1–10.

Hermund, D.B., Karadag, A., Andersen, U., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H.G., Alasalvar, C., and Jacobsen, C. (2016). Oxidative Stability of Granola Bars Enriched with Multilayered Fish Oil Emulsion in the Presence of Novel Brown Seaweed Based Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*

Hettiarachchy, N.S., Sato, K., Marshall, M.R., and Kannan, A. (2011). Bioactive food proteins and peptides : Applications in human health.

Hogan, S.A., McName, B.F., O’Riordan, E.D., and O’Sullivan, M. (2001). Microencapsulating Properties of Whey Protein Concentrate 75. *66*, 675–680.

Holdt, S.L., and Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.* *23*, 543–597.

Honold, P.J., Jacobsen, C., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H.G., and Hermund, D.B. (2016).

Potential seaweed-based food ingredients to inhibit lipid oxidation in fish-oil-enriched mayonnaise. *Eur. Food Res. Technol.* *242*, 571–584.

Horn, A.F., Nielsen, N.S., and Jacobsen, C. (2009). Additions of caffeic acid, ascorbyl palmitate or  $\gamma$ -tocopherol to fish oil-enriched energy bars affect lipid oxidation differently. *Food Chem.* *112*, 412–420.

Horn, A.F., Nielsen, N.S., Jensen, L.S., Horsewell, A., and Jacobsen, C. (2012). The choice of homogenisation equipment affects lipid oxidation in emulsions. *Food Chem.* *134*, 803–810.

Hou, P., Pu, F., Zou, H., Diao, M., Zhao, C., Xi, C., and Zhang, T. (2019). Whey protein stabilized nanoemulsion: A potential delivery system for ginsenoside Rg3 whey protein stabilized nanoemulsion: Potential Rg3 delivery system. *Food Biosci.* *31*, 100427.

Hraš, A.R., Hadolin, M., Knez, Ž., and Bauman, D. (2000). Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chem.* *71*, 229–233.

Hu, M., McClements, D.J., and Decker, E.A. (2003a). Impact of whey protein emulsifiers on the oxidative stability of salmon oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* *51*, 1435–1439.

Hu, M., McClements, D.J., and Decker, E.A. (2003b). Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate, and soy protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* *51*, 1696–1700.

Hu, Y., Hu, F.B., and Manson, J.E. (2019). Marine Omega-3 Supplementation and Cardiovascular Disease: An Updated Meta-Analysis of 13 Randomized Controlled Trials Involving 127 477 Participants. *J. Am. Heart Assoc.* *8*.

Hunt, J.A., and Dalgleish, D.G. (1994). Effect of pH on the Stability and Surface Composition of Emulsions Made with Whey Protein Isolate. *J. Agric. Food Chem.* *42*, 2131–2135.

Ipsen, R., Otte, J., Sharma, R., Nielsen, A., Gram Hansen, L., and Bruun Qvist, K. (2001). Effect of limited hydrolysis on the interfacial rheology and foaming properties of  $\beta$ -lactoglobulin A. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 21, 173–178.

Iriondo-Dehond, M., Miguel, E., and Del Castillo, M.D. (2018). Food byproducts as sustainable ingredients for innovative and healthy dairy foods. *Nutrients* 10, 1–24.

ISO (2006). ISO 6885:2006, Animal and vegetable fats and oils. Determination of anisidine value.

Ito, N., Fukushima, S., and Tsuda, H. (1985). Carcinogenicity and Modification of the Carcinogenic. *15*, 109–150.

Jacobsen, C. (2010). Challenges when developing omega-3 enriched foods. *OCL - Ol. Corps Gras Lipides* 17, 251–258.

Jacobsen, C. (2015). Some strategies for the stabilization of long chain n-3 PUFA-enriched foods: A review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117, 1853–1866.

Jacobsen, C., Hartvigsen, K., Lund, P., Meyer, A.S., and Jens, J.A. (1999). Oxidation in fish-oil-enriched mayonnaise: Assessment of propyl gallate as an antioxidant by discriminant partial least squares regression analysis. *Eur Food Res Technol* 210, 13–30.

Jacobsen, C., Hartvigsen, K., Lund, P., Hølmer, J.A.G., and Meyer, A.S. (2000). Oxidation in fish-oil-enriched mayonnaise: Assessment of the efficacy of different tocopherol antioxidant systems by discriminant partial least squares regression analysis. *Eur Food Res Technol* 210, 242–257.

Jacobsen, C., Hartvigsen, K., Thomsen, M.K., Hansen, L.F., Lund, P., Skibsted, L.H., Hølmer, G., Adler-Nissen, J., and Meyer, A.S. (2001a). Lipid oxidation in fish oil enriched mayonnaise: Calcium disodium ethylenediaminetetraacetate, but not gallic acid, strongly inhibited oxidative deterioration. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1009–1019.

Jacobsen, C., Hartvigsen, K., Lund, P., Thomsen, M.K., Skibsted, L.H., Hølmer, G., Adler-Nissen, J., and Meyer, A.S. (2001b). Oxidation in fish oil-enriched mayonnaise:

4. Effect of tocopherol concentration on oxidative deterioration. *Eur. Food Res. Technol.* *212*, 308–318.

Jacobsen, C., Timm, M., and Meyer, A. (2001c). Oxidation in fish oil enriched mayonnaise: Ascorbic acid and low pH increase oxidative deterioration. *J. Agric. Food Chem.* *49*, 3947–3956.

Jacobsen, C., Let, M.B., Nielsen, N.S., and Meyer, A.S. (2008a). Antioxidant strategies for preventing oxidative flavour deterioration of foods enriched with n-3 polyunsaturated lipids: a comparative evaluation. *Trends Food Sci. Technol.* *19*, 76–93.

Jacobsen, C., Let, M.B., Sørensen, A.D.M., Horn, A.F., Timm-Heinrich, M., and Nielsen, N.S. (2008b). Applications of natural antioxidants in omega-3 enriched foods. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* *7*, 3288–3295.

Jacobsen, C., Nielsen, N.S., Horn, A.F., and Sørensen, A.-D.M. (2013a). *Food enrichment with omega-3 fatty acids* (Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited).

Jacobsen, C., Sørensen, A.-D.M., and Nielsen, N.S. (2013b). Stabilization of omega-3 oils and enriched foods using antioxidants. In *Food Enrichment with Omega-3 Fatty Acids*, pp. 130–149.

Jacobsen, C., Sørensen, A.-D.M., Holdt, S.L., Akoh, C.C., and Hermund, D.B. (2019). Source, Extraction, Characterization, and Applications of Novel Antioxidants from Seaweed. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* *10*, 541–568.

Jafari, S.M., He, Y., and Bhandari, B. (2007). Role of powder particle size on the encapsulation efficiency of oils during spray drying. *Dry. Technol.* *25*, 1081–1089.

Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., and Bhandari, B. (2008). Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying. *Spray Drying*. *26*, 816–835.

Jakobsen, M.U., Overvad, K., Dyerberg, J., Schroll, M., and Heitmann, B.L. (2004). Dietary fat and risk of coronary heart disease: Possible effect modification by gender and age. *Am. J. Epidemiol.* *160*, 141–149.

Jeewanthi, R.K.C., Lee, N.-K., and Paik, H.-D. (2015). Improved Functional

Characteristics of Whey Protein Hydrolysates in Food Industry. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 35, 350–359.

Jiménez-Martín, E., Pérez-Palacios, T., Carrascal, J.R., and Rojas, T.A. (2016). Enrichment of Chicken Nuggets with Microencapsulated Omega-3 Fish Oil: Effect of Frozen Storage Time on Oxidative Stability and Sensory Quality. *Food Bioprocess Technol.* 9, 285–297.

Joye, I.J., and McClements, D.J. (2014). Emulsifying and emulsion-stabilizing properties of gluten hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* 62, 2623–2630.

Julibert, A., Bibiloni, M. del M., and Tur, J.A. (2019). Dietary fat intake and metabolic syndrome in adults: A systematic review. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 29, 887–905.

Jump, D.B., Depner, C.M., and Tripathy, S. (2012). Omega-3 fatty acid supplementation and cardiovascular disease. *J. Lipid Res.* 53, 2525–2545.

Jung, S., Murphy, P.A., and Johnson, L.A. (2005). Physicochemical and functional properties of soy protein substrates modified by low levels of protease hydrolysis. *J. Food Sci.* 70.

Kadegowda, A.K.G., and Yu, L. (2015). *Effects of Dietary Lipid Intake on Diabetes* (Elsevier Ltd).

Kamal-Eldin, A., and Budilarto, E. (2015). Tocopherols and tocotrienols as antioxidants for food preservation. In *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, (Elsevier Ltd), pp. 141–159.

Karaca, A.C., Nickerson, M., and Low, N.H. (2013). Microcapsule production employing chickpea or lentil protein isolates and maltodextrin: Physicochemical properties and oxidative protection of encapsulated flaxseed oil. *Food Chem.* 139, 448–457.

Karimi, A., Azizi, M.H., and Ahmadi Gavlighi, H. (2020). Fractionation of hydrolysate from corn germ protein by ultrafiltration: In vitro antidiabetic and antioxidant activity. *Food Sci. Nutr.* 8, 2395–2405.

- Kaushik, P., Dowling, K., Barrow, C.J., and Adhikari, B. (2015). Microencapsulation of omega-3 fatty acids: A review of microencapsulation and characterization methods. *J. Funct. Foods* 19, 868–881.
- Keogh, M.K., O’Kennedy, B.T., Kelly, J., Auty, M.A., Kelly, P.M., Fureby, A., and Haahr, A.M. (2001). Stability to oxidation of spray-dried fish oil powder microencapsulated using milk ingredients. *J. Food Sci.* 66, 217–224.
- Kim, J.M., Liceaga, A.M., and Yoon, K.Y. (2019). Purification and identification of an antioxidant peptide from perilla seed (*Perilla frutescens*) meal protein hydrolysate. *Food Sci. Nutr.* 7, 1645–1655.
- Kim, S.K., Kim, Y.T., Byun, H.G., Park, P.J., and Ito, H. (2001). Purification and Characterization of Antioxidative Peptides from Bovine Skin. *J. Biochem. Mol. Biol.* 34, 219–224.
- Kindleysides, S., Quek, S.Y., and Miller, M.R. (2012). Inhibition of fish oil oxidation and the radical scavenging activity of New Zealand seaweed extracts. *Food Chem.* 133, 1624–1631.
- Kiokias, S., Varzakas, T., and Oreopoulou, V. (2008). In vitro activity of vitamins, flavonoids, and natural phenolic antioxidants against the oxidative deterioration of oil-based systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48, 78–93.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., and Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chem.* 102, 1317–1327.
- Kolanowski, W., Ziolkowski, M., Weißbrodt, J., Kunz, B., and Laufenberg, G. (2006). Microencapsulation of fish oil by spray drying - Impact on oxidative stability. Part 1. *Eur. Food Res. Technol.* 222, 336–342.
- Koletzko, B., Lien, E., Agostoni, C., Böhles, H., Campoy, C., Cetin, I., Decsi, T., Dudenhausen, J.W., Dupont, C., Forsyth, S., et al. (2008). The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: Review of current

knowledge and consensus recommendations. *J. Perinat. Med.* *36*, 5–14.

Kong, B., and Xiong, Y.L. (2006). Antioxidant Activity of Zein Hydrolysates in a Liposome System and the Possible Mode of Action †. *J. Agric. Food Chem.* *54*, 6059–6068.

Kralova, I., and Sjöblom, J. (2009). Surfactants Used in Food Industry: A Review. *2691*.

Kristinova, V., Aaneby, J., Mozuraityte, R., Storrø, I., and Rustad, T. (2014). The effect of dietary antioxidants on iron-mediated lipid peroxidation in marine emulsions studied by measurement of dissolved oxygen consumption. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *116*, 857–871.

Kristinsson, H.G., and Rasco, B.A. (2000). Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* *40:1*, 43–81.

Kroese, D.P., and Chan, J.C.C. (2014). *Statistical Modeling and Computation* (New York: Springer-Verlag New York).

Krumbholz, R., Lamprecht, A., Lehr, C.-M., Schäfer, U., Schirra, N., and Manfred Treitz (2001). Microencapsulated unsaturated fatty acid or fatty acid compound or mixture of fatty acids and fatty acids compound.

Kulås, E., and Ackman, R.G. (2001). Different tocopherols and the relationship between two methods for determination of primary oxidation products in fish oil. *J. Agric. Food Chem.* *49*, 1724–1729.

Laguerre, M., López Giraldo, L.J., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.C., Baréa, B., Weiss, J., Decker, E.A., and Villeneuve, P. (2009). Chain length affects antioxidant properties of chlorogenate esters in emulsion: the cutoff theory behind the polar paradox. *J. Agric. Food Chem.* *57*, 11335–11342.

Laguerre, M., López Giraldo, L.J., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.C., Baréa, B., Weiss, J., Decker, E.A., and Villeneuve, P. (2010). Relationship between hydrophobicity and antioxidant ability of “phenolipids” in emulsion: A parabolic effect

- of the chain length of rosmarinate esters. *J. Agric. Food Chem.* *58*, 2869–2876.
- Lam, R.S.H., and Nickerson, M.T. (2013). Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach. *Food Chem.* *141*, 975–984.
- Lands, B. (2012). Consequences of essential fatty acids. *Nutrients* *4*, 1338–1357.
- Lands, B., Bibus, D., and Stark, K.D. (2018). Dynamic interactions of n-3 and n-6 fatty acid nutrients. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* *136*, 15–21.
- Larsen, R., Eilertsen, K.E., and Elvevoll, E.O. (2011). Health benefits of marine foods and ingredients. *Biotechnol. Adv.* *29*, 508–518.
- Lee, J.H., and Min, D.B. (2006). Nutraceuticals, Aging, and Food Oxidation. In *Handbook of Functional Lipids*, C.C. Akoh, ed. pp. 325–346.
- Lee, S., Morr, C. V., and HA, E.Y.W. (1992). Structural and Functional Properties of Caseinate and Whey Protein Isolate as Affected by Temperature and pH. *J. Food Sci.* *57*, 1210–1229.
- Lee, S., Decker, E.A., Faustman, C., and Mancini, R.A. (2005). The effects of antioxidant combinations on color and lipid oxidation in n - 3 oil fortified ground beef patties. *Meat Sci.* *70*, 683–689.
- Leren, P. (1966). The effect of a plasma cholesterol lowering diet. *Acta Med. Scand. Suppl.* *466*, 1–92.
- Let, M.B., Jacobsen, C., and Meyer, A.S. (2004). Effects of fish oil type, lipid antioxidants and presence of rapeseed oil on oxidative flavour stability of fish oil enriched milk. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *106*, 170–182.
- Let, M.B., Jacobsen, C., and Meyer, A.S. (2005). Sensory stability and oxidation of fish oil enriched milk is affected by milk storage temperature and oil quality. *Int. Dairy J.* *15*, 173–182.
- Let, M.B., Jacobsen, C., and Meyer, A.S. (2007a). Lipid oxidation in milk, yoghurt, and salad dressing enriched with neat fish oil or pre-emulsified fish oil. *J. Agric. Food*

Chem. 55, 7802–7809.

Let, M.B., Jacobsen, C., and Meyer, A.S. (2007b). Ascorbyl palmitate, tocopherol, and EDTA affect lipid oxidation in fish oil enriched salad dressing differently. *J. Agric. Food Chem.* 55, 2369–2375.

Levy, M., Koepfen, B., and Stanton, B. (2004). *Berne & Levy Principles of Physiology*, 4th Edition.

Li, D., Bode, O., Drummond, H., and Sinclair, A.J. (2013). Omega-3 (n-3) fatty acids. In *Lipids for Functional Foods and Nutraceuticals*, pp. 225–262.

Li, X., Luo, Y., Shen, H., and You, J. (2012). Antioxidant activities and functional properties of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) protein hydrolysates. *J. Sci. Food Agric.* 92, 292–298.

Li, Y., Hruby, A., Bernstein, A.M., Ley, S.H., Wang, D.D., Chiuve, S.E., Sampson, L., Rexrode, K.M., Rimm, E.B., Willett, W.C., et al. (2015). Saturated Fats Compared with Unsaturated Fats and Sources of Carbohydrates in Relation to Risk of Coronary Heart Disease A Prospective Cohort Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 66, 1538–1548.

Lieske, B., and Konrad, G. (1996). Physico-chemical and functional properties of whey protein as affected by limited papain proteolysis and selective ultrafiltration. *Int. Dairy J.* 6, 13–31.

Liu, C., Bhattarai, M., Mikkonen, K.S., and Heinonen, M. (2019). Effects of Enzymatic Hydrolysis of Fava Bean Protein Isolate by Alcalase on the Physical and Oxidative Stability of Oil-in-Water Emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 67, 6625–6632.

Lopes-da-Silva, J.A., and Monteiro, S.R. (2019). Gelling and emulsifying properties of soy protein hydrolysates in the presence of a neutral polysaccharide. *Food Chem.* 294, 216–223.

Lopes da Rosa, L.O., Santana, M.C., Avezedd, T.L., Brígoda, A.O.S., Gdddy, R., Pachecd, S., Mellonger-Solva, C., and Cabral, L.M.C. (2018). A comparison of dual-functional whey hydrolysates by the use of commercial proteases. *Food Sci. Technol.*

38, 31–36.

López-Martínez, A., and Rocha-Uribe, A. (2018). Antioxidant Hydrophobicity and Emulsifier Type Influences the Partitioning of Antioxidants in the Interface Improving Oxidative Stability in O/W Emulsions Rich in n-3 Fatty Acids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *120*, 1–10.

Łozińska, N., Głowacz-Różyńska, A., Artichowicz, W., Lu, Y., and Jungnickel, C. (2020). Microencapsulation of fish oil – determination of optimal wall material and encapsulation methodology. *J. Food Eng.* *268*.

Marín-Suárez, M., Morales-Medina, R., Guadix, E.M., and Guadix, A. (2017). A Simple Enzymatic Process to Produce Functional Lipids From Vegetable and Fish Oil Mixtures. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *119*, 1–9.

Marler, R.T., and Arora, J.S. (2010). The weighted sum method for multi-objective optimization: New insights. *Struct. Multidiscip. Optim.* *41*, 853–862.

Martínez, M. (2017). Estrés oxidativo y mecanismos de defensa antioxidante. In *Tratado de Nutrición I. Bases Fisiológicas y Bioquímicas de La Nutrición*, A. Gil, ed. pp. 627–657.

Martínez de la Victoria, E., Mañas, M., and Yago, M. (2017). Fisiología de la Digestión. In *Tratado de Nutrición I. Bases Fisiológicas y Bioquímicas de La Nutrición*, A. Gil, ed. pp. 253–293.

Masuda, T., Inaba, Y., and Takeda, Y. (2001). Antioxidant mechanism of carnosic acid: Structural identification of two oxidation products. *J. Agric. Food Chem.* *49*, 5560–5565.

McClements, D.J. (2005). *Food Emulsion Principles, Practices, and Technique* (Boca Raton: CRC Press).

McClements, D.J., and Decker, E. (2018). Interfacial Antioxidants: A Review of Natural and Synthetic Emulsifiers and Coemulsifiers That Can Inhibit Lipid Oxidation. *J. Agric. Food Chem.* *66*, 20–25.

McClements, D.J., and Decker, E.A. (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *J. Food Sci.* *65*, 1270–1282.

McClements, D.J., and Gumus, C.E. (2016). Natural emulsifiers — Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Adv. Colloid Interface Sci.* *234*, 3–26.

McClements, D.J., and Jafari, S.M. (2018). Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* *251*, 55–79.

Mei, L., McClements, D.J., Wu, J., and Decker, E.A. (1998). Iron-catalyzed lipid oxidation in emulsion as affected by surfactant, pH and NaCl. *Food Chem.* *61*, 307–312.

Mei, L., McClements, D.J., and Decker, E.A. (1999). Lipid oxidation in emulsions as affected by charge status of antioxidants and emulsion droplets. *J. Agric. Food Chem.* *47*, 2267–2273.

Merrill, L.I., Pike, O.A., Ogden, L. V., and Dunn, M.L. (2008). Oxidative stability of conventional and high-oleic vegetable oils with added antioxidants. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* *85*, 771–776.

Min, D., and Boff, J. (2002). Lipid Oxidation of Edible Oil. pp. 335–364.

Moen, V., Stoknes, I., and Breivik, H. (2017). Antioxidant Efficacy of a New Synergistic, Multicomponent Formulation for Fish Oil Omega-3 Concentrates. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* *94*, 947–957.

Morales-Medina, R., Munio, M.D.M., Galvez, R.P., Guadix, A., and Guadix, E.M. (2013). Lipids from marine sources. *Sect. Title Pharmacol.* 154–192.

Morales-Medina, R., García-Moreno, P.J., Pérez-Gálvez, R., Muñío, M., Guadix, A., and Guadix, E.M. (2015a). Seasonal variations in the regiodistribution of oil extracted from small-spotted catshark and bogue. *Food Funct.* *6*, 2646–2652.

- Morales-Medina, R., García-Moreno, P.J., Muñío, M.M., Guadix, A., and Guadix, E.M. (2015b). Optimization of  $\alpha$ -tocopherol and ascorbyl palmitate addition for the stabilization of sardine oil. *Grasas y Aceites* *66*.
- Morales-Medina, R., Tamm, F., Guadix, A.M., Guadix, E.M., and Drusch, S. (2016). Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray-drying. *Food Chem.* *194*, 1208–1216.
- Morenga, L. Te, and Montez, J.M. (2017). Health effects of saturated and trans-fatty acid intake in children and adolescents: Systematic review and meta-analysis. *PLoS One* *12*.
- Moure, A., Domínguez, H., and Parajó, J.C. (2006). Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Process Biochem.* *41*, 447–456.
- Muggli, R. (2007). Applications in food products. In Long-Chain Omega-3 Specialty Oils, H. Breivik, ed. (The Oily Press), pp. 165–195.
- Murakami, K., Ito, M., Htay, H.H., Tsubouchi, R., Iwata, S., and Yoshino, M. (2000). Antioxidant and Prooxidant Actions of Gallic Acid Derivatives: Effect on Metal-dependent Oxidation of Lipids and Low Density Lipoprotein. *Biomed. Res.* *21*, 291–296.
- Muro Urista, C., Álvarez Fernández, R., Riera Rodríguez, F., Arana Cuenca, A., and Téllez Jurado, A. (2011). Review: Production and functionality of active peptides from milk. *Food Sci. Technol. Int.* *17*, 293–317.
- Mutilangi, W.A.M., Panyam, D., Kilara, and A. (1996). Functional Properties of Hydrolysates from Proteolysis of Heat-denatured Whey Protein Isolate. *J. Food Sci.* *61*, 270–275.
- Nabavi, S.F., Bilotto, S., Russo, G.L., Orhan, I.E., Habtemariam, S., Daglia, M., Devi, K.P., Loizzo, M.R., Tundis, R., and Nabavi, S.M. (2015). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cancer: lessons learned from clinical trials. *Cancer Metastasis Rev.* *34*,

359–380.

Nagadevara, V. (2019). Advanced Regression Analysis. In International Series in Operations Research and Management Science, (Springer New York LLC), pp. 247–281.

Nelson, T.L., and Hickey, M.S. (2004). Acute changes in dietary omega-3 fatty acid intake lowers soluble interleukin-6 receptor in healthy adult normal weight and overweight males. *Cytokine* 26, 195–201.

Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., and Durrieu, V. (2012). Influence of soy protein's structural modifications on their microencapsulation properties:  $\alpha$ -Tocopherol microparticle preparation. *Food Res. Int.* 48, 387–396.

Ngo, D.H., Qian, Z.J., Ryu, B.M., Park, J.W., and Kim, S.K. (2010). In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. *J. Funct. Foods* 2, 107–117.

Nielsen, N.S., and Jacobsen, C. (2009). Methods for reducing lipid oxidation in fish-oil-enriched energy bars. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 1536–1546.

Nielsen, N.S., Petersen, A., Meyer, A.S., Timm-Heinrich, M., and Jacobsen, C. (2004). Effects of lactoferrin, phytic acid, and EDTA on oxidation in two food emulsions enriched with long-chain polyunsaturated fatty acids. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7690–7699.

Nielsen, S.N., Debnath, D., and Jacobsen, C. (2007). Oxidative stability of fish oil enriched drinking yoghurt. *Int. Dairy J.* 17, 1478–1485.

Nieto, G., Castillo, M., Xiong, Y.L., Álvarez, D., Payne, F.A., and Garrido, M.D. (2009). Antioxidant and emulsifying properties of alcalase-hydrolyzed potato proteins in meat emulsions with different fat concentrations. *Meat Sci.* 83, 24–30.

Ogawa, S., Decker, E.A., and McClements, D.J. (2003). Influence of Environmental Conditions on the Stability of Oil in Water Emulsions Containing Droplets Stabilized by Lecithin – Chitosan Membranes. *J. Food Sci.* 74, 5522–5527.

- Ohlsson, L. (2010). Dairy products and plasma cholesterol levels. *Food Nutr. Res.* *54*, 21192.
- Orsavova, J., Misurcova, L., Vavra Ambrozova, J., Vicha, R., and Mlcek, J. (2015). Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 12871–12890.
- Ortega, R., Mena, M., and Carvajales, A. (2017). Vitamina A. In *Tratado de Nutrición I. Bases Fisiológicas y Bioquímicas de La Nutrición*, A. Gil, ed. pp. 759–787.
- Oterhals, Å., and Berntssen, M.H.G. (2010). Effects of refining and removal of persistent organic pollutants by short-path distillation on nutritional quality and oxidative stability of fish oil. *J. Agric. Food Chem.* *58*, 12250–12259.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of browning products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J. Nutr.* *44*, 307–315.
- Özyurt, G., and Durmu, M. (2020). *LWT - Food Science and Technology* The potential use of recovered fish protein as wall material for microencapsulated anchovy oil. *129*.
- Pacheco-Aguilar, R., Mazorra-Manzano, M.A., and Ramírez-Suárez, J.C. (2008). Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food Chem.* *109*, 782–789.
- Pan, X., Fang, Y., Wang, L., Xie, M., Hu, B., Zhu, Y., Zhao, E., Pei, F., Shen, F., Li, P., et al. (2019). Effect of enzyme types on the stability of oil-in-water emulsions formed with rice protein hydrolysates. *J. Sci. Food Agric.* *99*, 6731–6740.
- Panish, E., Li, S., and Bell, A. (2002). Chemistry of waxes and sterols. In *Lipids*, C.C. Akoh, ed. p.
- Park, E.Y., Murakami, H., Mori, T., and Matsumura, Y. (2005). Effects of protein and peptide addition on lipid oxidation in powder model system. *J. Agric. Food Chem.* *53*, 137–144.

- Park, P., Jung, W., Nam, K., Shahidi, F., and Kim, S. (2001). Purification and Characterization of Antioxidative Peptides from Protein Hydrolysate of Lecithin-Free Egg Yolk. *78*, 651–656.
- De Paula Paseto Fernandes, R., Trindade, M.A., and De Melo, M.P. (2018). Natural Antioxidants and Food Applications: Healthy Perspectives. In *Alternative and Replacement Foods*, (Elsevier Inc.), pp. 32–64.
- Pearce, K.N., and Kinsella, J.E. (1978). Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. *J. Agric. Food Chem.* *26*, 716–723.
- Peña-Ramos, E.A., and Xiong, Y.L. (2002). Antioxidant Activity of Soy Protein Hydrolysates in a Liposomal System. *J. Food Sci.* *67*, 2952–2956.
- Peña-Ramos, E.A., and Xiong, Y.L. (2003). Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties. *Meat Sci.* *64*, 259–263.
- Peña-Ramos, E.A., Xiong, Y.L., and Arteaga, G.E. (2004). Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. *J. Sci. Food Agric.* *84*, 1908–1918.
- Peng, X., Kong, B., Xia, X., and Liu, Q. (2010). Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase. *Int. Dairy J.* *20*, 360–365.
- Pérez-Gálvez, R., Espejo-Carpio, F.J., Morales-Medina, R., García-Moreno, P.J., Guadix-Escobar, A., and Guadix-Escobar, E. (2018). Fish Discards as Source of Health-Promoting Biopeptides. In *Alternative and Replacement Foods*, (Elsevier Inc.), pp. 177–204.
- Perez-Mateos, M., Gomez-Guillen, M.C., Hurtado, J.L., Solas, M.T., and Montero, P. (2002). The effect of rosemary extract and omega-3 unsaturated fatty acids on the properties of gels made from the flesh of mackerel ( *Scomber scombrus* ) by high pressure and heat treatments. *79*, 1–8.
- Perez-Mateos, M., Lanier, T.C., and Boyd, L.C. (2006). Effects of rosemary and green

tea extracts on frozen surimi gels fortified with omega-3 fatty. *567*, 558–567.

Pernin, A., Bosc, V., Soto, P., Le Roux, E., and Maillard, M.N. (2019). Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions Rich in Omega-3: Effect of Aqueous Phase Viscosity, Emulsifiers, and Antioxidants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *1800462*.

Petursson, S., Decker, E.A., and McClements, D.J. (2004). Stabilization of oil-in-water emulsions by cod protein extracts. *J. Agric. Food Chem.* *52*, 3996–4001.

Phoon, P.Y., San Martin-Gonzalez, M.F., and Narsimhan, G. (2014). Effect of hydrolysis of soy  $\beta$ -conglycinin on the oxidative stability of O/W emulsions. *Food Hydrocoll.* *35*, 429–443.

Picot, L., Ravallec, R., Martine, F.P., Vandanjon, L., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., Guérard, F., Chabeaud, A., Legal, Y., Alvarez, O.M., et al. (2010). Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *J. Sci. Food Agric.* *90*, 1819–1826.

Polavarapu, S., Oliver, C.M., Ajlouni, S., and Augustin, M.A. (2011). Physicochemical characterisation and oxidative stability of fish oil and fish oil-extra virgin olive oil microencapsulated by sugar beet pectin. *Food Chem.* *127*, 1694–1705.

Ponginebbi, L., and Publisi, C. (2008). Coating for oxygen sensitive materials.

Porsgaard, T. (2006). Clinical Studies with Structured Triacylglycerols. In *Handbook of Functional Lipids*, C.C. Akoh, ed. pp. 419–436.

Porter, W.L. (1993). Porter WL. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. *Toxicol Ind Heal.* *93*–122.

Qi, M., Hettiarachchy, N.S., and Kalapathy, U. (1997). Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. *J. Food Sci.* *62*, 1110–1115.

Qian, Z.J., Jung, W.K., and Kim, S.K. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresour. Technol.* *99*, 1690–1698.

- Qiu, C., Zhao, M., Decker, E.A., and McClements, D.J. (2015). Influence of protein type on oxidation and digestibility of fish oil-in-water emulsions: Gliadin, caseinate, and whey protein. *Food Chem.* 175, 249–257.
- Rangel-Huerta, O.D., and Gil, A. (2018). Omega 3 fatty acids in cardiovascular disease risk factors: An updated systematic review of randomised clinical trials. *Clin. Nutr.* 37, 72–77.
- Ratnayake, W.M.N., and Galli, C. (2009). Fat and Fatty Acid Terminology, Methods of Analysis and Fat Digestion and Metabolism: A Background Review Paper. *Ann. Nutr. Metab.* 55, 8–43.
- Reische, D.W., Lillard, D.A., and Eitenmiller, R.R. (2002). Antioxidants. In *Food Lipids*, C.C. Akoh, ed. pp. 409–430.
- Ries, D., Ye, A., Haisman, D., and Singh, H. (2010). Antioxidant properties of caseins and whey proteins in model oil-in-water emulsions. *Int. Dairy J.* 20, 72–78.
- Rusli, J.K., Sanguansri, L., and Augustin, M.A. (2006). Stabilization of oils by microencapsulation with heated protein-glucose syrup mixtures. *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* 83, 965–972.
- Sabeena Farvin, K.H., Andersen, L.L., Nielsen, H.H., Jacobsen, C., Jakobsen, G., Johansson, I., and Jessen, F. (2014). Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. *Food Chem.* 149, 326–334.
- Sakanaka, S., and Tachibana, Y. (2006). Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. *Food Chem.* 95, 243–249.
- Saleeb, F.Z., and Arora, V.K. (1999). Method of preparing glass stabilized material.
- Sánchez, A., and Ortega de la Torre, M.A. (2017). Metabolismo Lipídico Tisular. In *Tratado de Nutrición I. Bases Fisiológicas y Bioquímicas de La Nutrición*, A. Gil, ed. pp. 397–429.

- Sarmadi, B.H., and Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* 31, 1949–1956.
- Sbroggio, M.F., Montilha, M.S., Figueiredo, V.R.G. de, Georgetti, S.R., and Kurozawa, L.E. (2016). Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. *Food Sci. Technol.* 36, 375–381.
- Scaioli, E., Liverani, E., and Belluzzi, A. (2017). The imbalance between N-6/N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease: A comprehensive review and future therapeutic perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
- Schaich, K.M., Shahidi, F., Ying, Z., and Michael, E. (2013). *Lipid oxidation*. (Elsevier), pp. 557–600.
- Scherze, I., and Muschiolik, G. (2001). Effects of various whey protein hydrolysates on the emulsifying and surface properties of hydrolysed lecithin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 21, 107–117.
- Schmid, G., Harrison, M., and Polchinski, P. (2001). Process of stabilization of acylglycerols comprising high amounts of omega-3 polyunsaturated fatty acids by means of gamma cyclodextrin.
- Schröder, A., Berton-Carabin, C., Venema, P., and Cornacchia, L. (2017). Interfacial properties of whey protein and whey protein hydrolysates and their influence on O/W emulsion stability. *Food Hydrocoll.* 73, 129–140.
- Serfert, Y., Schröder, J., Mescher, A., Laackmann, J., Rätzke, K., Shaikh, M.Q., Gaukel, V., Moritz, H.U., Schuchmann, H.P., Walzel, P., et al. (2013). Spray drying behaviour and functionality of emulsions with  $\beta$ -lactoglobulin/pectin interfacial complexes. *Food Hydrocoll.* 31, 438–445.
- Shahidi, F. (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung* 44, 158–163.
- Shahidi, F., and Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *J. Funct. Foods* 18, 820–897.

- Shahidi, F., and Ambigaipalan, P. (2018). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* *9*, 345–381.
- Shahidi, F., and Zhong, Y. (2010). Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chem. Soc. Rev.* *39*, 4067–4079.
- Shao, Y., and Tang, C.H. (2014). Characteristics and oxidative stability of soy protein-stabilized oil-in-water emulsions: Influence of ionic strength and heat pretreatment. *Food Hydrocoll.* *37*, 149–158.
- Shen, Z., and Wijesundera, C. (2009). Effects of docosahexaenoic acid positional distribution on the oxidative stability of model triacylglycerol in water emulsion. *J. Food Lipids* *16*, 62–71.
- Sila, A., and Bougatef, A. (2016). Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *J. Funct. Foods* *21*, 10–26.
- Silva, R., Losada-Barreiro, S., Paiva-Martins, F., and Bravo-Díaz, C. (2017). Partitioning and antioxidative effect of protocatechuates in soybean oil emulsions: Relevance of emulsifier concentration. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *119*.
- Simopoulos, A.P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* *56*, 365–379.
- Simopoulos, A.P. (2008). The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. *Exp. Biol. Med.* *233*, 674–688.
- Simopoulos, A.P. (2016). An increase in the Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients* *8*, 1–17.
- Singh, A., and Banerjee, R. (2013). Peptide enriched functional food adjunct from soy whey: A statistical optimization study. *Food Sci. Biotechnol.* *22*, 65–71.
- Sinha, R., Radha, C., Prakash, J., and Kaul, P. (2007). Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chem.* *101*, 1484–1491.

- Small, D.M. (1991). The effects of glyceride structure on absorption and metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* *11*, 413–434.
- Smit, L.A., Mozaffarian, D., and Willett, W. (2009). Review of Fat and Fatty Acid Requirements and Criteria for Developing Dietary Guidelines. *Ann. Nutr. Metab.* *55*, 44–55.
- Soottitantawat, A., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., and Linko, P. (2003). Microencapsulation by spray drying: Influence of emulsion size on the retention of volatile compounds. *J. Food Sci.* *68*, 2256–2262.
- Sørensen, A.-D.M. (2010). The influence of ingredients or lipophilized antioxidants on the oxidative stability of fish oil enriched food systems.
- Sørensen, A.D.M., Haahr, A.M., Becker, E.M., Skibsted, L.H., Bergenståhl, B., Nilsson, L., and Jacobsen, C. (2008). Interactions between iron, phenolic compounds, emulsifiers, and pH in omega-3-enriched oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* *56*, 1740–1750.
- Sørensen, A.D.M., Nielsen, N.S., and Jacobsen, C. (2010). Oxidative stability of fish oil-enriched mayonnaise-based salads. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *112*, 476–487.
- Sprague, M., and Tocher, M.B.B.D.R. (2017). Microbial and genetically engineered oils as replacements for fish oil in aquaculture feeds. *Biotechnol. Lett.* *39*, 1599–1609.
- Stadtman, E. (1993). Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins by Radiolysis and by Metal-Catalyzed Reactions. *Annu. Rev. Biochem.* *62*, 797–821.
- Stephansen, K., Chronakis, I.S., and Jessen, F. (2014). Bioactive electrospun fish sarcoplasmic proteins as a drug delivery system. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* *122*, 158–165.
- Stöckmann, H., Schwarz, K., and Huynh-Ba, T. (2000). Influence of various emulsifiers on the partitioning and antioxidant activity of hydroxybenzoic acids and their derivatives in oil-in-water emulsions. *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* *77*, 535–542.

- Taheri, A., Farvin, K.H.S., Jacobsen, C., and Baron, C.P. (2014). Antioxidant activities and functional properties of protein and peptide fractions isolated from salted herring brine. *Food Chem.* *142*, 318–326.
- Taherian, A.R., Britten, M., Sabik, H., and Fustier, P. (2011). Ability of whey protein isolate and/or fish gelatin to inhibit physical separation and lipid oxidation in fish oil-in-water beverage emulsion. *Food Hydrocoll.* *25*, 868–878.
- Takeungwongtrakul, S., Benjakul, S., and H-kittikun, A. (2015). Wall materials and the presence of antioxidants influence encapsulation efficiency and oxidative stability of micro-encapsulated shrimp oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *117*, 450–459.
- Tamm, F., Sauer, G., Scampicchio, M., and Drusch, S. (2012). Pendant drop tensiometry for the evaluation of the foaming properties of milk-derived proteins. *Food Hydrocoll.* *27*, 371–377.
- Tamm, F., Gies, K., Diekmann, S., Serfert, Y., Strunskus, T., Brodkorb, A., and Drusch, S. (2015). Whey protein hydrolysates reduce autoxidation in microencapsulated long chain polyunsaturated fatty acids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *117*, 1960–1970.
- Tamm, F., Herbst, S., Brodkorb, A., and Drusch, S. (2016a). Functional properties of pea protein hydrolysates in emulsions and spray-dried microcapsules. *Food Hydrocoll.* *58*, 204–214.
- Tamm, F., Härter, C., Brodkorb, A., and Drusch, S. (2016b). Functional and antioxidant properties of whey protein hydrolysate/pectin complexes in emulsions and spray-dried microcapsules. *LWT - Food Sci. Technol.* *73*, 524–527.
- Tavano, O.L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *90*, 1–11.
- Theodore, A.E., Raghavan, S., and Kristinsson, H.G. (2008). Antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolates. *J. Agric. Food Chem.* *56*, 7459–7466.
- Timm-Heinrich, M., Xu, X., Nielsen, N.S., and Jacobsen, C. (2003). Oxidative stability

of milk drinks containing structured lipids produced from sunflower oil and caprylic acid. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *105*, 459–470.

Timm-Heinrich, M., Xu, X., Nielsen, N.S., and Jacobsen, C. (2004). Oxidative stability of mayonnaise and milk drink produced with structured lipids based on fish oil and caprylic acid. *Eur. Food Res. Technol.* *219*, 32–41.

Tonon, R. V., Grosso, C.R.F., and Hubinger, M.D. (2011). Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. *Food Res. Int.* *44*, 282–289.

Trojanowska, A., Giamberini, M., Tsibranska, I., Nowak, M., Marciniak, Ł., Jatrزاب, R., and Tylkowski, B. (2017). Microencapsulation in food chemistry. *J. Membr. Sci. Res.* *3*, 265–271.

Uauya, R., Hoffman, D.R., Peirano, P., Birch, D.G., and Birch, E. (2001). Essential Fatty Acids in Visual and Brain Development. *Lipids* *36*.

Valenzuela, A., and Dagach-Imbarack, R.U. (2017). Funciones Biológicas y Metabolismo de los Ácidos Grasos Esenciales y sus Derivados Activos. In *Tratado de Nutrición I. Bases Fisiológicas y Bioquímicas de La Nutrición*, A. Gil, ed. pp. 433–450.

Vas Dias, F.W. (2015). Authorised EU health claims for DHA and EPA (Elsevier Ltd.).

Vaucher, A.C. dos S., Dias, P.C.M., Coimbra, P.T., Costa, I. dos S.M., Marreto, R.N., Dellamora-Ortiz, G.M., De Freitas, O., and Ramos, M.F.S. (2019). Microencapsulation of fish oil by casein-pectin complexes and gum arabic microparticles: oxidative stabilisation. *J. Microencapsul.* *36*, 459–473.

Vavrusova, M., Pindstrup, H., Johansen, L.B., Andersen, M.L., Andersen, H.J., and Skibsted, L.H. (2015). Characterisation of a whey protein hydrolysate as antioxidant. *Int. Dairy J.* *47*, 86–93.

Vázquez, L., and Akoh, C.C. (2012). Enrichment of stearidonic acid in modified soybean oil by low temperature crystallisation. *Food Chem.* *130*, 147–155.

Vázquez, J.A., Fernández-Compás, A., Blanco, M., Rodríguez-Amado, I., Moreno, H.,

- Borderías, J., and Pérez-Martín, R.I. (2019). Development of bioprocesses for the integral valorisation of fish discards. *Biochem. Eng. J.* *144*, 198–208.
- Velasco, J., Dobarganes, C., and Márquez-Ruiz, G. (2003). Variables affecting lipid oxidation in dried microencapsulated oils. *Grasas y Aceites* *54*, 304–314.
- Villiere, A., Viau, M., Bronnec, I., Moreau, N., and Genot, C. (2005). Oxidative stability of bovine serum albumin- and sodium caseinate-stabilized emulsions depends on metal availability. *J. Agric. Food Chem.* *53*, 1514–1520.
- Walker, R., Decker, E.A., and McClements, D.J. (2015). Development of food-grade nanoemulsions and emulsions for delivery of omega-3 fatty acids: Opportunities and obstacles in the food industry. *Food Funct.* *6*, 42–55.
- Wall, R., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., and Stanton, C. (2010). Fatty acids from fish: The anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr. Rev.* *68*, 280–289.
- Wang, D.D., Li, Y., Chiuve, S.E., Stampfer, M.J., Manson, J.A.E., Rimm, E.B., Willett, W.C., and Hu, F.B. (2016a). Association of specific dietary fats with total and cause-specific mortality. *JAMA Intern. Med.* *176*, 1134–1145.
- Wang, S., Yang, J., Shao, G., Qu, D., Zhao, H., Yang, L., Zhu, L., He, Y., Liu, H., and Zhu, D. (2020). Soy protein isolated-soy hull polysaccharides stabilized O/W emulsion: Effect of polysaccharides concentration on the storage stability and interfacial rheological properties. *Food Hydrocoll.* *101*, 105490.
- Wang, Y., Liu, W., Chen, X.D., and Selomulya, C. (2016b). Micro-encapsulation and stabilization of DHA containing fish oil in protein-based emulsion through mono-disperse droplet spray dryer. *J. Food Eng.* *175*, 74–84.
- Watkins, S.M., and German, J.B. (2008). Unsaturated Fatty Acids. In *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, C.C. Akoh, ed. pp. 513–539.
- Weichselbaum, E., Coe, S., Buttriss, J., and Stanner, S. (2013). Fish in the diet: A review. *Nutr. Bull.* *38*, 128–177.
- WHO/FAO (2003). *Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas*. 1–152.

Willis, W.M., Lencki, R.W., and Marangoni, A.G. (2011). Lipid Modification Strategies in the Production of Nutritionally Functional Fats and Oils. *Lipid Modification Strategies in the Production of Nutritionally Functional Fats and Oils*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 37–41.

Wreesmann, C.T.J. (2011). Food preservation with EDTA: Particularly of interest for omega-3 enriched products? *Agro Food Ind. Hi. Tech.* 22, 44–48.

Wu, H.C., Chen, H.M., and Shiau, C.Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res. Int.* 36, 949–957.

Wu, Z., Wu, J., Zhang, R., Yuan, S., Lu, Q., and Yu, Y. (2018). Colloid properties of hydrophobic modified alginate: Surface tension,  $\zeta$ -potential, viscosity and emulsification. *Carbohydr. Polym.* 181, 56–62.

Xu, X. (2000). Enzymatic production of structured lipids: Process reactions and acyl migration. *Inf. - Int. News Fats, Oils Relat. Mater.* 11, 1121–1130.

Yang, L.G., Song, Z.X., Yin, H., Wang, Y.Y., Shu, G.F., Lu, H.X., Wang, S.K., and Sun, G.J. (2016). Low n-6/n-3 PUFA Ratio Improves Lipid Metabolism, Inflammation, Oxidative Stress and Endothelial Function in Rats Using Plant Oils as n-3 Fatty Acid Source. *Lipids* 51, 49–59.

Yordi, E.G., Pérez, E.M., Matos, M.J., and Villares, E.U. (2012). Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure activity relationship evidence. In *Nutrition, Well-Being and Health*, Jaouad Bouayed and Torsten Bohn, ed. pp. 23–49.

Zamberletti, E., Piscitelli, F., De Castro, V., Murru, E., Gabaglio, M., Colucci, P., Fanali, C., Prini, P., Bisogno, T., Maccarrone, M., et al. (2017). Lifelong imbalanced LA/ALA intake impairs emotional and cognitive behavior via changes in brain endocannabinoid system. *J. Lipid Res.* 58, 301–316.

Zhang, L., Li, J., and Zhou, K. (2010). Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. *Bioresour. Technol.* 101, 2084–2089.

Zhang, S., Kawakami, K., Yamamoto, M., Masaoka, Y., Kataoka, M., Yamashita, S., and Sakuma, S. (2011). Coaxial electrospray formulations for improving oral absorption of a poorly water-soluble drug. *Mol. Pharm.* 8, 807–813.

Zhang, W., Yan, C., May, J., and Barrow, C.J. (2009). Whey protein and gum arabic encapsulated Omega-3 lipids the effect of material properties on coacervation. *Agro Food Ind. Hi. Tech.* 20, 18–21.

Zhang, Y., Tan, C., Abbas, S., Eric, K., Zhang, X., Xia, S., and Jia, C. (2014). The effect of soy protein structural modification on emulsion properties and oxidative stability of fish oil microcapsules. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 120, 63–70.

Zhang, Y., Tan, C., Abbas, S., Eric, K., Xia, S., and Zhang, X. (2015). Modified SPI improves the emulsion properties and oxidative stability of fish oil microcapsules. *Food Hydrocoll.* 51, 108–117.

Zhang, Y., Niu, F., Zhang, X., Lu, Z., Guo, Y., and Wang, H. (2018). Controlled enzymatic hydrolysis on characteristic and antioxidant properties of soybean protein isolate-maltodextrin conjugates. *Int. J. Food Prop.* 21, 2239–2249.

Zhang, Y., Pang, X., Zhang, S., Liu, L., Ma, C., Lu, J., and Lyu, J. (2020). Buttermilk as a wall material for microencapsulation of omega-3 oils by spray drying. *Lwt* 127.

Zhao, J., and Xiong, Y.L. (2015). Interfacial peptide partitioning and undiminished antioxidative and emulsifying activity of oxidatively stressed soy protein hydrolysate in an O/W emulsion. *LWT - Food Sci. Technol.* 61, 322–329.

Zhao, X., and Hou, Y. (2009). Limited hydrolysis of soybean protein concentrate and isolate with two proteases and the impact on emulsifying activity index of hydrolysates. *African J. Biotechnol.* 8, 3314–3319.

Zhou, J., Wang, X., Ai, T., Cheng, X., Guo, H.Y., Teng, G.X., and Mao, X.Y. (2012). Preparation and characterization of  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysate-iron complexes. *J. Dairy Sci.* 95, 4230–4236.

Zhu, K., Zhou, H., and Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging

activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochem.* *41*, 1296–1302.

Zhu, L., Xu, Q., Liu, X., Xu, Y., Yang, L., Wang, S., Li, J., Ma, T., and Liu, H. (2020). Oil-water interfacial behavior of soy  $\beta$ -conglycinin–soyasaponin mixtures and their effect on emulsion stability. *Food Hydrocoll.* *101*, 105531.

Zuta, P.C., Simpson, B.K., Zhao, X., and Leclerc, L. (2007). The effect of  $\alpha$ -tocopherol on the oxidation of mackerel oil. *Food Chem.* *100*, 800–807.