



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**TESIS:**

**“Obtención de productos enriquecidos en proteínas de la hez de malta. Estudio de las propiedades tecnológicas y su potencial aplicación”**

*Autor: Ing. Janina Proaño*

*Directora: Dra. Silvina R. Drago*

*Codirectora: Dra. Adriana N. Mauri*

Dedicada a mi querida familia  
Darwin y Agustín.

## **PUBLICACIONES**

La presente tesis dio lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones a reuniones científicas:

### ***Publicaciones en revistas científicas***

- Proaño J.L., Pérez A.A., & Drago S.R. (2022). Foaming properties are improved by interactions between brewer's spent grain proteins and carrageenans in aqueous solution. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12291>
- Cian R.E., Proaño J.L., Salgado P.R., Mauri A.N., & Drago S.R. (2021). High iron bioaccessibility from co-microencapsulated iron/ascorbic acid using chelating polypeptides from brewers' spent grain protein as wall material. *LWT*, 139, 110579. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110579>
- Proaño J.L., Cian E.R., Salgado P.R., Mauri A.N., Drago S.R. (2020). Physical, structural and antioxidant properties of brewer's spent grain protein films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(15), 5458-5465. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10597>

### ***Trabajos completos presentados en reuniones científicas***

- Proaño J.L. Efecto del pH y la concentración de biopolímeros en las propiedades interfaciales de sistemas mixtos formados por proteínas de hez de malta y carrageninas. Encuentro de Jóvenes Investigadores de Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe-Argentina. 5 al 7 de octubre del 2021
- Proaño J.L. Películas biodegradables de proteínas de hez de malta con actividad antioxidante. Encuentro de Jóvenes Investigadores de Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe-Argentina. 9 al 10 de octubre del 2019

### ***Resúmenes presentados en reuniones científicas***

- Proaño L.J., Pérez A., Drago S.R. Estudio de la interacción en fase acuosa de proteínas de hez de malta y carrageninas. Congreso Iberoamericano de Ingeniería de los Alimentos. Montevideo- Uruguay. 18 al 20 de noviembre 2020.
- Proaño J.L., Cian R.E., Salgado P.R., Mauri A.N., Drago S.R. Estudio de la microencapsulación de hierro ( $Fe^{2+}$ ) con proteínas de hez de malta. XXI Congreso Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos. XVII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. CABA, Argentina, 20 al 22 de noviembre del 2019. Archivo Digital: descarga ISBN 978-987-22165-9-7
- Proaño J.L., Cian R.E., Salgado P.R., Mauri A.N., Drago S.R. Obtención de películas biodegradables a partir de proteínas de hez de malta. XXI Congreso Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos. XVII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. CABA, Argentina, 20 al 22 de noviembre del 2019. Archivo Digital: descarga ISBN 978-987-22165-9-7
- Proaño J.L., Cian R.E., Drago S.R. Propiedades antioxidantes de péptidos provenientes de hez de malta y su estabilidad frente al ambiente gastrointestinal. VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Córdoba, Argentina, 1 al 3 de octubre del 2018. Archivo Digital: descarga ISBN 978-987-45380-9-3

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera expresar mi gratitud a la Santísima Trinidad y a la Virgen por permitirme estar aquí hoy, por bendecirme con alegría, por ser mi luz, mi esperanza y mi guía.

A Darwin, por el apoyo incondicional y aportes en esta etapa y por tu amor.

Asimismo, me gustaría agradecer a mis padres Gladys y Rodrigo, quienes ocupan una parte importante en mi mente y corazón, por estar siempre presentes, por haberme formado e incentivado en todo lo que me propuesto.

A mi hermana Maite, por hacerme reír siempre a pesar de la distancia y apoyarme siempre.

A mi hermano Víctor, por su ayuda y asesoramiento en aspectos informáticos.

A mis tías y abuela, por sus llamadas constantes de incentivación y motivación.

De manera especial a Silvina Drago, mi directora de tesis, por haberme brindado la oportunidad para realizar mi tesis doctoral abriéndome las puertas del laboratorio, por su valiosa orientación a lo largo de mi trabajo experimental, por la confianza y sus valiosos aportes, por su tiempo y predisposición.

A Antonella, Raúl, Mica por su paciencia para responder todas mis inquietudes y por el cariño recibido durante estos años.

A Samaria, quienes han influenciado en mi vida, ¡mis hermanos en Cristo!

A mis amigos, a las auroras, after ITA, y compañeros de laboratorio, por el tiempo compartido durante esta etapa de nuestras vidas. Por todos los almuerzos compartidos y after office. Gracias por la paciencia dada.

A la mesa ocho por su sincera amistad, por todas las tardes compartidas, cumpleaños, juntadas, ¡¡meriendas, etc., muchas gracias, amigas!!

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) por haberme permitido desarrollar parte de mi tesis en sus laboratorios. Agradezco

especialmente a la Dra. Adriana Mauri y el Dr. Pablo Salgado por su cariño y predisposición.

A Adrián Pérez, por su buena predisposición y ayuda no solo en aspectos académicos sino también personales.

A Osvaldo Sponton por su buena predisposición y la ayuda brindada.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET) por el otorgamiento de la beca de posgrado.

Al Instituto de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) dependiente de la Universidad Nacional (UNL) por la enseñanza recibida y por brindarme el espacio para desarrollar mis actividades de investigación.

A todos los miembros del Instituto de Tecnología de Alimentos, por sus colaboraciones en el trabajo de tesis y su predisposición a ayudar.

A TODOS, MUCHAS GRACIAS

# ÍNDICE

Abreviaturas y Símbolos .....	14
Resumen .....	15
Abstract .....	20
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>22</b>
I.1. Industria cervecera .....	23
I.2. Producción de cebada .....	25
I.3. Composición y morfología del grano de cebada .....	26
I.4. Proteínas de la cebada .....	27
I.5. Proteínas de la malta .....	28
I.6. Generación de residuos en la industria cervecera .....	29
I.7. Hez de malta .....	30
I.7.1. Composición de la hez de malta .....	31
I.7.2. Proteínas .....	33
I.7.3. Aplicaciones de hez de malta .....	34
I.7.4. Extracción y recuperación de proteínas de hez de malta .....	35
I.8. Propiedades tecno-funcionales de las proteínas .....	36
I.8.1. Propiedades tecno-funcionales de proteínas de hez de malta .....	37
I.8.2. Películas biodegradables y/o comestibles .....	40
I.8.3. Propiedades espumantes de las proteínas .....	45
I.8.3.1. Polisacáridos: carrageninas .....	45
I.8.3.2. Interacciones entre biopolímeros .....	47
I.8.4. Microencapsulación .....	50
I.8.4.1. Secado por pulverización ( <i>spray-drying</i> ) .....	50
I.8.4.2. Materiales de pared .....	51
I.8.4.3. Microencapsulación del hierro .....	52
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>54</b>
II.1. Objetivo General: .....	55
II.2. Objetivos Específicos: .....	55
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>56</b>
III.1. Obtención y caracterización de concentrados proteicos de la hez de malta .....	57
III.1.1. Materia prima .....	57
III.1.2. Caracterización de la composición de hez de malta .....	57
III.1.2.1. Determinación de la composición centesimal .....	57
III.1.2.2. Determinación del contenido de ácidos grados libres .....	57

III.1.2.3.	Perfil de aminoácidos .....	58
III.2.	Obtención y caracterización del concentrado proteico de hez de malta .....	59
III.2.1.	Elección del pH de extracción .....	59
III.2.2.	Elección de la temperatura y del tiempo de extracción .....	59
III.2.3.	Estudio de pre-tratamientos facilitadores de la extracción .....	60
III.2.4.	Obtención de concentrados proteicos de hez de malta (CP) .....	61
III.2.5.	Caracterización del concentrado proteico de hez de malta .....	61
III.2.5.1.	Composición centesimal .....	61
III.2.5.2.	Compuestos fenólicos .....	61
III.2.5.3.	Perfil de aminoácidos .....	61
III.2.5.4.	Perfil electroforético .....	62
III.2.5.5.	Perfil de pesos moleculares por FPLC .....	62
III.2.5.6.	Potencial $\zeta$ , punto isoelectrico y tamaño de partícula de las dispersiones . .....	63
III.2.6.	Propiedades tecno-funcionales del concentrado proteico de hez de malta	64
III.2.6.1.	Solubilidad.....	64
III.2.6.2.	Absorción de agua.....	64
III.2.7.	Capacidad de formar geles .....	65
III.2.7.1.	Mínima concentración de gelificación (MCG) .....	65
III.2.7.2.	Retención de agua .....	65
III.2.7.3.	Análisis de Perfil de Textura (TPA) de los geles .....	65
III.2.8.	Análisis estadísticos .....	67
III.3.	Propiedades filmogénicas de las proteínas de HM.....	68
III.3.1.	Materiales.....	68
III.3.2.	Obtención de películas.....	68
III.3.3.	Caracterización de las películas de proteínas de HM .....	69
III.3.3.1.	Espesor.....	69
III.3.3.2.	Propiedades ópticas de las películas .....	69
III.3.3.2.1.	Color (CIE-Lab) .....	69
III.3.3.2.2.	Opacidad .....	70
III.3.3.3.	Susceptibilidad de las películas al agua .....	71
III.3.3.3.1.	Contenido de humedad .....	71
III.3.3.3.2.	Solubilidad en agua.....	71
III.3.3.3.3.	Permeabilidad al vapor de agua (PVA).....	72
III.3.3.4.	Propiedades mecánicas .....	73

III.3.3.5.	Propiedades estructurales .....	74
III.3.3.5.1.	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR).....	74
III.3.3.6.	Propiedades bioactivas de las películas .....	75
III.3.3.6.1.	Ensayo de bloqueo del radical ABTS <sup>+</sup> .....	75
III.3.3.6.2.	Poder reductor .....	76
III.3.3.6.3.	Bloqueo de radicales del ácido linoleico .....	76
III.3.3.6.4.	Actividad antimicrobiana .....	76
III.3.4.	Análisis estadísticos .....	77
III.4.	Estudio de la interacción de las carrageninas con las proteínas de hez de malta en fase acuosa. Capacidad de formar Espumas .....	77
III.4.1.	Materiales .....	77
III.4.2.	Obtención de los sistemas .....	77
III.4.3.	Mediciones de turbidez .....	78
III.4.4.	Espectroscopia de fluorescencia intrínseca .....	78
III.4.5.	Hidrofobicidad superficial.....	79
III.4.6.	Tamaño de partícula y potencial $\zeta$ .....	79
III.4.7.	Medición de las propiedades dinámicas de la superficie .....	79
III.4.8.	Reología superficial.....	81
III.4.9.	Propiedades de espumado por el método de burbujeo .....	81
III.4.10.	Capacidad de espumado .....	81
III.4.11.	Estabilidad de las espumas.....	82
III.4.12.	Análisis estadísticos.....	82
III.5.	Evaluación de los concentrados proteicos de hez de malta como agente de encapsulación del hierro .....	83
III.5.1.	Materias primas .....	83
III.5.2.	Obtención de las microcápsulas .....	83
III.5.3.	Evaluación del proceso de encapsulación y de las propiedades de las microcápsulas.....	84
III.5.3.1.	Determinación de la composición de las microcápsulas .....	84
III.5.3.1.1.	Contenido de proteínas y humedad .....	84
III.5.3.1.2.	Contenido de hierro.....	84
III.5.3.1.3.	Contenido de ácido ascórbico (AA) .....	85
III.5.3.2.	Determinación de la eficiencia de encapsulación .....	85
III.5.3.3.	Caracterización de las microcápsulas.....	85
III.5.3.3.1.	Morfología y tamaño.....	85

III.5.3.3.2.	Potencial $\zeta$ .....	86
III.5.3.3.3.	Hidrofobicidad superficial de microcápsulas.....	86
III.5.3.3.4.	Determinación del hierro quelado .....	87
III.5.3.3.5.	Densidad .....	88
III.5.3.3.6.	Color (CIE-Lab) .....	88
III.5.3.3.7.	Isotermas de sorción.....	88
III.5.3.3.8.	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) .....	89
III.5.3.4.	Evaluación del pH gastrointestinal en la liberación de hierro microencapsulado y proteínas .....	90
III.5.3.5.	Determinación de la bioaccesibilidad de Fe.....	90
III.5.3.6.	Optimización del modelo de validación.....	91
III.5.4.	Análisis estadísticos .....	92
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	93
IV.1.	CAPÍTULO: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CONCENTRADOS PROTEICOS DE HEZ DE MALTA .....	94
IV.1.1.	Composición de Hez de Malta .....	95
IV.1.1.1.	Perfil de aminoácidos .....	96
IV.1.2.	Estudio del proceso de obtención de concentrados proteicos de hez de malta. ....	97
IV.1.2.1.	Efecto del pH de extracción .....	98
IV.1.2.2.	Efecto de la temperatura y del tiempo de extracción .....	99
IV.1.2.3.	Estudio de pre-tratamientos facilitadores de la extracción .....	100
IV.1.3.	Proceso de obtención de concentrado proteico (CP).....	102
IV.1.4.	Caracterización del concentrado proteico de hez de malta.....	102
IV.1.4.1.	Color .....	102
IV.1.4.2.	Composición centesimal .....	103
IV.1.4.3.	Perfil de aminoácidos .....	105
IV.1.4.4.	Perfil de pesos moleculares .....	106
IV.1.4.5.	Potencial $\zeta$ , punto Isoeléctrico y tamaño de partícula.....	107
IV.1.5.	Propiedades tecno-funcionales del concentrado proteico de hez de malta....	109
IV.1.5.1.	Solubilidad.....	109
IV.1.5.2.	Absorción de agua.....	110
IV.1.5.3.	Capacidad de formar geles de las proteínas de HM .....	111
IV.1.6.	Conclusiones parciales.....	114
IV.2.	CAPÍTULO: PELÍCULAS DE PROTEÍNAS DE HEZ DE MALTA .....	115

IV.2.1.	Selección de la formulación y condiciones de procesamiento .....	116
IV.2.2.	Efecto de la concentración de PEG en las propiedades de las películas..	118
IV.2.2.1.	Susceptibilidad al agua .....	118
IV.2.2.2.	Espesor y Propiedades ópticas .....	120
IV.2.2.3.	Propiedades Mecánicas.....	122
IV.2.2.4.	Propiedades Estructurales de las películas .....	123
IV.2.2.5.	Efecto de la concentración de PEG sobre las propiedades bioactivas de las películas .....	124
IV.2.2.5.2.	Actividad antimicrobiana .....	126
IV.2.3.	Conclusiones parciales.....	127
IV.3.	<b>CAPÍTULO: INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS DE HEZ DE MALTA Y CARRAGENINAS. PROPIEDADES ESPUMANTES</b> .....	128
IV.3.	Interacción entre proteínas de hez de malta y carrageninas. Propiedades espumantes.....	129
IV.3.1.	Interacción entre proteínas de hez de malta y carrageninas en solución acuosa. ....	129
IV.3.1.1.	Turbidez.....	129
IV.3.1.2.	Fluorescencia intrínseca de los sistemas .....	134
IV.3.1.3.	Hidrofobicidad superficial .....	137
IV.3.1.4.	Potencial $\zeta$ de los sistemas .....	141
IV.3.1.5.	Tamaño de partícula de los sistemas .....	144
IV.3.2.	Propiedades superficiales y espumantes de las proteínas de hez de malta... ..	147
IV.3.2.1.	Propiedades Interfasiales de las proteínas de HM.....	147
IV.3.2.2.	Características reológicas.....	149
IV.3.2.3.	Propiedades Espumantes de proteínas de las HM.....	150
IV.3.3.	Propiedades superficiales y espumantes de sistemas mixtos CP-CG .....	152
IV.3.3.1.	Propiedades interfaciales de los sistemas mixtos CP:i-CG.....	152
IV.3.3.2.	Propiedades reológicas de los sistemas mixtos CP:i-CG.....	154
IV.3.3.3.	Propiedades espumantes de sistemas mixtos CP-i-CG .....	156
IV.3.3.4.	Propiedades interfaciales de los sistemas mixtos CP:I-CG.....	159
IV.3.3.5.	Propiedades reológicas de los sistemas mixtos CP:I-CG.....	161
IV.3.3.6.	Propiedades espumantes de los sistemas mixtos CP:I-CG.....	162
IV.3.4.	Comparación de las propiedades interfaciales de los sistemas mixtos CP:CG .....	163
IV.3.4.1.	Comparación de las propiedades reológicas de los sistemas mixtos CP:CG .....	169

IV.3.4.2. Comparación de las propiedades espumantes de los sistemas mixtos CP:CG .....	173
IV.3.5. Conclusiones parciales.....	177
IV.4. CAPÍTULO: PROTEÍNAS DE HM COMO AGENTE DE ENCAPSULACIÓN DEL HIERRO .....	178
IV.4. Proteínas de HM como agente de encapsulación del hierro .....	179
IV.4.1. Respuestas de diseño experimental relacionadas con el proceso y características fisicoquímicas de las diferentes formulaciones de microcápsulas. .... .....	179
IV.4.1.1. Morfología y tamaño de las microcápsulas.....	180
IV.4.1.2. Eficiencia de encapsulación del hierro.....	183
IV.4.1.3. Eficiencia de encapsulación del ácido ascórbico.....	184
IV.4.1.4. Potencial $\zeta$ .....	186
IV.4.1.5. Hidrofobicidad superficial de microcápsulas .....	187
IV.4.1.6. Quelación del hierro.....	188
IV.4.1.7. Densidad.....	190
IV.4.1.8. Color de las microcápsulas.....	191
IV.4.2. Isotermas de adsorción de las microcápsulas del hierro.....	192
IV.4.3. Espectro infrarrojo (FTIR) de las microcápsulas de hierro .....	194
IV.4.4. Solubilidad del hierro y de las proteínas. Bioaccesibilidad del hierro de las microcápsulas.....	196
IV.4.4.1. Bioaccesibilidad del hierro.....	197
IV.4.4.2. Solubilidad del hierro a pH 2 y pH 6,5.....	198
IV.4.4.3. Solubilidad proteica a pH 2 y secuencial 2-6,5. ....	200
IV.4.5. Optimización y validación del modelo. ....	201
IV.5. Conclusiones parciales.....	203
V. CONCLUSIONES .....	205
Vi. BIBLIOGRAFÍA .....	207

## **Abreviaturas y Símbolos**

**AA:** Ácido ascórbico

**ANS:** Ácido 1-anilino naftalen 8-sulfónico

**BFe:** Bioaccesibilidad del hierro

**CG:** Carrageninas

**CP:** Concentrado proteico

**EAA:** Eficiencia de encapsulación del ácido ascórbico

**EFe:** Eficiencia de encapsulación del hierro

**FDT:** Fibra dietaria total

**HM:** Hez de malta

**i-CG:** Iota carragenina

**IF<sub>ANS</sub>:** Intensidad de emisión de fluorescencia del ANS

**IF<sub>Trp</sub>:** Intensidad de emisión de fluorescencia de triptófano

**I-CG:** Lambda carragenina

**LBG:** Locus bean gum, Goma Garrofín

**MCG:** mínima concentración de gelificación

**MD:** Maltodextrinas

**PEG:** Polietilenglicol

**pI:** Punto isoeléctrico

**QFe:** Hierro quelado

**SDS-PAGE:** Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

**TPA:** perfil de textura

**WVP:** Permeabilidad al vapor de agua

# Resumen

La industria alimentaria produce diariamente una gran cantidad de desechos que se descartan o se utilizan como subproductos de bajo valor agregado y que podrían utilizarse como fuentes de biomoléculas. Sumado a esto, existe la necesidad de desarrollar alimentos innovadores, lo que ha estimulado la búsqueda de nuevas fuentes de proteínas, lípidos y carbohidratos.

La hez de malta (HM) es el principal subproducto de la industria cervecera, representando el 85 % (p/p) del total generado en la producción de cerveza. Contiene aproximadamente en base seca: proteínas (24-26 %), fibra dietaria total (60%), lípidos (8-11 %) y cenizas (3-4 %). Una forma atractiva de valorizar este subproducto sería la obtención de proteínas.

Para la obtención de proteínas se propuso utilizar la HM húmeda, lo que evitaría el costo del secado. Se investigó el efecto de diferentes pretratamientos que incluyeron el uso de enzimas, extracciones en medio ácido y alcalino para mejorar los rendimientos y pureza de los concentrados proteicos resultantes. Se obtuvieron concentrados proteicos de hez de malta (CP) con una eficiencia de extracción del 42% y una pureza del 57%. El CP fue caracterizado respecto a su composición y propiedades estructurales tales como: perfil electroforético (SDS-PAGE), perfil de pesos moleculares (FPLC), perfil de aminoácidos, punto isoeléctrico (pI).

Los concentrados proteicos fueron evaluados respecto a sus propiedades tecno-funcionales. Se determinaron la solubilidad, la absorción de agua, las propiedades coagulantes, la capacidad de formar películas y de actuar como agentes encapsulantes. Respecto a las propiedades de superficie se evaluó la capacidad espumante tanto de las proteínas como en sistemas mixtos con otros biopolímeros.

Se investigó el desarrollo de películas de proteínas de HM utilizando soluciones del CP a diferentes pHs (2, 8, 11), plastificantes (polietilenglicol- PEG o glicerol) y niveles de PEG. Se determinaron las propiedades mecánicas de las películas (tracción al momento de ruptura, el porcentaje máximo de elongación y el módulo elástico), las propiedades de interacción con el agua (permeabilidad al vapor de agua, solubilidad en agua), las propiedades ópticas (color y opacidad) y

las propiedades antioxidantes y antimicrobianas. También se evaluaron las características estructurales de las películas (FTIR). Se observó que las mayores concentraciones de PEG aumentaron la solubilidad en agua, la permeabilidad al vapor de agua y la elongación a la rotura, y disminuyeron la resistencia a la tracción y el módulo elástico. Las películas presentaron actividad antioxidante, mientras que no se detectaron propiedades antimicrobianas contra microorganismos específicos.

Posteriormente se investigaron sistemas mixtos de CP con dos tipos de carrageninas (CG), iota i-CG y lambda l-CG, y sus propiedades espumantes. Se evaluaron las interacciones entre las biomoléculas en función del pH y de la concentración relativa de biopolímeros, en solución acuosa. Para ello, se obtuvieron tres sistemas con concentraciones relativas de biopolímeros CP:CG de 1:1, 2:1 y 4:1. Las interacciones entre proteínas y CG en fase acuosa fueron analizadas por espectroscopía de fluorescencia intrínseca y extrínseca, potencial  $\zeta$  y distribución de tamaño de partícula en un rango de pH de 2,0 a 6,0. El tipo de CG influyó en el comportamiento de fase de las proteínas de hez de malta, dependiendo del pH. El valor de potencial  $\zeta$  fue afectado por la concentración relativa de biopolímeros. El tamaño de las partículas fue compatible con la formación de complejos electrostáticos solubles, fundamentalmente a pH comprendidos en el entorno del pI de CP. Las mejores propiedades de formación de espuma se obtuvieron con concentraciones relativas de biopolímeros CP:CG 2:1, pH 2 o 3 y utilizando i-CG. Estos resultados son importantes para crear nuevas estructuras a partir de mezclas de proteínas de hez de malta y polisacáridos aniónicos, tales como CG.

Respecto a las propiedades encapsulantes, se formularon microcápsulas de hierro y ácido ascórbico usando un diseño factorial de  $2^2$ . La microencapsulación se llevó a cabo utilizando CP, goma garrofín y maltodextrina como materiales de pared y mediante secado spray. Se evaluaron el efecto de la relación CP/material de pared (8,6 y 17,2 g de proteína/100g) y de la relación molar ácido ascórbico/hierro (0,9 y 1,8) sobre el tamaño de las partículas, la eficiencia de encapsulación del hierro (EFe), la eficiencia de encapsulación del

ácido ascórbico (EAA), el hierro quelado por el material de pared (QFe) y la bioaccesibilidad del hierro (BFe). Un mayor nivel de CP aumentó la BFe a una baja proporción de ácido ascórbico/hierro debido a la alta actividad quelante de hierro de CP. Se realizó y validó una optimización maximizando la respuesta múltiple de EFe, EAA, QFe y BFe. La formulación óptima de las microcápsulas presentó una BFe de 29% tras una digestión gastrointestinal simulada. El procedimiento de optimización permitió obtener un fortificante con mayor bioaccesibilidad y contenido del hierro, preservando el ácido ascórbico de la oxidación.

Este trabajo proporcionó información básica y aplicada en el contexto del uso y aplicaciones innovadoras de un residuo generado en la industria cervecera.

## Abstract

The food industry daily generates a large amount of wastes, which are discarded or used as low-added-value by-products and that can be used as sources of biomolecules. In addition, the need to develop innovative food products has stimulated the search for new sources of protein, lipids, and carbohydrates.

Brewer's spent grain (HM) is the major by-product of the brewing industry, accounting for 85% (w/w) of total generated during beer production. On a dry weight basis, it contains proteins (24-26%), total fiber (60%), lipids (8-11%), and ash (3-4%). An attractive way to value this by-product would be to obtain proteins.

To obtain proteins, it was proposed to use wet HM, which saves drying cost. The effects of various pretreatments, including the use of enzymes, extraction in acidic and alkaline media, were investigated to increase the yield and purity of the resulting protein concentrate. Brewer's spent grain protein concentrates (CP) with an extraction efficiency of 42% and a purity of 57% were obtained. CP was characterized regarding its composition and structural properties such as: electrophoretic profile (SDS-PAGE), molecular weight profile (FPLC), amino acid profile, isoelectric point (pI).

The protein concentrates were evaluated regarding their techno-functional properties. Solubility, water absorption, coagulation properties, film-forming ability and capacity to act as encapsulating agent were determined. Regarding the surface properties, the foaming capacity of both, proteins and mixed systems with other biopolymers was evaluated.

The development of HM protein films was investigated using CP solutions at different pHs (2, 8, 11), plasticizers (polyethylene glycol-PEG or glycerol), and PEG levels. The mechanical properties of the films (tensile strength, elastic modulus, and elongation at break), water interaction properties (water vapor permeability, water solubility), the optical properties (film color and opacity), the antioxidant and antimicrobial properties were determined. The structural characteristics of the films (FTIR) were also evaluated. It was found that the higher concentrations of PEG increased water solubility, water vapor permeability and elongation at break, and

decreased tensile strength and elastic modulus. The films presented antioxidant activity, but antimicrobial activity against specific microorganisms were not detected.

Subsequently, mixed CP systems with two types of carrageenans (CG), iota i-CG and lambda I-CG, and their foaming properties were investigated. The interactions between the biomolecules were evaluated as a function of the pH and the relative concentration of biopolymers, in aqueous solution. For this, three systems with relative concentrations of CP:CG biopolymers of 1:1, 2:1 and 4:1 were obtained. The interactions between proteins and CG in the aqueous phase were analyzed by intrinsic and extrinsic fluorescence spectroscopy,  $\zeta$ -potential and particle size distribution in a pH range of 2.0 to 6.0. The type of CG affected the phase behavior of brewer's spent grain proteins, depending on the pH. The value of  $\zeta$  potential was affected by the relative concentration of biopolymers. The size of the particles was compatible with the formation of soluble electrostatic complexes, fundamentally at pH values around the pI of CP. The best foaming properties were obtained with relative concentrations of biopolymers CP:CG 2:1, pH 2 or 3, and with i-CG. These results are important for creating new structures from mixtures of brewer's spent grain proteins and anionic polysaccharides, such as CG.

Regarding the encapsulating properties, microcapsules of iron and ascorbic acid were formulated using a 2<sup>2</sup> factorial design. Microencapsulation was carried out by spray-drying using CP, locust bean gum, and maltodextrin as wall materials.

The effect of the CP/wall material ratio (8.6 and 17.2 g protein/100g) and the ascorbic acid/iron molar ratio (0.9 and 1.8) on particle size, iron encapsulation efficiency (EFe), ascorbic acid encapsulation efficiency (EAA), iron chelated by the wall material (QFe) and iron bioaccessibility (BFe) were evaluated. A higher level of CP increased BFe at a low ascorbic acid/iron ratio due to the high iron-chelating activity of CP. An optimization and validation were performed maximizing the multiple response of EFe, EAA, QFe, and BFe.

The optimal microcapsule formulation had a BFe of 29% after simulated gastrointestinal digestion. The optimization procedure allowed obtaining a fortifier with high bioaccessibility and iron content, preserving ascorbic acid from oxidation.

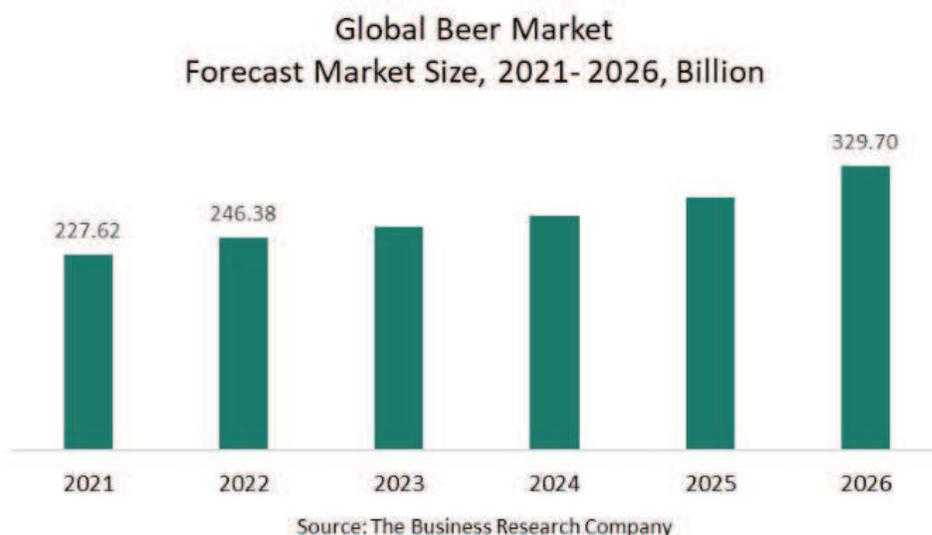
This work provided basic and applied information in the context of the use and innovative applications of a residue generated in the brewing industry.

# I. INTRODUCCIÓN

## I.1. Industria cervecera

La cerveza es una bebida fermentada conocida desde la antigüedad. Actualmente, es la bebida baja en alcohol más popular que se consume en grandes cantidades en muchos países cada año, y la tercera bebida más popular en general, después del agua y el té. Constituye el segmento más grande en el mercado de bebidas alcohólicas a nivel mundial. Para 2014, el consumo mundial de cerveza había aumentado a más de 1960 millones de hectolitros, equivalentes a más de 21,5 millones de toneladas de malta, a un tipo de conversión promedio de 11 kg de malta por 1 hectolitro de cerveza (Giraldo y col., 2019).

Se espera que el tamaño del mercado mundial de la cerveza crezca de 227,62 mil millones de dólares en 2021 a 246,38 mil millones en 2022 a una tasa de crecimiento anual compuesto (CAGR) del 8,2%, y la cuota de mercado mundial de la cerveza crezca hasta los 329,70 millones de dólares en 2026 con una CAGR del 7,6 % (MENAFN, 2022).



**Figura I.1.** Expectativa de crecimiento del mercado global de cerveza en miles de millones de dólares. Fuente: (MENAFN, 2022).

Por su parte, la producción y demanda de cerveza artesanal ha crecido con fuerza en las últimas décadas, tanto en la Argentina como en el mundo.

Actualmente es un aliado de la economía, ya que, a nivel de empleo, la industria cervecera es responsable de 8.500 trabajadores directos, existen 9 cervecerías industriales y 6 malterías y más de 1.200 cervecerías artesanales (Ferrari y col., 2020; Leleco, 2019).

En el país, el consumo promedio anual per cápita ronda los 45 litros, frente a los 65 de México y 66 de Brasil. Sin embargo, la importancia de la industria cervecera también radica en la transversalidad del negocio, que involucra muchos segmentos como la cebada, lúpulo, levaduras y malta; envases de vidrio y latas; tapas y etiquetas; cajones plásticos; logística; publicidad; bares y restaurantes; comercios minoristas y supermercados, entre otros insumos y servicios (Toppazzini, 2021).

En el proceso de elaboración de cerveza se obtienen varios subproductos, de los cuales el de mayor volumen es la hez de malta (HM). Éste es un material que contiene aproximadamente: 30% en peso seco de proteínas, 28% de lignina, 25% de hemicelulosa y 17% de celulosa (McCarthy y col., 2013; Vieira y col., 2014).

Debido a la importante cantidad producida anualmente, a la dificultad de su disposición y a su bajo valor actual del mercado, la HM puede representar un subproducto interesante para procesar y darle un mayor valor agregado. Para tal fin, la obtención de concentrados proteicos a partir de HM, con buenas propiedades tecno-funcionales, resulta particularmente prometedora.

En este contexto se ha reportado que, a partir de la HM, pueden obtenerse fracciones ricas en proteínas que resultan de interés para la industria alimentaria (Celus y col., 2006; Forssell y col., 2011; Mussatto & Roberto, 2006; Robertson y col., 2010; Steiner y col., 2015). Algunas potenciales aplicaciones serían como ingrediente alimentario con propiedades tecno-funcionales, tales como propiedades emulsificantes, o su utilización en el desarrollo de materiales biodegradables y/o comestibles para envases o material de pared en encapsulación de aditivos, aspectos que serán abordados en esta tesis.

## I.2. Producción de cebada

La cerveza se fabrica principalmente con granos de cebada germinados, aunque pueden utilizarse también otros cereales.

La cebada es una planta anual monocotiledónea perteneciente a la familia de las poáceas. Este cultivo es de gran importancia para la alimentación animal y humana, razón por lo cual en la última década se convirtió en el quinto producto más cultivado en el ámbito global (Sisa, 2020). En la Argentina, el producto está asociado en su mayor proporción a la industria cervecera.

La cebada ha demostrado una destacada producción como cultivo de invierno con gran crecimiento en los últimos años.

En la Tabla I.1 se muestra su producción en Argentina durante los últimos años. A nivel local, el aumento de la demanda de malta ha sido lo que impulsó la producción de cebada cervecera. Esta interesante opción comercial estimuló al productor, además de beneficiar la estructura de los suelos, dada una mejor rotación de cultivos (Sisa, 2020).

**Tabla I.1.** Producción de cebada. Área, producción y rendimiento de toneladas métricas

<b>Año</b>	<b>Área (1000 Ha)</b>	<b>Producción (1000 Tons)</b>	<b>Rendimiento (T/Ha)</b>
2014/2015	900	2.900	3,22
2015/2016	1.250	4.940	3,95
2016/2017	870	3.300	3,79
2017/2018	935	3.740	4,00
2018/2019	1.125	4.635	4,12
2019/2020	1.080	3.615	3,35
2020/2021	1.010	4.035	4,00
2021/2022	1.340	5.300	3,96
2022/2023	1.350	5.300	3,93
<i>Promedio de 5 años 2017/18 - 2021/22</i>	<i>1.098</i>	<i>4.265</i>	<i>3,88</i>

Fuente: Adaptado de Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, 2022)

### I.3. Composición y morfología del grano de cebada

El grano de cebada puede dividirse en tres partes principales: el germen (embrión), el endospermo (aleurona y endospermo almidonoso) y el revestimiento (formado por varias capas exteriores con diferentes funciones). Una estructura detallada de la planta y del grano de cebada se muestra en la Figura I.2.



**Figura I.2.** Espiga y granos de cebada, adaptado de FAO; Sección transversal de un grano de cebada, adaptado de Lynch y col., (2016)

La cáscara y el pericarpio son las partes protectoras más externas del grano. Debajo del pericarpio, está la capa de semilla o testa, que es una capa protectora, delgada, rica en cutina hidrófoba y fibra dietaria y la capa aleurona, rica en proteínas. En conjunto, la capa de pericarpio, testa y aleurona se conocen como salvado. El salvado a menudo se elimina en la molienda de los granos para obtener harina. Sin embargo, para los procesos de malteado y macerado, la cáscara y el salvado no se separan, sino que también entran en el proceso. Debajo de las capas protectoras, está el endospermo, que es la parte mayoritaria del grano. Las paredes celulares del endospermo están compuestas de  $\beta$ -glucanos (70%) relacionados con numerosos beneficios para la salud (Zielke y col., 2017) y arabinosilanos (20%) que son considerados fibra dietaria, debido a su resistencia a la hidrólisis por las enzimas del tracto digestivo (Vieira y col., 2014). Por otro lado, en la capa de aleurona, la proporción es casi la opuesta: 26% de  $\beta$ -glucanos y 67% de arabinosilanos.

El endospermo almacena energía en forma de almidón, que constituye entre 60-64% del peso del grano (Tabla I.2), y que puede hidrolizarse a azúcares simples durante la germinación, proporcionando energía para la planta en crecimiento. También el germen, de donde crece la nueva planta, almacena lípidos y proteínas para iniciar el crecimiento (Lynch y col., 2016). Alrededor del 70% de los lípidos de la cebada están presentes en el endospermo, el 20% en el germen y el resto, en las capas externas. Los minerales como el magnesio, el azufre, el sodio, el potasio, el zinc y el calcio se concentran en las capas externas del grano; mientras que el fósforo está presente, principalmente, como ácido fítico en la capa de aleurona (MacGregor, 2003).

**Tabla I.2.** Composición del grano de cebada

<b>Componentes</b>	<b>Contenido (% peso seco)</b>
Almidón	60-64
Arabinosilanos	4,4-7,8
β-Glucanos	3,6-6,1
Celulosa	1,4-5,0
Hidratos de carbono simples (glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa)	0,41-2,9
Oligosacáridos (rafinosa, fructosano)	0,16-1,8
Proteínas	8-15
Lípidos	2-3
Minerales	2-3

(Adaptado de MacGregor, 2003)

#### **I.4. Proteínas de la cebada**

En el grano, las proteínas de cebada se presentan en muchas formas y son responsables de la actividad metabólica, las funciones estructurales y el suministro de nitrógeno para el desarrollo del embrión durante la fase de germinación.

La cebada contiene de un 7 a 25% de proteínas que pueden clasificarse en cuatro grupos principales de acuerdo con su solubilidad (Osborne, 1909): i) las albúminas, solubles en agua, ii) las globulinas, solubles en soluciones salinas diluidas, iii) las prolaminas u hordeínas, solubles en soluciones alcohólicas, y iv) las glutelinas, solubles en ácidos y bases diluidas.

Las principales proteínas de almacenamiento en la cebada están representadas por las hordeínas (prolaminas) (Arendt & Zannini, 2013), que comprenden del 30 al 50% del total de las proteínas del grano. Las proteínas de la cebada que no son de almacenamiento se encuentran principalmente en la aleurona y el embrión, y representan del 15 al 30% del nitrógeno total del grano, siendo las albúminas y globulinas las representantes principales. Estas funcionan como componentes estructurales de las paredes celulares y proteínas metabólicas (enzimas) (Arendt & Zannini, 2013).

Las hordeínas de cebada (principales proteínas del endospermo) se clasifican en cuatro grupos (B, C, D y  $\gamma$ ), basándose en la composición de aminoácidos. Las hordeínas (B y  $\gamma$ ), ricas en azufre, son la principal fracción proteica, que difiere de las hordeínas C, con bajo contenido de azufre y de las prolaminas de alto peso molecular (D). A su vez, las prolaminas del grupo B se subdividen en otros tres subgrupos. Las hordeínas B y C comprenden el 80% y el 15%, respectivamente, del total de hordeínas, mientras que las hordeínas D y  $\gamma$  constituyen el 5% restante (Connolly y col., 2013). Las hordeínas  $\gamma$  de bajo peso molecular generalmente se consideran un grupo de proteínas hidrofóbicas solubles en sal, en vez de proteínas de almacenamiento. Las hordeínas D se consideran proteínas de almacenamiento de cebada de alto peso molecular, que consisten en polipéptidos unidos entre sí con enlaces disulfuro intermoleculares (Celus y col., 2006).

Las hordeínas se identificaron a través de SDS-PAGE con bandas correspondientes a pesos moleculares de 85–90, 55–80, 30–50 y <15 kDa, para las hordeínas D, C, B y  $\gamma$ , respectivamente (Wang y col., 2010).

La composición de aminoácidos de la proteína de cebada es similar a la de otros cereales, con altos contenidos de ácido glutámico y prolina y cantidades relativamente bajas de aminoácidos básicos (Arendt & Zannini, 2013).

### **I.5. Proteínas de la malta**

El malteado tiene como objetivo producir una alta actividad enzimática, una modificación significativa del endospermo y un sabor característico. Básicamente

se trata de un proceso de germinación controlada del cereal que se interrumpe con el secado. En el proceso de germinación, se sintetizan las enzimas y se movilizan las reservas, para permitir el inicio del desarrollo del embrión. El mismo obtiene la energía necesaria de los azúcares, a través de la descomposición enzimática “amilólisis” del almidón, que tiene lugar durante el proceso de respiración (Arendt y Zannini 2013).

En la germinación se producen cambios en las proteínas de cebada. Las proteínas de la cebada son particularmente degradadas hasta aminoácidos y péptidos solubles por las peptidasas endógenas de la cebada, activadas durante la germinación, pero la mayoría de las proteínas en la malta (74-78%) permanecen insolubles (Rommi y col., 2018).

### **I.6. Generación de residuos en la industria cervecera**

La producción de cerveza se divide en varias operaciones sucesivas: malteado, molienda, maceración, filtración, adición de lúpulo o extracto de lúpulo y ebullición del mosto de cerveza con estos aditivos, eliminación del lúpulo gastado y de los sedimentos precipitados, enfriamiento del mosto y aireación, fermentación con levaduras, eliminación de levadura, acondicionamiento (maduración, crianza) y envasado. El objetivo del proceso es convertir el almidón de los granos de cereales en azúcares simples, extraer estos azúcares con agua y fermentarlos con levaduras para producir una bebida alcohólica ligeramente carbonatada (Young, 2022).

Tal producción a gran escala da como resultado la generación de grandes cantidades de materiales de desecho orgánicos por parte de la industria cervecera. El primer y más abundante subproducto cervecero se forma después del proceso de maceración. El grano "gastado" residual (bagazo o hez de malta) se elimina después de la separación del líquido producido durante la maceración (denominado mosto) (Figura I.3). Otro tipo de residuo se genera tras hervir el mosto. En esta etapa tiene lugar la desnaturalización térmica de las proteínas, lo que provoca la precipitación de proteínas de alto peso molecular (residuos denominados turbios calientes). El turbio caliente, que contiene lúpulo gastado, se

elimina del mosto con un separador. A continuación, se añaden las levaduras y comienza la fermentación. Después de este paso, la mayoría de las levaduras se eliminan de la cerveza joven (levadura gastada de cervecería). Antes del envasado, la cerveza suele filtrarse a través de filtros de tierra de diatomeas o celulosa para eliminar los residuos de levadura restantes (Thiago y col., 2014).

Por sus propiedades, los subproductos generados por la industria cervecera tienen potencial para ser aplicados como fuente de materiales de interés en la industria alimentaria, tales como de productos químicos, materias primas y otros compuestos de valor agregado, pero su uso aún es bastante limitado (Rachwał y col., 2020).



**Figura I.3** Proceso de elaboración de Cerveza y obtención de Hez de malta. Adaptado de Rachwał y col., (2020).

### I.7. Hez de malta

La HM es el principal subproducto de la elaboración de cerveza, representa el 85% del total de subproductos (Mussatto y col., 2006), y está disponible en abundancia durante todo el año. En principio, se producen 14 kg/hL de mosto, con un contenido de humedad entre 75 % y 90 % o 0,2 kg de HM húmeda por litro de cerveza (Robertson y col., 2010). Esto significa que en 2019 se generaron alrededor de 38,2 millones de toneladas métricas de HM húmeda en todo el mundo (Steiner y col., 2015). Los altos contenidos de humedad y nutrientes hacen

que la HM sea susceptible a la descomposición biológica en sólo unos pocos días, lo que plantea problemas ambientales (El-Shafey y col., 2004). Actualmente, tiene aplicaciones limitadas como alimento para animales debido a su baja digestibilidad y se desecha principalmente en vertederos.

### I.7.1. Composición de la hez de malta

La HM está formada principalmente de cáscaras de cebada, pericarpio y fragmentos del endospermo (Figura I.4.). Su composición es variable según el tipo de cebada, el tiempo y la condición de la cosecha, el tipo de granos adjuntos y las condiciones de maceración y malteado. Dependiendo del tipo de cerveza producida, la hez de malta puede estar constituida por residuos de la cebada malteada y azúcares fermentables de distintas fuentes, tales como trigo, arroz o maíz agregados durante la maceración (Hough, 1991). Incluso si la composición química de la hez de malta depende de los factores intrínsecos y extrínsecos mencionados anteriormente, contiene cantidades apreciables de compuestos valiosos (Fărcaș y col., 2017).

Sus principales constituyentes son proteínas y fibras (hemicelulosa, celulosa y lignina), alrededor de 20-30% y 70% en base seca, respectivamente (Ibarruri y col., 2019; Mussatto, 2014). Si bien por su alto contenido de polisacáridos y proteínas podría usarse como materia prima de procesos fermentativos, el alto contenido de fibra dificulta la digestibilidad de la biomasa producida.

La Tabla I.3 muestra la composición química de la HM reportada por diferentes autores.

**Tabla I.3.** Composición química de la hez de malta

<b>Carbohidratos</b>	<b>Lignina</b>	<b>Proteína</b>	<b>Lípidos</b>	<b>Cenizas</b>	<b>Ref.</b>
52,00	n.d.	26,40	7,50	4,07	(Vieira y col., 2014)
34,00	23,39	23,10	13,51	3,29	(Connolly y col., 2014)
n.d.	19,60	20,03	n.d	4,10	(Wahlström y col., 2017)
46,52	19,57	22,44	5,30	3,54	(Qin y col., 2018)
48,50	14,00	27,10	8,60	n.d	(Ibbett y col., 2019)
n.d.	11,30	22,90	8,50	4,30	(He y col., 2019)

Todos los valores expresados en g por 100 g de material seco; n.d., no determinado.



**Figura I.4.** Hez de malta húmeda

Los carbohidratos comprenden aproximadamente la mitad de la masa seca de HM; el resto son principalmente proteínas y lignina. La estructura de las capas externas en el grano de cebada es muy compleja y está compuesta de microfibrillas de celulosa y arabinoxilanos, que pueden formar un complejo con la lignina (Forssell y col., 2008). Los arabinoxilanos de cebada son polisacáridos con un esqueleto de poli-(1,4)- $\beta$ -D-xilopiranososa, que está sustituido con residuos de L-arabinofuranosa en O-2, O-3, o en ambas posiciones (Ayala-Soto y col., 2016; Forssell y col., 2008).

La lignina, representa acerca del 10-28% del peso total. Es una molécula polifenólica de estructura compleja importante para mantener la rigidez estructural y la integridad de las paredes celulares de las plantas. Se forma principalmente a partir de tres monómeros fenilpropanoides (monolignoles): alcohol p-coumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico, que están unidos en una estructura de red ramificada por reacciones de condensación, inducidas por radicales. Según la Comisión de la Unión Europea, la lignina se incluye como un componente de la fibra dietaria cuando permanece estrechamente asociada con los polisacáridos vegetales originales (Lynch y col., 2016). Este subproducto también es rico en compuestos fenólicos (Cooray, Lee & Chen, 2017). La mayoría de los compuestos fenólicos del grano de cebada están contenidos en la cáscara y los ácidos hidroxicinámicos se acumulan en las paredes celulares. La HM es una fuente de ácidos fenólicos potencialmente valiosa y económica.

Muchos compuestos fenólicos están unidos covalentemente y permanecen en la HM. Así también se han encontrado otros polifenoles, como los flavonoides. El ácido ferúlico ( $1860 - 1948 \text{ mg g}^{-1}$ ) y el p-cumárico ( $565 - 794 \text{ mg g}^{-1}$ ) son los ácidos fenólicos más abundantes, seguido de los ácidos sinápicos, cafeicos, entre otros (Fărcaș y col., 2017).

La HM contiene un 11% de lípidos, que incluyen principalmente triglicéridos (67%) y una notable cantidad de ácidos grasos libres (18%) junto con menores proporciones de diglicéridos (7,7%), monoglicéridos (1,6%), y compuestos esteroides (hidrocarburos, cetonas, esteroides libres, ésteres y glucósidos de esteroides) (del Río y col., 2013). La gran cantidad de ácidos grasos libres se puede atribuir a la lipasa endógena, que es capaz de liberarlos de los triglicéridos y lípidos polares durante el malteado y el macerado (Fărcaș y col., 2017). Los principales ácidos grasos presentes en HM son los ácidos linoleico, palmítico y oleico (Parekh y col., 2017).

### **I.7.2. Proteínas**

El contenido de proteínas de la HM varía entre el 10-30 % dependiendo de la tecnología de elaboración, de los aditivos utilizados y de la malta (Xiros y Christakopoulos, 2012). Es mucho mayor que en otras materias primas agrícolas, como el espiga o mazorca del maíz (6-12% p/p), paja de trigo y rastrojo de maíz (2-7% p/p) (He y col., 2019).

Como se mencionó, durante la germinación se producen aminoácidos libres por hidrólisis de las proteínas de reserva del endospermo. Adicionalmente, las proteínas de la cebada se degradan parcialmente a péptidos pequeños por las peptidasas endógenas. Sin embargo, la mayoría de las proteínas de la malta no se disuelven en la maceración, y el 74-78% permanece insoluble en la HM. Como resultado, ésta presenta un alto contenido de proteínas y péptidos. Además, los aminoácidos indispensables representan aproximadamente el 30% del contenido total de aminoácidos (Steiner y col., 2011; Fărcaș y col., 2017).

Las proteínas en la HM son principalmente hordeínas (43%) y glutelinas, mientras que las albúminas y globulinas constituyen aproximadamente solo el 10%

(Celus y col., 2006). Se ha observado que, durante el proceso de maceración de la cerveza, las hordeínas del tipo B, D y las glutelinas tienden a agregarse en complejos estabilizados por enlaces de disulfuro intra e intermoleculares (Connolly y col., 2013).

### **I.7.3. Aplicaciones de hez de malta**

Actualmente, la HM se destina principalmente para alimentación animal, debido a su alto contenido de proteínas y fibra. Acorde con diversos autores, la HM es un excelente ingrediente para la alimentación de rumiantes (Skendi y col., 2018).

Dado que los ingredientes utilizados en el proceso de elaboración de la cerveza están aprobados para el consumo humano, este subproducto se puede aplicar de manera segura para el desarrollo de nuevos productos. Aunque actualmente no se usa en la producción de alimentos a gran escala, la HM se puede agregar como un componente de bajo costo a alimentos destinados al consumo humano (Fărcaș y col., 2017; Thomas & Rahman, 2006).

Numerosos estudios han demostrado que la HM se puede incorporar a la harina utilizada para la producción de muchos alimentos, como pan, waffles, galletas, panqueques, tortillas, pasta y cereales para el desayuno (Waters y col., 2012). También se puede utilizar como un complemento para productos cárnicos tales como salchichas de res o de pollo bajas en grasa, salchichas ahumadas (Choi y col., 2014; Nagy y col., 2017; Özvural y col., 2009).

La HM también ha sido utilizada para la obtención de lignina (Mussatto y Fernandes, 2007), xilanos (Laine y col., 2015), oligosacáridos (Carvalho y col., 2004) y proteínas (Chetrariu & Dabija, 2020).

En la bibliografía se mencionan también otros usos no alimentarios, tales como la producción de energía, ya sea a través de la combustión directa o por fermentación para obtener biogás (Jonsson y Martín, 2016; Wolters y col., 2016), la producción de briquetas de carbón de HM (bloque sólido de biocombustible para generar calor, en estufas, chimeneas, hornos y calderas) (Okamoto y col., 2002) y materiales de construcción (Russ y col., 2005). La naturaleza fibrosa de la HM ha

llevado a su investigación como una materia prima para la producción de papel (Ishiwak y col., 2000).

#### **I.7.4. Extracción y recuperación de proteínas de hez de malta**

Existe una demanda creciente en la reutilización de residuos agroindustriales para obtener proteínas alimentarias. Aunque las proteínas de origen animal (p. ej., proteínas de la leche) se han utilizado tradicionalmente en la industria alimentaria, la conciencia reciente del vínculo entre el suministro de alimentos, la expansión de la población mundial, la salud y el calentamiento global ha llevado a un mayor interés en la investigación de las proteínas vegetales.

Actualmente, el uso limitado de proteínas de HM como ingrediente alimentario se debe en gran parte a la dificultad de extraer las proteínas. La falta de solubilidad de las proteínas HM está asociada al atrapamiento de estas dentro de la estructura compleja de carbohidratos (Connolly y col., 2019) y la formación de agregados entre proteínas causada por el proceso de maceración (Chin y col., 2022).

Los extractantes comúnmente utilizados para obtener fracciones de proteínas de las plantas incluyen ácidos o álcalis diluidos, soluciones salinas, solventes orgánicos, surfactantes y agentes reductores (Celus y col., 2007; Shewry, 1996). Para extraer y concentrar las proteínas del grano que quedaron retenidas en la HM se han propuesto diversos métodos alcalinos, enzimáticos, con solventes, etc. (Connolly y col., 2013; Forssell y col., 2011; Niemi y col., 2013; Qin y col., 2018; Vieira y col., 2014). Entre estas, las condiciones alcalinas han demostrado ser las más efectivas para la solubilización de proteínas de la HM (Forssell y col., 2008; Niemi y col., 2013).

Dado que se ha observado que, durante el proceso de maceración de la malta, las hordeínas tipo B y D pueden agregarse en complejos estabilizados por enlaces disulfuro intramoleculares e intermoleculares (Moonen y col., 1987), puede ser necesario el uso de procedimientos de pretratamientos o disrupción vigorosos para ayudar a la recuperación de proteínas de la HM.

Otro factor que limita la recuperación de proteínas de la HM es que una proporción significativa de la proteína se localiza en células aleurónicas, que permanecen parcialmente intactas después de la maceración (Kemppainen y col., 2016). Por lo tanto, la desintegración enzimática de la pared celular es una forma potencial de ayudar a la liberación de estas proteínas.

Las proteínas en la HM son principalmente insolubles, pero pueden solubilizarse eficientemente a través de un tratamiento o proteolítico. Incluso sin un tratamiento previo, el 41-77% podría hidrolizarse utilizando proteasas (Celus y col., 2007; Faulds y col., 2009; Forssell y col., 2008). Después de una molienda húmeda, y empleando carbohidrasas y proteasas secuencialmente, el 93% de las proteínas puede extraerse (Niemi y col., 2013). Por otra parte, es sabido que las modificaciones enzimáticas o químicas pueden mejorar las propiedades tecno-funcionales de las proteínas, particularmente la hidrólisis enzimática. La hidrólisis reduce el peso molecular y también puede resultar en el desplegamiento de la estructura proteica, exponiendo los aminoácidos polares que pueden interactuar con las moléculas de agua, aumentando así la solubilidad (Tapal y Tiku, 2019).

### **I.8. Propiedades tecno-funcionales de las proteínas**

Las proteínas juegan un papel fundamental no sólo en el sostenimiento de la vida, sino que también son la base estructural de las propiedades tecno-funcionales en los alimentos derivados de plantas y animales. Los alimentos varían en su contenido de proteínas y más aún en las propiedades de esas proteínas.

Las propiedades funcionales se definen como las propiedades fisicoquímicas que afectan al comportamiento de las proteínas en los sistemas alimentarios, durante la preparación, el procesado, la calidad final, el almacenamiento y el consumo de los alimentos.

Las propiedades funcionales de las proteínas pueden clasificarse en tres grupos de acuerdo con la interacción de las moléculas proteicas entre sí, con el agua y con superficies o interfases (Wen y col., 2019). Dentro de las propiedades dependientes de interacciones proteína – agua se pueden mencionar: retención de

agua, solubilidad, viscosidad, humectabilidad, etc.; para las propiedades dependientes de interacciones proteína – proteína: gelificación, precipitación, formación de películas y matrices, etc.; y para las propiedades de superficie: emulsificación y espumado, etc. (Pilosof y Bartholomai, 2000). La descripción de estas y los métodos de evaluación han sido discutidos por varios autores (Lo y col., 2021; Mishyna y col., 2021).

### 1.8.1. Propiedades tecno-funcionales de proteínas de hez de malta

La comprensión de las propiedades funcionales de las proteínas de hez de malta es un primer paso para poder expandir su aplicación en la industria alimentaria. Estas proteínas tienen baja solubilidad (Celus y col., 2007). La mayoría de los estudios se han centrado en el tratamiento enzimático de dichas proteínas para obtener hidrolizados con mejores propiedades funcionales (Celus y col., 2009; Rommi y col., 2018). Sin embargo, la hidrólisis enzimática prolongada produce péptidos más pequeños que reducen ciertas propiedades tecno-funcionales, como por ejemplo las propiedades espumantes, emulsionantes y la formación de matrices, mientras que la proteólisis más corta puede producir sabor amargo (Wen y col., 2019).

En la Tabla 1.4 se resumen algunas propiedades tecno-funcionales de las proteínas de hez de malta reportadas en la bibliografía.

**Tabla 1.4.** Propiedades tecno-funcionales de proteínas de hez de malta

	Método	Condición	Resultado	Propiedad	Referencia
	<i>Interacciones proteína – agua:</i>				
<b>Solubilidad</b>	En función del pH. Las proteínas fueron determinadas mediante el método Lowry.	Dispersión a 1,0 g 100 mL <sup>-1</sup> y ajuste a pHs 2, 4, 6, 8, 10. Se utilizó HCl o NaOH 0,1 M para ajuste de pH.	S (%) más baja a pH 3 y aumento de la solubilidad a valores de pH alcalinos .	Solubilidad (%): (proteínas en el sobrenadante / proteínas totales) * 100.	(Celus y col., 2007, Chin y col., 2022)

Interacciones proteína – proteína

<b>Formación de películas</b>	<i>Casting</i>	Dispersión con 3 g 100 g <sup>-1</sup> de proteínas + 2 g 100 g <sup>-1</sup> de quitosano. Luego se sonicó y se agregó glicerol 40 g 100 g <sup>-1</sup> proteínas.	PVA: 2,93x10 <sup>-9</sup> g.m/m <sup>2</sup> s Pa Tensión:4,32MPa Elongación:36,38% Solubilidad (%): 37,5±0,5 g 100 g <sup>-1</sup>	Permeabilidad al vapor de agua (PVA) Tensión a la ruptura, Elongación módulo elástico Solubilidad en agua	(Lee y col., 2015)
	<i>Casting</i>	Dispersión con 4, 6 8 y 10 g 100 g <sup>-1</sup> de proteínas, a pHs 11, 12 y 13. Luego se calentó a 80°C por 30 min y se agregó glicerol (30 g 100 g <sup>-1</sup> proteínas).	PVA: 3,99x10 <sup>-10</sup> g.m/m <sup>2</sup> .s.Pa (a 10 g 100 g <sup>-1</sup> y pH 13) Tensión: 1,50 MPa (a 10 g 100 g <sup>-1</sup> y pH 13) Elongación: 55% (a 10 g 100 g <sup>-1</sup> y pH 13) Solubilidad (%): 63,09 ± 0,93 (10 g 100 g <sup>-1</sup> y pH 13)	Permeabilidad al vapor de agua (PVA) Tensión a la ruptura, Elongación módulo elástico Solubilidad en agua	(Shroti & Saini, 2022)

Propiedades de superficie

<b>Emulsificación</b>	Homogenización Licuadora Waring	7 mL de aceite de soja y 21 mL de solución proteica (0,2 g 100 mL <sup>-1</sup> de proteína)	IAE: 79 m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ES: 40%. proteínas	Índice de actividad emulsionante (IAE), Estabilidad (ES, %)	(Celus y col., 2007)
	Homogenización Ultra Turrax T25	12 g de aceite de maíz y 28 g de solución proteica (0,05 g 100 mL <sup>-1</sup> ), a pHs 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 9,0, 10,0 y 12,0.	IAE (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ) pH 2,0: 50, pH 4,0: 10, pH 6,0: 60, pH 8,0: 150, pH 9,0: 300, pH 10,0: 430, pH 12,0: 400  ESI (min): pH 2,0: 20%, pH 4,0: 10%, pH: 6,0: 30%, pH:8,0: 70 % pH:9,0: 65% pH:10,0 70%, pH 12,0: 73 %	Índice de actividad emulsionante (IAE)  Estabilidad de la emulsión (ESI)	(Connolly y col., 2014)
	Homogenización Vortex (Model VM-1000)	5 mL de aceite de cacahuete y 15 mL de extracto de proteínas (1 g 100 mL <sup>-1</sup> )	EAI: 10 m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>  ESI: 14 min	Índice de actividad emulsionante (EAI) Índice de	(Chin y col., 2022)

				estabilidad de la emulsión (ESI)	
<b>Espumado</b>	Homogenización Homogeneizador (8900 xg)	10 mL de aceite de vegetal y 100 mL de extracto de proteínas (1 g 100 mL <sup>-1</sup> )	EAI: 233 m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ESI: 141 min	Índice de actividad emulsionante (EAI) Índice de estabilidad de la emulsión (ESI)	(Naibaho y col., 2022)
	Batido (20000 rpm)	0,6 g 100 mL <sup>-1</sup> proteínas en buffer fosfato 9.0 mM y NaCl 35 mM (pH 7).	FC:80 mL/g <sup>-1</sup> FS: 23%.	Capacidad de formación de espuma (FC) estabilidad de espuma (FS)	(Celus y col., 2007)
	Batido (15000 rpm)	10 mL de extracto proteico al 0,5 g 100 g <sup>-1</sup> , a pHs 3, 5, 8.	FC: pH 3: 14 %, pH 5: 6%, pH 8:9% FS: pH 3: 5%, pH 5: 2%, pH8: 9%.	Capacidad de formación de espuma (FC). Estabilidad de espuma (FS)	(Chin y col., 2022)
	Batido Mezclador de alimentos (Model KM220)	Solución proteica al 1 g 100 mL <sup>-1</sup> , a pHs 2, a 12.	E:1000-1200 % FS:10-20%	Expansión (E) Estabilidad de espuma (FS)	(Connolly y col., 2014)
	Batido (20000 rpm)	Solución proteica al 5 g 100 mL <sup>-1</sup> , por 10 min	FC: 27 % FS: 4 %	Capacidad de formación de espuma (FC). Estabilidad de espuma (FS)	(Naibaho y col., 2022)

Los estudios relacionados a propiedades tecno funcionales de las proteínas de hez de malta son incipientes. Dadas las características esperables y reportadas en la bibliografía, pero también considerando la abundancia y bajo precio de su materia prima en la tesis se realizó un *screening* de las propiedades de hidratación y gelificación de las mismas, y luego se centró en tres líneas buscando nuevas aplicaciones: i) la formación de materiales biodegradables y/o comestibles para el envasado activo, considerando los compuestos bioactivos que se co-extraen con las proteínas; ii) la formación y estabilización de espumas proteicas y con agregado de polisacáridos, analizando las interacciones entre ambos biopolímeros iii) la utilización de estas proteínas como material de pared para la microencapsulación de hierro.

### **I.8.2. Películas biodegradables y/o comestibles**

Actualmente los plásticos representan a algunos de los materiales más esenciales y ampliamente utilizados en el mundo. Esto puede atribuirse a sus excelentes propiedades: bajos requisitos de mantenimiento, fácil procesamiento, baja toxicidad, transparencia, bajo precio, estabilidad y durabilidad; que facilitan sus aplicaciones en diversas actividades industriales, comerciales y agrícolas. Sin embargo, en su mayoría no son degradables y tienden a acumularse indefinidamente en vertederos o en el entorno natural. Por otra parte, los monómeros comunes utilizados para la síntesis de estos polímeros comúnmente derivan de hidrocarburos fósiles no renovables y su estructura polimérica los hace resistentes a la degradación microbiana (Ali y col., 2022).

La creciente preocupación global por el efecto ecológico de los desechos plásticos y sus emisiones impulsa la transición a la economía circular con el objetivo de reducir el consumo de combustibles fósiles y la generación de desechos. El reemplazo de los materiales plásticos tradicionales por bioplásticos, bio-basados y biodegradables, al menos en aquellas aplicaciones de vida útil corta, contribuye a resolver el problema ambiental antes planteado. “Biobasado” significa que el material o producto se deriva de biomasa y “biodegradable” significa que se puede degradar biológicamente a sustancias base como agua, dióxido de carbono, metano, elementos básicos, y biomasa por organismos vivos que están disponibles en el medio ambiente (Goswami & O’Haire, 2016). Las proteínas y los polisacáridos (extraídos directamente de la biomasa) junto con los polímeros producidos por síntesis química utilizando monómeros de base biológica renovables (como el ácido poliláctico, PLA) y los polímeros producidos por microorganismos o bacterias modificadas genéticamente (como los polihidroxialcanoatos y la celulosa bacteriana) cumplen las dos premisas, son biobasados y biodegradables (van der Hoeven y col., 2022)

Los bioplásticos pueden proporcionar mayor circularidad si son obtenidos a partir de biorresiduos, por su mayor disponibilidad, menor costo y como alternativa para dar mayor valor agregado a estos subproductos. La gestión de estos desechos también es una tarea desafiante, ya que los mismos son ricos en

contenido orgánico y de nutrientes que favorecen el crecimiento microbiano y pueden causar contaminación ambiental. Además, los bioplásticos representan características mejoradas, huella de carbono reducida, consumo reducido de combustibles fósiles y biodegradabilidad como alternativas al final de su vida útil (EOL). Sin embargo, estos méritos dependen en gran medida de muchos parámetros, como el método de procesamiento, la estructura química y el mejor escenario EOL (Ali y col., 2022).

En la actualidad, ha surgido un interés particular en aquellas proteínas derivadas de desechos o subproductos agroindustriales para la producción de materiales biodegradables como la zeína de maíz a partir de la producción de etanol, las proteínas de soja y girasol a partir de tortas de aceite, por su mayor disponibilidad y menor costo en comparación con otras fuentes de proteínas y también para evitar la competencia por los recursos alimentarios, revalorizar los subproductos agrícolas y reducir los impactos ambientales y los costos de eliminación de desechos (Rouilly, A. y Rigal, 2002; Salgado y col., 2010, 2017; Song y col., 2011; H. Zhang & Mittal, 2010). Así, las proteínas presentes en la HM podrían tener potencial para la formación de películas y/o recubrimientos. Hasta nuestro saber no existían trabajos que analizan su potencial en esta aplicación al momento de realizar estos estudios.

Las películas a base de proteínas se pueden preparar mediante dos tipos de tecnología: un "proceso húmedo" basado en la disolución o dispersión de proteínas y un "proceso seco" basado en las propiedades termoplásticas de las proteínas en condiciones de baja hidratación. Independientemente de la técnica de procesamiento utilizada, el material proteico resultante es esencialmente una matriz gelificada tridimensional reorganizada, con menor contenido de agua, donde las interacciones entre las proteínas y otros componentes de la formulación se ven muy favorecidas (Salgado y col., 2015). El tipo y el número de interacciones involucradas en la estabilización de la matriz proteica (enlaces disulfuro y enlaces de hidrógeno más interacciones electrostáticas e hidrofóbicas) están determinados por la composición de aminoácidos junto con el peso molecular de las proteínas en consideración, el grado de desnaturalización de la

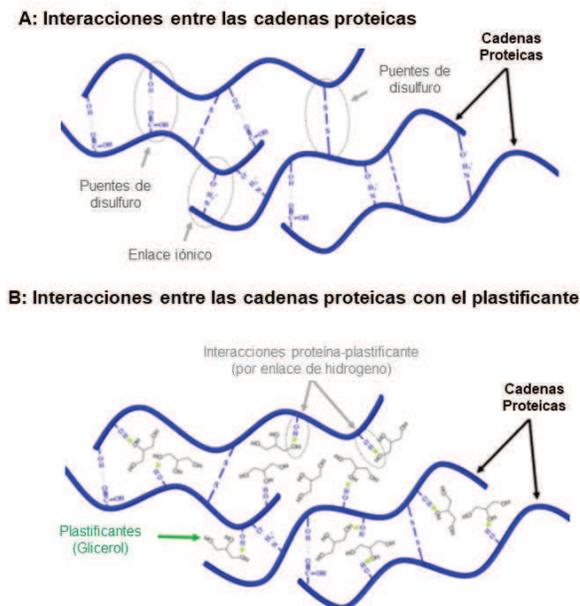
proteína, los parámetros experimentales utilizados en la preparación de la película y los aditivos agregados. Todas estas condiciones determinarán el grado de entrecruzamiento y el carácter hidrofílico-hidrofóbico de la red proteica resultante e influirán en las propiedades mecánicas y de barrera y la susceptibilidad al agua de los materiales resultantes (Salgado y col., 2017).

Por su naturaleza química, las proteínas tienen la capacidad de formar materiales con características radicalmente diferentes a los sintéticos ampliamente utilizados en la industria del plástico. Las películas de proteínas normalmente muestran una excelente capacidad de barrera con respecto al oxígeno, los aceites y los aromas junto con propiedades mecánicas moderadas, aunque suelen presentar una alta permeabilidad al vapor de agua. Además, son muy sensibles a las condiciones ambientales y, sobre todo, a la humedad relativa, debido a su naturaleza higroscópica. Estas últimas propiedades en general complican algunas de sus posibles aplicaciones (Mauri y col., 2016).

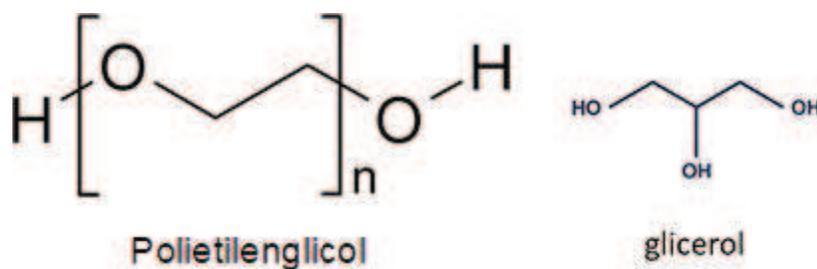
Además de poder degradarse de forma natural o en compost, las proteínas pueden formar películas o recubrimientos comestibles si todos los ingredientes constitutivos son de calidad alimentaria y los procesos utilizados para su fabricación son adecuados para el procesamiento de alimentos. Estos materiales comestibles podrían incluirse en el producto alimenticio o servir como cubierta de este y, como tales, podrían actuar como barreras para controlar la transferencia de humedad, oxígeno, dióxido de carbono, lípidos, compuestos de sabor y así mantener la calidad y aumentar la vida útil de los productos alimenticios además mejorar el valor nutricional del alimento protegido mediante la adición de suplementos nutricionales (Mauri y col., 2016).

En general, las formulaciones de películas basadas en proteínas requieren la adición de un agente plastificante para reducir la fragilidad de la película y conferir ciertas propiedades plásticas. Las moléculas de plastificante tienen la capacidad de posicionarse dentro de la red tridimensional de proteínas e interrumpir las interacciones entre las cadenas polipeptídicas, aumentando así el volumen libre y el espacio intermolecular, mejorando la flexibilidad y extensibilidad de la película. Sin embargo, los plastificantes también disminuyen la resistencia

mecánica y pueden afectar las propiedades de barrera de las películas (Figura I.5). Además del agua, los plastificantes más utilizados son los polioles, oligosacáridos y derivados como glicerol, etilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol y polietilenglicol, propilenglicol y xilitol. En particular el glicerol tiene un bajo peso molecular, es no volátil, muy higroscópico y es ampliamente utilizado como plastificante en películas proteicas (Yun y col., 2016). El polietilenglicol (PEG), por su parte, es un polímero sintético, con una subunidad repetitiva de etilenglicol y alta solubilidad de agua (Peng y col., 2020). Sus estructuras se muestran en la Figura I.6.



**Figura I.5.** Representación esquemática del efecto de la plastificación en la estructura de la red proteica. A) Representa la suma de interacciones entre las cadenas de proteínas (por medio de las interacciones electrostáticas, puentes disulfuro, enlaces disulfuro) que generan una película rígida y quebradiza y B) Representa la disposición y la interacción del plastificante con las cadenas proteicas que conducen a una película flexible y una estructura extensible. (Adaptado de Calva-Estrada y col., 2019)



**Figura I.6.** Estructuras de los dos plastificantes utilizados en este trabajo: PEG 400 (n: 8-9) y glicerol.

Por otra parte, durante la extracción de proteínas a partir de biomasa, pueden co- extraerse otros compuestos. La presencia de estos componentes en la formulación podría afectar la funcionalidad de los materiales resultantes. Algunos podrían plastificar o entrecruzar la matriz de acuerdo con las interacciones que generen durante el procesamiento, o podrían incluso ampliar la funcionalidad de los materiales, entrando en el campo de los envases activos (Salgado y col., 2015). Un envase activo es aquel que modifica la condición de alimentos envasados para extender la vida útil o mejorar su seguridad o propiedades sensoriales, manteniendo su calidad. A veces esto es logrado por las propiedades intrínsecas del polímero y en otros casos a través del agregado de algunos aditivos específicos en el material o en el espacio de cabeza del envase para lograr un mejor rendimiento del envase. La naturaleza de los agentes activos puede ser diversa, incluyendo ácidos orgánicos, enzimas, bacteriocinas, fungicidas, extractos naturales, iones, etanol, polifenoles, hidrolizados de proteínas, etc.; existiendo una preferencia en el uso de aditivos naturales en lugar de los sintéticos que a veces son asociados a ciertos riesgos para la salud (Mihalca y col., 2021; Salgado col., 2021). Es posible suponer que los compuestos fenólicos presentes en los concentrados de hez de malta puedan afectar las propiedades fisicoquímicas de las películas, así como atribuirle propiedades bioactivas (Proaño y col., 2020).

### **I.8.3. Propiedades espumantes de las proteínas**

Las espumas son dispersiones de burbujas de aire en un medio acuoso continuo, proporcionan estructura, apariencia y gustos especiales en determinados alimentos tales como: pan, crema batida, helados, pasteles, coberturas batidas, mousses y malvaviscos (Wouters y col., 2017).

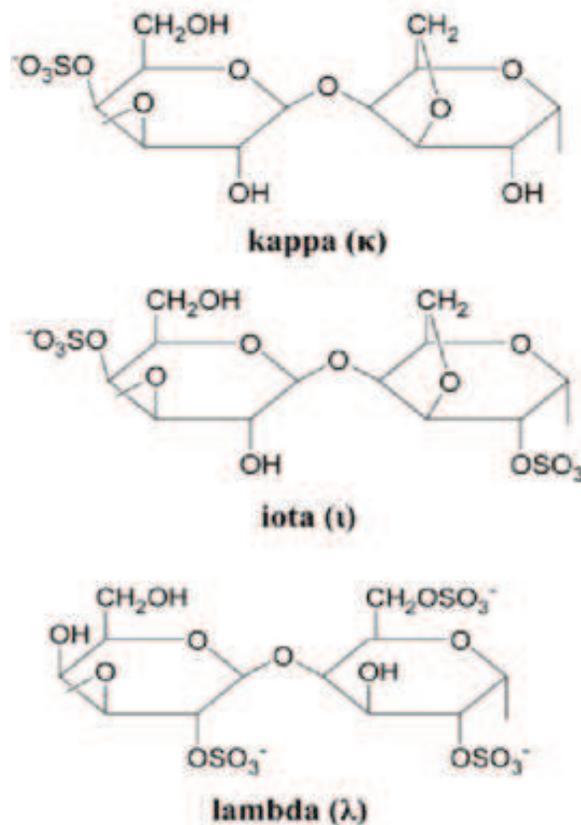
Las estructuras de las espumas son usualmente estabilizadas por agentes espumantes, que son sustancias con propiedades surfactantes, que cuando se encuentran en pequeñas cantidades en una disolución, facilitan la generación de espuma y contribuyen a su estabilidad. Pueden ser proteínas, lípidos, e incluso alcoholes. Las proteínas representan la principal categoría de agentes espumantes naturales en la industria alimentaria (Xu y col., 2020). A menudo se utilizan las proteínas lácteas (suero y caseína) y del huevo. Sin embargo, la creciente preocupación en torno a los alérgenos, las restricciones en la dieta, las creencias religiosas y el aumento de la demanda han estimulado la búsqueda de otras fuentes proteicas (Mohan y col., 2020).

Algunas proteínas tienen ciertas limitaciones en la capacidad de formación o estabilización de las espumas, y no pueden cumplir con los requisitos de la industria alimentaria, cada vez más exigente. Por esta razón, se han hecho esfuerzos continuos para estudiar las condiciones que mejoren las propiedades espumantes de las proteínas alimentarias, estudiando el efecto de distintos factores experimentales tales como temperatura (Croguennec y col., 2007), pH, fuerza iónica (Felix y col., 2020; Schwenzfeier y col., 2013) y el agregado conjunto de polisacáridos. Al respecto, existen algunos estudios que han demostrado la formación de complejos entre carrageninas y diferentes aislados proteicos de canola, quinua, suero, proteínas de  $\beta$ -lactoglobulina y quenopodinas (Stone y col., 2013; Montellano y col., 2018; Fioramonti y col., 2014; Perez y col., 2014; Romo y col., 2020).

#### **I.8.3.1. Polisacáridos: carrageninas**

Las carrageninas (CG), nombre genérico de una familia de polisacáridos, están formadas por unidades repetitivas de disacáridos. Están compuestas de residuos  $\rightarrow 3$ - $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-galactopirosanosil-(1 $\rightarrow$  junto con una

cantidad variable de sulfatación en las posiciones de hidroxilo O-2H, O-4H y O-6H (Salem y col., 2020). Son obtenidas de ciertas especies de algas rojas (*Rhodophyceae*). Han sido identificados quince tipos de carrageninas, pero debido a su versatilidad, las carrageninas: kappa ( $\kappa$ ), iota (i) y lambda ( $\lambda$ ) han sido objeto de considerables estudios. La I-CG tiene una sustitución de tres grupos sulfatos, i-CG de dos grupos sulfatos y  $\kappa$ -CG de un grupo sulfato (Figura I.7) (Stone & Nickerson, 2012).



**Figura I.7.** Estructura de carrageninas.

Las CG son utilizadas para controlar la reología de la fase acuosa de alimentos, como espesantes, estabilizantes, gelificantes y texturizantes (Therkelsen, 1993)

La i-CG se ha caracterizado por el comportamiento de gelificación influenciado por cationes (Warnakulasuriya & Nickerson, 2018). Por ejemplo, los

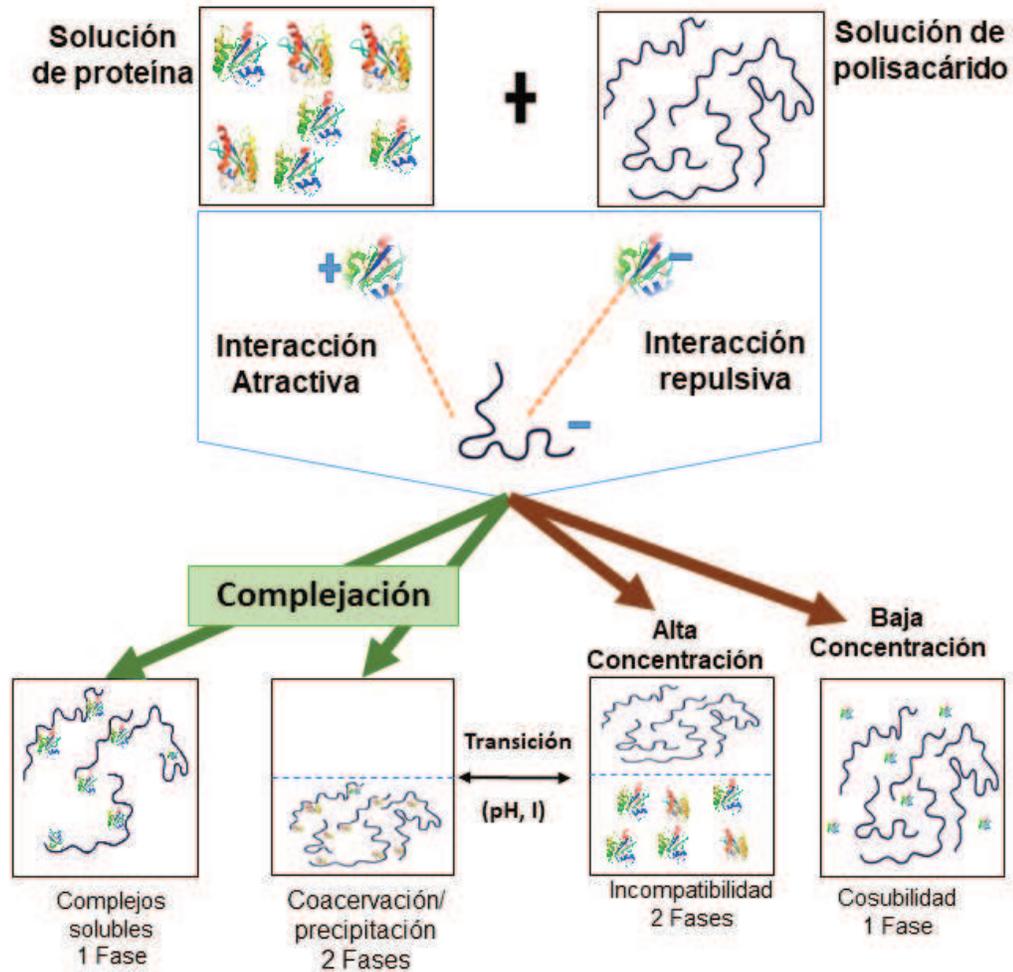
geles de las carrageninas ( $\kappa$  o  $\iota$ ) son más fuertes con  $K^+ > Ca^{2+} \gg Na^+$  (Therkelsen, 1993). La  $\iota$ -CG en solución acuosa forma geles elásticos suaves, que son más resistentes a la sinéresis que los geles formados con  $\kappa$ -CG. La temperatura y el pH también pueden afectar la estabilidad de los sistemas (Marín-Peñalver y col., 2021). Además, las carrageninas, al ser polisacáridos aniónicos que contienen grupos de sulfato ( $-SOO_3^-$ ), pueden prevenir la precipitación de las proteínas cuando el pH está cercano a su pI (Zhao y col., 2015).

### **1.8.3.2. Interacciones entre biopolímeros**

Entre los factores que determinan el tipo de interacciones proteína-polisacárido se pueden mencionar los siguientes: el peso molecular, la concentración relativa de cada biopolímero en la mezcla, la velocidad de agitación, la temperatura, la estructura conformación de los biopolímeros, el pH, la fuerza iónica de las soluciones y la carga eléctrica, entre otros (Youse y Mahdi, 2019).

El pH es uno de los factores fundamentales que determinan la formación de complejos proteína-polisacárido, ya que influye principalmente en la densidad de carga neta de las proteínas, cuando varía por arriba o por debajo de su pI (Dickinson, 2008).

Las interacciones entre ambos biopolímeros pueden ser de carácter segregativo, cuando se repelen mutuamente, dando lugar a incompatibilidad termodinámica, o asociativo, cuando se atraen y forman complejos entre sí (Figura 1.8).



**Figura I.8.** Representación esquemática de interacciones proteínas – polisacáridos en solución acuosa. (Adaptado de Matalanis y col., 2011)

Por una parte, si las proteínas y los polisacáridos muestran atracción neta, usualmente mediante interacciones electrostáticas, cuando poseen densidades de carga opuesta, dependiendo de la concentración relativa de los biopolímeros en solución, fuerza iónica y del pH del medio, podría ocurrir la formación de complejos solubles o una separación de fases asociativas (coacervación compleja). Esto último se da cuando las cargas en los complejos solubles se neutralizan completamente. Por otro lado, cuando existen interacciones repulsivas entre los biopolímeros, por presentar la misma densidad de carga, pueden tenerse dos comportamientos diferentes: (i) en soluciones muy diluidas, ambos permanecen co-solubles y el sistema presenta una sola fase homogénea, (ii) en

soluciones concentradas, por arriba del pl, el sistema puede volverse inestable, dando lugar a una separación de fases segregativa por incompatibilidad termodinámica, con una fase rica en proteínas y la otra fase rica en polisacáridos (Jarpa-Parra y col., 2016; Martinez y col., 2005; Perez y col., 2009; Youse y Mahdi, 2019).

En relación con las técnicas que se han usado para estudiar los comportamientos de las interacciones proteína-polisacárido, las más utilizadas son las medidas de turbidez, viscosidad, medidas reológicas, espectroscopía de fluorescencia, potencial zeta, tamaño de partícula, entre otros (Behrouzain y col., 2020; Perez y col., 2009).

La capacidad de crear espumas a partir de soluciones acuosas de proteínas depende en gran medida de la cinética de adsorción de la proteína a la interfase aire/agua. Las proteínas son conocidas específicamente por su actividad superficial, que le permite desempeñar un papel importante en la formación y estabilización de emulsiones y espumas mediante una combinación de mecanismos electrostáticos y estéricos. La estabilidad a largo plazo puede mejorarse aún más utilizando polisacáridos para controlar la reología y la estructura de la red de la fase continua, retardando así la separación de fases y el cremado (Rodriguez Patino & Pilosof, 2011).

La formación de complejos de proteína-polisacárido puede utilizarse para modificar la cinética de adsorción de las proteínas en la interfase aire/agua, pero también para modificar la microestructura de la capa adsorbida y controlar, por lo tanto, su estabilidad (Turgeon y col., 2007).

La cinética de adsorción de las proteínas- polisacáridos se ha estudiado ampliamente y se han encontrado grandes diferencias entre diferentes sistemas de proteínas/polisacáridos. Por ejemplo, se ha reportado que la  $\beta$ -lactoglobulina/polisacáridos (goma xantano,  $\lambda$ -carragenina) aumenta rápidamente la presión superficial (Baeza y col., 2006); las proteínas de cangrejo de río/goma xantano evidenciaron una fuerte dependencia de la presión superficial con el pH (Felix y col., 2017); las proteínas de suero mejoraron la funcionalidad interfásica con la presencia de goma xantano (Perez y col., 2010). Además, utilizando la

tensiometría de gota pendiente se ha demostrado que los complejos difundían más lentamente a la interfase que la proteína sola.

#### **I.8.4. Microencapsulación**

La microencapsulación es una técnica que se ha utilizado para cubrir ingredientes sensibles que quedan atrapados dentro de otro material que consiste en una matriz protectora de esos ingredientes, de efectos ambientales adversos (luz, humedad y oxígeno), controla su liberación en un momento y lugar determinado, enmascara sabores y olores desagradables y modifica sus atributos físicos. Existen muchas técnicas de encapsulación que incluyen procesos físicos tales como secado por pulverización (*spray-drying*), enfriamiento por atomización/recubrimiento, liofilización, extrusión y procesos químicos, como la inclusión molecular, y técnicas fisicoquímicas, como la coacervación de complejos de uno o varios núcleos y el atrapamiento de liposomas (Jamshidi y col., 2020).

##### **I.8.4.1. Secado por pulverización (*spray-drying*)**

La microencapsulación mediante secado por atomización es el método más utilizado a nivel industrial. El proceso implica la dispersión de los materiales a encapsular y de pared, y su atomización en aire caliente, produciéndose la deshidratación de las gotas y la producción de las microcápsulas (Jamshidi y col., 2020).

Las temperaturas que generalmente se utilizan son altas (150-220°C); pero el tiempo de exposición de las partículas a las altas temperaturas es corto, lo que reduce la posibilidad de que existan cambios no deseados de los compuestos termosensibles (Estevinho y col., 2013).

Las condiciones operativas de temperaturas de entrada y salida, el flujo de aire, la humedad, la composición y el tamaño de las partículas afectan a la calidad de las microcápsulas producidas por pulverización (Jamshidi y col., 2020).

Según Estevinho y col., (2013) las mejores condiciones para el secado por atomización son utilizando una alta temperatura de entrada, un alto contenido de sólidos en solución de fácil pulverización, que producen partículas sin grietas.

#### 1.8.4.2. Materiales de pared

La elección del material encapsulante es muy importante para la eficiencia del encapsulado y la estabilidad de las microcápsulas.

Los criterios para seleccionar el material de pared se basan sobre las propiedades fisicoquímicas de las sustancias por encapsular y del agente encapsulante (viscosidad, propiedades mecánicas), la compatibilidad entre ambos y los factores económicos y de procesamiento (Estevinho y col., 2013).

Los materiales de pared más utilizados son los carbohidratos (almidón, maltodextrinas, dextrosa, sacarosa), gomas (arábica, alginatos, carrageninas, agar), proteínas (albúmina, caseína, suero, leche, gelatina) y lípidos (diglicéridos, aceites, grasas). Estos materiales ayudan a reducir el contenido de humedad y actúan como barrera de protección contra la destrucción química y enzimática del material a encapsular (Saikia y col., 2015).

En este trabajo se utilizarán goma garrofín, maltodextrina y las proteínas de HM como material de pared.

La Goma Garrofín o también llamada *Locust bean gum* (LBG) se obtiene de la trituración del endospermo procedente de las semillas de la *Ceretonia Siliquia* o árbol de algarrobo. Está compuesta de galactomananos, que tienen dos unidades de galactosa y manosa (Figura I.9). El galactomanano está compuesto de una cadena principal de  $\beta$ -D-manopiranosil unidos por enlaces 1-4 con grupos laterales  $\alpha$ -D-galactopiranosil con enlaces 1-6, como cadenas laterales (Barak y Mudgil, 2014).

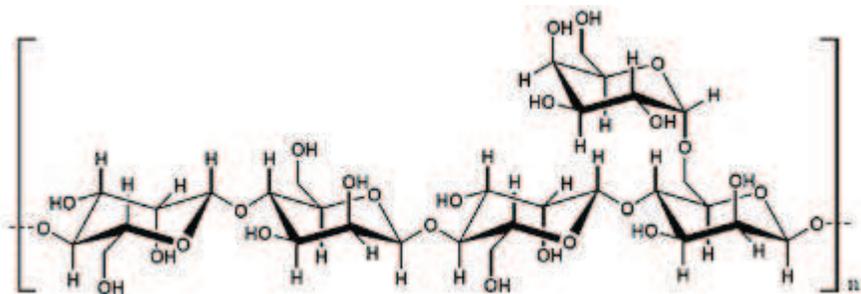
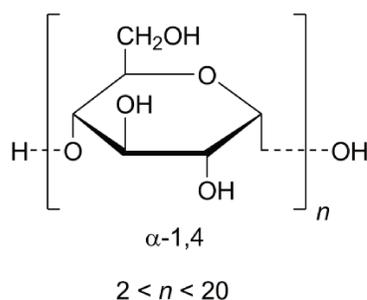


Figura I.9 Estructura de goma garrofín

El LBG muestra una importante capacidad para formar interacciones sinérgicas con otros polisacáridos, principalmente debido a los numerosos grupos OH presentes en la estructura de la molécula. Esta sinergia aumenta la flexibilidad del polímero y, en muchos casos, permite la producción de estructuras gelificantes con importantes aplicaciones biofarmacéuticas (Dionísio y Grenha, 2012).

Las maltodextrinas (MD) son un grupo de compuestos derivados de la hidrólisis enzimática o ácida del almidón. Contiene oligómeros o/y polímeros de  $\alpha$  (1,4) D-glucosa (Figura I.10) (Masum y col., 2019). Están disponibles comercialmente maltodextrinas con diferentes pesos moleculares y obtenidas con diferentes métodos y procedencia (Klinjapo y Krasaekoopt, 2018).



**Figura I.10** Estructura de la maltodextrina

#### **I.8.4.3. Microencapsulación del hierro**

La deficiencia de hierro es considerada uno de los problemas nutricionales más frecuentes en el mundo. La fortificación de los alimentos es la solución más práctica, sostenible y económica. No obstante, el tipo de sales utilizadas para la fortificación puede producir un efecto negativo sobre las propiedades organolépticas del alimento, como cambios de color y apariencia, sabor metálico, oxidación de lípidos y enranciamiento (Bryszewska y col., 2019).

Esto se debe a que gran parte de las fuentes de hierro son químicamente reactivas y producen efectos indeseables cuando se agregan a los alimentos. Por lo tanto, es beneficioso utilizar tecnologías que minimicen dichos efectos sobre la matriz alimentaria, tales como la microencapsulación.

La microencapsulación del hierro ha sido discutida por varios autores (Churio y Valenzuela, 2018; Duran y col., 2018). Se han descrito como beneficios:

- La protección del material del núcleo (sales de hierro) de factores ambientales adversos y del tracto gastrointestinal mejorando la biodisponibilidad del hierro
- El enmascaramiento del sabor indeseable de hierro.
- La disminución de los cambios de color que genera el hierro en los alimentos fortificados.
- La reducción del efecto catalizador del hierro sobre la oxidación de grasas, que reduce la vida útil del producto.
- La disminución de los efectos adversos gastrointestinales (dolor abdominal, pirosis, náuseas, diarrea, estreñimiento y heces negras) y estética dental.
- La liberación controlada en ambientes específicos del tracto gastrointestinal.
- La posibilidad de mezclar en una misma microcápsula diversas fuentes de hierro y potenciadores de la absorción del hierro como, el ácido ascórbico.

## **II. OBJETIVOS**

## **II.1. Objetivo General:**

- El objetivo general de esta tesis fue optimizar la obtención de productos enriquecidos en proteínas a partir de la hez de malta, mayor subproducto de la industria cervecera, evaluar sus propiedades tecno-funcionales y estudiar su potencial aplicación en la industria alimentaria, con el fin de agregar valor y contribuir a resolver la disposición medioambiental o reciclado de este residuo orgánico, bajo los principios de la economía circular.

## **II.2. Objetivos Específicos:**

- Optimizar la obtención de productos enriquecidos en proteínas de hez de malta proveniente de la industria cervecera local, a escala de laboratorio y de planta piloto.
- Caracterizar el producto enriquecido en proteínas de la hez de malta obtenido a escala piloto, desde el punto de vista de sus propiedades químicas
- Realizar un *screening* de propiedades tecno-funcionales del producto enriquecido en proteínas de HM (propiedades de hidratación y de gelación).
- Estudiar la capacidad del producto enriquecido en proteínas de HM en la formación de películas biodegradables y/o comestibles para su aplicación como envases activos.
- Evaluar la capacidad del producto enriquecido en proteínas de HM de formar y estabilizar espumas, solo o en mezclas con carrageninas, analizando las interacciones entre ambos biopolímeros.
- Estudiar la utilización del producto enriquecido en proteínas de HM para microencapsular hierro y optimizar su bioaccesibilidad.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **III.1. Obtención y caracterización de concentrados proteicos de la hez de malta**

#### **III.1.1. Materia prima**

La hez de malta (HM) húmeda fue proporcionada por la Cervecería Santa Fe (Cervecería Santa Fe – Compañías Cerveceras Unidas o CCU, Calchines 1401 – Santa Fe (3000), Argentina).

Se trabajó con dos partidas de HM. La HM<sub>1</sub> fue utilizada para estudiar el proceso de obtención de productos enriquecidos en proteínas de HM, al que se denominó concentrado proteico (CP), a nivel laboratorio; y con la partida de HM<sub>2</sub> se obtuvo el concentrado proteico a escala piloto sobre el cual se estudiaron las propiedades tecno-funcionales y sus potenciales aplicaciones.

#### **III.1.2. Caracterización de la composición de hez de malta**

##### **III.1.2.1. Determinación de la composición centesimal**

Una alícuota de cada una de las partidas de HM fue secada en una estufa con circulación forzada de aire a 50°C durante 24 h. Las muestras secas se molieron y se utilizaron para la determinación de la composición centesimal, siguiendo las metodologías de la A.O.A.C., (2000).

Se determinaron la humedad, el contenido de grasa bruta (extracto etéreo), y los contenidos de cenizas y proteínas (N×6,25). El contenido de fibra dietaría total (%FDT) se determinó en muestras secas y desgrasadas utilizando la metodología AOAC 985.29 (AOAC, 2000) adoptada por el kit comercial de Megazyme®.

##### **III.1.2.2. Determinación del contenido de ácidos grasos libres**

El contenido de ácidos grasos libres se determinó mediante la técnica de Lowry y Tinsley (1976), con ligeras modificaciones. Se mezcló 1 g de la muestra con 5 mL de la mezcla de cloroformo: metanol (2:1) v/v. Se agitó en vortex durante 30 s, luego se sonicó en un ultrasónico baño y se centrifugó a 2500×g por 15 min para separar fases. Una alícuota de la fase de cloroformo se evaporó, se levantó con tolueno y se adicionó el reactivo de acetato cúprico-piridina. Se agitó, se centrifugó a 2500×g por 15 min y se midió la absorbancia de la fase superior en

espectrofotómetro a 715 nm. El resultado se expresó en mmol 100 g<sup>-1</sup> muestra b.s., utilizando ácido láurico como estándar. Las mediciones se realizaron por triplicado.

### **III.1.2.3. Perfil de aminoácidos**

La determinación del perfil de aminoácidos proteicos se llevó a cabo mediante el método propuesto por Alaiz y col., (1992). Una alícuota de HM se hidrolizó con HCl (6 mol L<sup>-1</sup>), durante 24 h, a 110°C, en tubos cerrados bajo atmósfera de nitrógeno. Tras la hidrólisis, las muestras se llevaron a sequedad en rotavapor y se redisolviéron en buffer de borato sódico 1 mol L<sup>-1</sup>, pH 9,0, llevándolas a un volumen de 25 mL. La derivatización de los aminoácidos se hizo con etoximetilenmalonato de dietilo a 50°C, durante 50 min. La separación de los aminoácidos se realizó mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC). El equipo consta de una bomba Shimadzu Serie LC-20AT, con un detector de arreglo de diodos Shimadzu SPD-M20A. Se utilizó una columna de fase inversa Novapack C18 (300 mm x 3,9 mm), tamaño de partícula: 4 µm.

Para la elución de los analitos, se utilizó un gradiente binario constituido por dos buffers: A: acetato de sodio 25 mmol L<sup>-1</sup> pH 6,0 y B: acetonitrilo. La elución se realizó a 0.9 mL min<sup>-1</sup> y 18°C de la siguiente manera: de 0 a 3 min, gradiente lineal desde 91% a 86% A; de 3 a 13 min, elución con 86% A; de 13 a 30 min, gradiente lineal desde 86% a 69% A y de 30 a 35 min, elución con 69% A. Los aminoácidos eludidos fueron detectados a 280 nm. Como patrón interno, se utilizó ácido D, L-α-aminobutírico. La calibración se realizó con un estándar de aminoácidos (AAS18, Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE. UU.).

Por otro lado, para la determinación del triptófano se siguió el método de Yust y col., (2004). Para ello, una alícuota de HM se mezcló con 3 mL de NaOH (4 mol L<sup>-1</sup>), a 110°C durante 4 h, en tubos cerrados bajo atmósfera de nitrógeno. Tras la hidrólisis alcalina, las muestras fueron enfriadas en hielo y neutralizadas a pH 7,0, usando HCl (12 mol L<sup>-1</sup>). Posteriormente, fueron diluidas hasta un volumen de 25 mL con buffer borato sódico 1 mol L<sup>-1</sup>, pH 9,0. El análisis se llevó a cabo

mediante HPLC. Se utilizó como estándar L-triptófano (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE. UU.). Las mediciones se realizaron por duplicado.

### **III.2. Obtención y caracterización del concentrado proteico de hez de malta**

Las diferentes experiencias realizadas para definir las condiciones de extracción de proteínas de HM fueron llevadas a cabo en el Instituto de Tecnología de Alimentos de la FIQ-UNL. Algunos detalles se han omitido por cuestiones de confidencialidad.

Se utilizó la HM húmeda como material de partida, considerando los costos de energía adicionales asociados con el secado de esta.

#### **III.2.1. Elección del pH de extracción**

Se evaluó la solubilidad de las proteínas de la HM siguiendo la técnica de Drago y González, (2000). Para esto, se preparó una suspensión de HM de 5 g 100 g<sup>-1</sup>, se ajustó la dispersión a diferentes pHs (de 2,0 a 10,0), usando NaOH o HCL 0,1 mol L<sup>-1</sup> y se agitó durante 30 min. Después se centrifugó a 3000xg durante 15 min. En el sobrenadante se determinó el contenido de proteínas, utilizando la técnica de Kjeldahl (A.O.A.C., 2000). Las mediciones se realizaron por triplicado.

La solubilidad se calculó como el porcentaje de proteínas en la fracción soluble, respecto al contenido de proteínas de la muestra (Ec. 1).

$$\text{Solubilidad (\%)} = \left[ \frac{(\text{g proteínas solubles})}{(\text{g proteínas muestra})} \right] \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

#### **III.2.2. Elección de la temperatura y del tiempo de extracción**

Una vez seleccionado el pH de extracción, se estudió el efecto de la temperatura (50, 70 y 90 °C) sobre la extracción alcalina de proteínas de HM.

Se realizaron dispersiones de la HM a 5 g 100 g<sup>-1</sup> y se las agitó durante 60 min. Luego, cada dispersión fue filtrada por un tamiz de 0,297 mm y centrifugada a 3000xg, durante 30 min.

Posteriormente, se evaluó el tiempo de extracción (60, 120 y 180 min) a 50 °C, procediendo como se indicó anteriormente.

Al sobrenadante obtenido se le determinó el contenido de proteínas (Ec. 1) y el contenido de sólidos solubles (Ec. 2) y la pureza (Ec.3).

$$\text{Sólidos solubles (\%)} = \left[ \frac{(\text{g sólidos solubles})}{(\text{g sólidos muestra})} \right] \times 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$\text{Pureza (\%)} = \left[ \frac{\text{g proteínas en la muestra}}{\text{g sólidos solubles}} \times 100 \right] \quad (\text{Ecuación 3})$$

### III.2.3. Estudio de pre-tratamientos facilitadores de la extracción

A fin de facilitar la extracción de proteínas se evaluaron diferentes pre-tratamientos sobre la HM que incluyeron el uso de sulfito y de enzimas.

En el caso del remojo de la HM con sulfito se siguió la metodología propuesta por Bandeira Da Cruz y col., (2015). Brevemente, la HM se remojó en agua con sulfito de sodio (0,3 g L<sup>-1</sup>) y ácido láctico (0,4 g L<sup>-1</sup>) durante 12 h a 50°C. Posteriormente, se investigó el efecto de la temperatura, realizando este pre-tratamiento a 25°C.

En el caso del uso de enzimas, se evaluaron carbohidrasas y proteasas. Estas fueron denominadas de manera general como E. Los nombres de las enzimas y condiciones de uso no se han detallado por razones de confidencialidad. Se trabajó en las condiciones de pH, temperatura y relación enzima/sustrato sugeridas por los fabricantes, utilizando un reactor termostatzado de 500 mL de capacidad.

Luego de realizados los diferentes pre-tratamientos de la HM, se procedió con la extracción a pH 10, 50°C y 120 min, definida con los ensayos anteriores. Las muestras se centrifugaron por 30 min a 3000xg y 25 °C.

Se determinaron los porcentajes de extracción de sólidos y de proteínas como la relación de los sólidos o proteínas extraídas a pH 10, luego de los diferentes pre-tratamientos, respecto al contenido inicial de sólidos o proteínas.

Además, se calculó la pureza como la relación del contenido de proteínas y de sólidos del extracto.

#### **III.2.4. Obtención de concentrados proteicos de hez de malta (CP)**

Una vez seleccionadas las condiciones del pre-tratamiento de la HM, se procedió con la obtención a escala piloto del concentrado proteico en la planta piloto del Instituto de Tecnología de Alimentos- FIQ-UNL. Para ello, se llevaron a cabo el pre-tratamiento seleccionado sobre 20 kg de la HM<sub>2</sub> (humedad del 81,5%) y la extracción alcalina a pH 10 durante 120 min a 50°C. Posteriormente, la muestra se centrifugó utilizando una centrífuga de canasto (2800 rpm - 20 °C). El sobrenadante fue ajustado a pH 7 y secado por aspersion utilizando un secador spray Niro (Production Minor®, Copenhagen, Dinamarca) con una temperatura de entrada de 170–190 °C y una temperatura de salida de 80–90 °C.

#### **III.2.5. Caracterización del concentrado proteico de hez de malta**

##### **III.2.5.1. Composición centesimal**

La composición centesimal se realizó como en el inciso III.1.2.

##### **III.2.5.2. Compuestos fenólicos**

La extracción de compuestos fenólicos se realizó con una mezcla de metanol: agua 80:20 sobre una dispersión de la muestra de 5 g 100 mL<sup>-1</sup>. El contenido de compuestos fenólicos libres se determinó siguiendo la técnica descrita por Schanderl (1970), que utiliza el reactivo de Folin-Cicalteau. Se utilizó una curva patrón de ácido gálico (AG) en un rango de concentración de 20-500 g L<sup>-1</sup>. Los resultados se expresaron como mg AG 100 g<sup>-1</sup> b.s.

##### **III.2.5.3. Perfil de aminoácidos**

La determinación cuantitativa de aminoácidos se llevó a cabo como se describió en el inciso III.1.2.3.

#### **III.2.5.4. Perfil electroforético**

La composición polipeptídica de la HM y del CP se determinó mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo con Laemmli, (1970). Se utilizó un gel de apilamiento de 4% y un gel separador de 12,5% y un sistema minilabs (celda de electroforesis Mini-Protean II, Bio-Rad). Las placas de gel se fijaron y tiñeron con una solución de 1,25 g L<sup>-1</sup> de Coomassie Blue R-250, 0,5 L L<sup>-1</sup> metanol y 0,1 L L<sup>-1</sup> de ácido acético en agua. Posteriormente se trataron con una solución decolorante de 0,25 L L<sup>-1</sup> metanol y 0,1 L L<sup>-1</sup> de ácido acético. Los pesos moleculares de las fracciones fueron estimados mediante el uso de un kit de calibración cuyos pesos moleculares proteicos fueron: 94 kDa (fosforilasa b), 67 kDa (albúmina), 43 kDa (ovoalbúmina), 30 kDa (anhidrasa carbónica), 21,5 kDa (inhibidor de tripsina) y 14,4 kDa (lisozima) (Bio-Rad catálogo N°161-0304). (Bio-Rad). Las muestras fueron diluidas con el buffer de muestra (0,5 M tris-Cl pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol y 5% Azul de Bromofenol p/v), y calentadas en baño de agua a 100°C durante 90 segundos.

#### **III.2.5.5. Perfil de pesos moleculares por FPLC**

El perfil de pesos moleculares del CP fue evaluado utilizando cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) según (Cian y col., 2018). Para esto, se empleó un sistema AKTA Prime, equipado con una columna peptídica Superdex 75, (GE Life Sciences, Piscataway, NJ, USA). El volumen de inyección fue de 0,1 mL (2,8 mg de proteína mL<sup>-1</sup>). La elución se llevó a cabo utilizando buffer de fosfato de potasio 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7.0 con NaCl 150 mmol L<sup>-1</sup> con un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. La elución se monitoreó a 280 nm y la masa molecular se estimó utilizando los estándares de peso molecular (MW) de Pharmacia (NJ, EE. UU.): dextrano azul (2000 kDa), citocromo C (12,5 kDa), aprotinina (6,512 kDa), bacitracina (1,450 kDa), citidina (0,246 Da) y glicina (0,075 kDa). Las mediciones se realizaron por duplicado.

### **III.2.5.6. Potencial $\zeta$ , punto isoeléctrico y tamaño de partícula de las dispersiones**

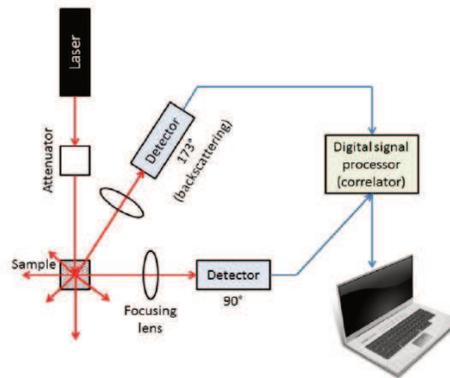
Para estas determinaciones se utilizó el equipo Zetasizer Nano ZS90 Malven Instruments Ltd. (Reino Unido) equipado con un láser de He-Ne 4mW de longitud de onda de salida de 632,8 nm y un ángulo detector de 173° y con un Auto titulador MPT que se usó para ajustar los diferentes valores de pH. Las muestras se colocaron en el contenedor de muestra y se realizaron titulaciones de pH desde 6 a 2, bajando de a 0,5 unidades. El potencial  $\zeta$  se calculó sobre la base de la técnica de movilidad electroforética, utilizando el modelo de Helmholtz-Smoluchowski. Simultáneamente se midieron los tamaños de partícula por medidas de dispersión dinámica de luz (DLS), obteniéndose como parámetro el valor de tamaño promedio (Z-average) a partir de la deconvolución de la función de correlación (método de CONTIN). El índice de refracción utilizado para proteínas fue 1,335 (Wouters y col., 2019). Las mediciones se realizaron por duplicado a  $25 \pm 0,2$  °C.

El equipo DLS consta básicamente de tres componentes: un láser, el cual hace incidir un haz de luz sobre la muestra; un detector que colecta la luz dispersada y un correlador digital que permite procesar la señal (Figura III.1). Este equipo permite medir tamaños de partículas en un rango de 0,6 a 6000 nm.

La técnica de DLS se basa sobre el hecho de que las partículas y las macromoléculas en solución, a temperatura y viscosidad constante, están sometidas a Movimiento Browniano del cual depende el tamaño de partículas. La luz láser que es dispersada por las partículas de una muestra dentro de un pequeño volumen focal de DLS es registrada y cuantificada de forma continua por un detector de recuento de fotones colocado en un ángulo específico. El número de fotones que golpea el detector, que puede ser un tubo fotomultiplicador, fluctúa con el tiempo. Esto se explica por el movimiento browniano de las partículas dentro y alrededor del volumen de la muestra que está en el foco del láser, lo que da como resultado intervalos de fluctuación característicos dependientes del tamaño del componente de campo eléctrico de la luz dispersa (Falke & Betzel, 2019). Cuanto más pequeño sea el tamaño de partícula, más rápido será el

Movimiento Browniano y cuanto más grande, más lento se volverá (Malvern Instruments Ltd, 2014).

La concentración de proteína de las muestras fue de  $1 \text{ g L}^{-1}$  para que la misma cumpliera con los parámetros de calidad del equipo. Las muestras se equilibraron durante 1 h a temperatura ambiente, se colocaron en el contenedor de muestra y se realizaron titulaciones de pH desde 6 a 2, bajando de a 0,5 unidades. Las mediciones se realizaron por triplicado.



**Figura III.1** Esquema que muestra la instrumentación de DLS.

### **III.2.6. Propiedades tecno-funcionales del concentrado proteico de hez de malta**

#### **III.2.6.1. Solubilidad**

La solubilidad de los concentrados proteicos de hez de malta se evaluó a valores de pHs desde 2,0 a 10,0. El análisis se llevó a cabo siguiendo la técnica de Drago y González, (2001), como se describió en el inciso III.2.1.

#### **III.2.6.2. Absorción de agua**

La absorción de agua fue determinada utilizando el equipo Baumann. Se determinó sobre 50 mg de muestra, registrando los mL de agua absorbida a través del tiempo. La absorción fue expresada como la cantidad de agua absorbida ( $\text{mL g}^{-1}$  muestra b.s.) al punto de equilibrio. Las mediciones se realizaron por triplicado.

### **III.2.7. Capacidad de formar geles**

#### **III.2.7.1. Mínima concentración de gelificación (MCG)**

La mínima concentración de gelificación (MCG) fue determinada por el método de Elkhalfa & Bernhardt, (2010). Se prepararon dispersiones acuosas del CP a 8, 16, 20, 25 y 30 g 100<sup>-1</sup>g a pH 8. Alícuotas de 5 mL de se colocaron en tubos y se trataron a 80°C por 30 min, seguido de un enfriamiento rápido bajo agua corriente a 4°C. Finalmente, se colocaron los tubos boca abajo y se verificó si las suspensiones formaron o no un gel. La MCG fue determinada como la primera concentración a la cual la muestra no cae o resbala al invertir el tubo. Las mediciones se realizaron por triplicado.

#### **III.2.7.2. Retención de agua**

Se midió sinéresis utilizando el método de Elkhalfa y Bernhardt, (2013). Para ello, se realizaron geles a la MCG a pH 3, 6 y 8. Las dispersiones se colocaron en tubos de centrifuga de 50 mL, se calentaron por 30 min a 80°C y se refrigeraron a 4 °C por 24 h. Luego, los tubos se centrifugaron por 15 min a 2500 xg. Se descartó el sobrenadante y se calculó el porcentaje de retención como la relación porcentual entre el peso del líquido retenido en el gel y el peso total del gel antes de la centrifugación. Las mediciones se realizaron por triplicado.

#### **III.2.7.3. Análisis de Perfil de Textura (TPA) de los geles**

Para el análisis del perfil de textura (TPA) de los geles, se utilizó un texturómetro A.XT.plus – Stable Micro Systems (Figura III.2).



**Figura III.2** Texturometro A.XT.plus – Stable Micro Systems utilizado para analizar el perfil de textura de los geles.

Se prepararon muestras de gel a la MCG a pH a 3, 6, 8 que se almacenaron a 4 °C por 24 h previo a su caracterización. Para el análisis de textura se realizó una doble compresión empleando una sonda de 3 mm, a una velocidad de 1 mm s<sup>-1</sup>, con un tiempo de espera de 5 s entre las compresiones.

En la Figura III.3. se muestra el perfil típico de TPA obtenido en estos ensayos, a partir del cual se calcularon los siguientes parámetros (Trinh y Glasgow 2012):

- *Dureza (g)*: es la fuerza máxima (P1) de la primera compresión.
- *Resiliencia (%)*: es la relación entre el área ascendente y el área descendente de la primera compresión Ec.4:

$$R = \frac{\text{Área}_2}{\text{Área}_1} \quad (\text{Ecuación 4})$$

- *Cohesividad*: la relación del área de la fuerza normal bajo la primera y segunda compresión Ec. 5.

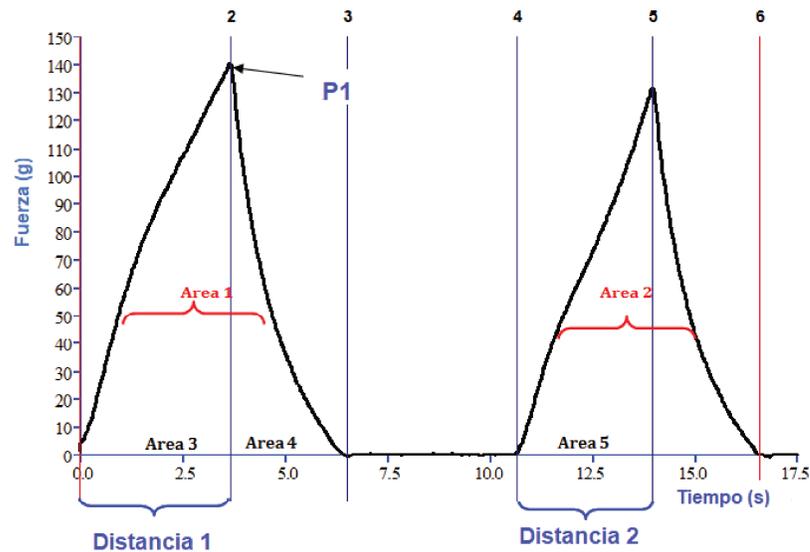
$$C = \frac{\text{Área}_2}{\text{Área}_1} \quad (\text{Ecuación 5})$$

- *Elasticidad (%)*: es la relación entre la segunda distancia de compresión y la primera distancia de compresión Ec.6.

$$E = \frac{Distancia_2}{Distancia_1} \quad (\text{Ecuación 6})$$

- *Gomosidad*: se calculó como: la dureza \* cohesión.
- *Masticabilidad*: se calculó como: dureza\* cohesión\*elasticidad.
- *Adhesividad*: corresponde al área A3.

Las mediciones se realizaron en siete réplicas.



**Figura III.3.** Curvas fuerza-tiempo

### III.2.8. Análisis estadísticos

Las diferencias estadísticas se determinaron mediante análisis de varianza utilizando el Software Statgraphics Centurion XV versión 15.2.06 (Statgraphics, Warrenton, EE. UU.). Para esto, se utilizó el método de la diferencia mínima LSD de Fisher a un nivel de confianza del 95%.

### **III.3. Propiedades filmogénicas de las proteínas de HM**

#### **III.3.1. Materiales**

Los materiales se desarrollaron utilizando el concentrado proteico de hez de malta (CP) obtenido en planta piloto; junto a glicerol (Gly) y polietilenglicol 400 (PEG) (ambos Anedra) se utilizaron como plastificantes. Para la determinación de propiedades antioxidantes se usaron: ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico (Trolox) y  $\beta$ -caroteno adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE. UU.) y el ácido ascórbico, de Cicarelli (Argentina). Otros reactivos utilizados en los experimentos fueron de grado analítico y adquiridos en Cicarelli Laboratorios (San Lorenzo, Santa Fe, Argentina).

#### **III.3.2. Obtención de películas**

Las películas se obtuvieron por casting. Se prepararon dispersiones acuosas de 75 g L<sup>-1</sup> de CP con y sin el agregado de glicerol o polietilenglicol 400 (PEG) en una relación de 0,25 g g<sup>-1</sup> de CP. El pH de estas se ajustó a 2,0, 8,0 u 11,0, y se mantuvieron bajo agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, 15 mL de las dispersiones resultantes se dispusieron sobre cajas de Petri de poliestireno (64 cm<sup>2</sup>), se secaron en estufa con convección forzada (Yamato, DKN600, EE. UU.) a 60°C durante 5 h. Las películas obtenidas se acondicionaron por 48 h a 20°C y 58% de humedad relativa (HR) en desecadores con soluciones saturadas de NaBr previo a ser caracterizadas.

Posteriormente en base a los resultados obtenidos, se decidió continuar trabajando con PEG como plastificante a pH 2. Se prepararon las películas como se mencionó anteriormente, utilizando 75 g L<sup>-1</sup> de CP en agua destilada. Se evaluó el efecto del nivel de plastificante (de 0 a 0,25 g PEG g<sup>-1</sup> de CP), obteniéndose las películas F<sub>0</sub>, F<sub>0,05</sub>, F<sub>0,10</sub>, F<sub>0,15</sub>, F<sub>0,20</sub>, F<sub>0,25</sub> con las formulaciones mostradas en la Tabla III.1.

**Tabla III.1.** Formulaciones filmogénicas de proteínas de HM (CP) y polietilenglicol (PEG)

	<b>CP (%)</b>	<b>PEG (%)</b>
F <sub>0</sub>	7,49	0,00
F <sub>0,05</sub>	7,51	0,38
F <sub>0,10</sub>	7,51	0,74
F <sub>0,15</sub>	7,50	1,13
F <sub>0,20</sub>	7,50	1,52
F <sub>0,25</sub>	7,50	1,87

### **III.3.3. Caracterización de las películas de proteínas de HM**

Las películas preparadas con proteínas de HM y PEG a pH 2 fueron evaluadas utilizando la metodología que se describe a continuación. Además, se preparó un control sin PEG. Dado que la película control no pudo ser retirada íntegramente del molde en el que se formó, sólo se analizaron las propiedades que requerían pequeños trozos de película.

#### **III.3.3.1. Espesor**

Se determinó utilizando un micrómetro digital (SC 117, Schwyz, Suiza) para materiales no conductores ni ferrosos. Las mediciones se realizaron en cinco posiciones a lo largo de las probetas rectangulares usadas para el ensayo de tracción, y en el centro y en ocho posiciones alrededor del perímetro en las probetas utilizadas para medir permeabilidad al vapor de agua (WVP). Las propiedades mecánicas y WVP fueron calculadas usando el espesor promedio para cada réplica de la película.

#### **III.3.3.2. Propiedades ópticas de las películas**

##### **III.3.3.2.1. Color (CIE-Lab)**

Las determinaciones de color de las películas se hicieron empleando un colorímetro Konica Minolta Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta Chroma Co., Osaka, Japón) (Figura III.4). El análisis de color de las películas se realizó sobre la base del espacio de color definido por la norma CIE-Lab: plano cromático de

coordenadas  $a^*$  (valores positivos corresponden a tonos rojos y negativos a verdes) y plano cromático de coordenadas  $b^*$  (valores positivos tonos amarillos y negativos azules), situándose perpendicular a ellos el eje  $L^*$  (luminosidad). El colorímetro fue calibrado con una superficie estándar blanca provisto por Minolta, cuyas coordenadas fueron:  $L^*$  estándar = 97,55,  $a^*$  estándar = - 0,03 y  $b^*$  estándar = 1,73. Los parámetros de color de las películas se determinaron sobre la superficie estándar antes mencionada. La diferencia total de color ( $\Delta E^*$ ) se calculó como se describe en la Ec. 7.

$$\Delta E^* = [(L^*_{\text{película}} - L^*_{\text{estándar}})^2 + (a^*_{\text{película}} - a^*_{\text{estándar}})^2 + (b^*_{\text{película}} - b^*_{\text{estándar}})^2]^{0,5} \text{ (Ecuación 7)}$$

Los valores informados son la media de 9 determinaciones sobre cada una de las muestras.



**Figura III.4** Determinación de color de las películas proteicas de HM.

#### **III.3.3.2.2. Opacidad**

Se analizó el espectro de absorbancia de las películas en función de la longitud de onda, entre 400 y 800 nm. Para ello, se cortaron porciones de las películas con las dimensiones internas de la cubeta y se colocaron cuidadosamente dentro de la misma. La lectura de absorbancia se efectuó en un

espectrofotómetro Sinergy HT (BioTeK, Estados Unidos). La opacidad se calculó como el valor de absorbancia a 500 nm con relación al espesor de la película (Cian y col., 2014). Los resultados fueron expresados en UA mm<sup>-1</sup>. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### **III.3.3.3. Susceptibilidad de las películas al agua**

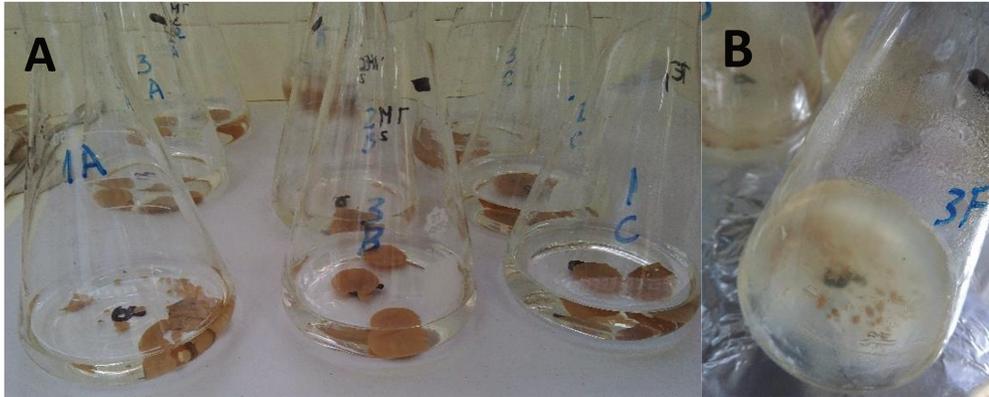
#### **III.3.3.3.1. Contenido de humedad**

El contenido de humedad se determinó utilizando el método D644-99. Para ello, pequeñas porciones de películas recolectadas después del acondicionamiento se cortaron y se colocaron en cajas de Petri de vidrio. Se pesaron antes y después del secado en una estufa a 105°C, durante 24 h. El contenido de humedad se calculó como el porcentaje de pérdida de peso, respecto del peso original. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### **III.3.3.3.2. Solubilidad en agua**

La solubilidad en agua de las películas se midió siguiendo el método propuesto por Cian y col., (2014), con algunas modificaciones. Para ello, las películas se cortaron en círculos de 2 cm de diámetro y se sumergieron en 50 mL de agua destilada. Se agitaron a 100 rpm utilizando un agitador modelo TT400 (Ferca, Argentina) durante 24 h a 25°C (Figura III.5). Las dispersiones obtenidas fueron filtradas con papel de filtro Whatman N°1 (previamente secado y pesado) utilizando un embudo Buchtner conectado a un kitasato y a una bomba de vacío (Dosivac, DVP-2A, Argentina). El material insoluble retenido en el papel de filtro fue secado en estufa a 105°C durante 24 h. La solubilidad de las películas se calculó según la Ec. 8. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

$$\text{Solubilidad en agua} = \frac{(\text{peso inicial} - \text{peso final})}{\text{peso inicial}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 8})$$



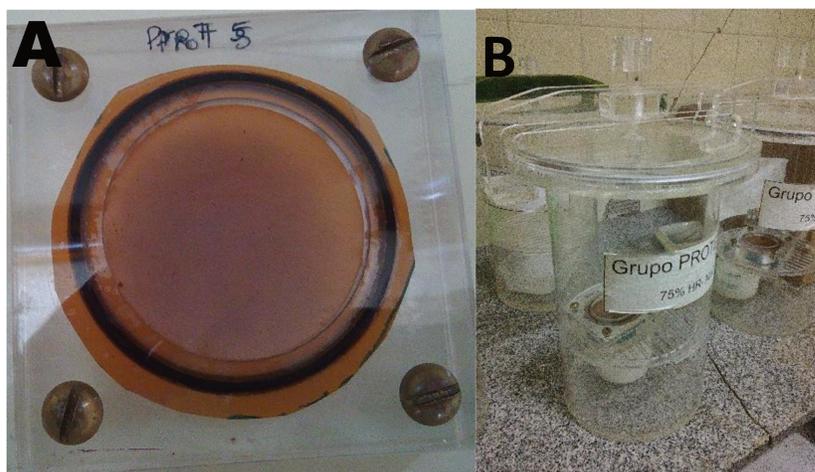
**Figura III.5.** Ensayo de solubilidad en agua. Antes (izq.) y después (der.) del tratamiento de solubilización.

### III.3.3.3.3. Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

Las determinaciones se realizaron siguiendo el método ASTM E96-00 (2004) con algunas modificaciones. Las muestras de películas se colocaron en una celda de permeación con una abertura circular de  $0,00185 \text{ m}^2$  (Figura III.6A). Este ensayo se efectuó a  $20^\circ\text{C}$ , colocando las celdas en un desecador (Figura III.6B). La fuerza impulsora a través de la película, expresada como el gradiente de presión parcial de vapor, fue de  $1753,35 \text{ Pa}$ . Para mantener dicha fuerza impulsora, se utilizó sílica anhidra ( $\text{HR}_c = 0$ ), en la celda de permeación, y solución saturada de  $\text{NaCl}$  ( $\text{HR}_d = 0,75$ ) en el desecador. La humedad relativa dentro de la celda fue siempre menor que la del desecador, por lo que la permeación de vapor de agua a través de la película fue determinada por la ganancia de peso, en la celda de permeación. Luego de alcanzar el estado estacionario, (aproximadamente en 1 h), se realizaron 8 determinaciones de peso de la celda de permeación, durante 5 h. Los cambios en el peso de la celda fueron registrados y graficados en función del tiempo. Se determinó la pendiente del gráfico obtenido por medio de regresión lineal ( $\Delta m / \Delta t$ ,  $\text{g H}_2\text{O s}^{-1}$ ), siendo ésta la velocidad de permeación del vapor de agua. La permeabilidad al vapor de agua se calculó según la Ec. 9. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

$$\text{PVA} = \frac{\left(\frac{\Delta m}{\Delta t}\right)}{P_{\text{vH}_2\text{O}} \cdot (RH_d - RH_c) \cdot A} \cdot \delta \quad (\text{Ecuación 9})$$

Donde, PVA: permeabilidad al vapor de agua ( $\text{g H}_2\text{O Pa}^{-1} \text{s}^{-1} \text{m}^{-1}$ );  $\Delta m/\Delta t$ : la tasa de cambio de peso ( $\text{g H}_2\text{O s}^{-1}$ );  $\delta$ : espesor de la película;  $P_v^{\text{H}_2\text{O}}$ : presión de vapor de agua de saturación a la temperatura del ensayo (2339.27 Pa, a 20 °C); RH<sub>c</sub>: humedad relativa en la celda de permeación; RH<sub>d</sub>: humedad relativa en el desecador; A: área de permeación ( $\text{m}^2$ ).

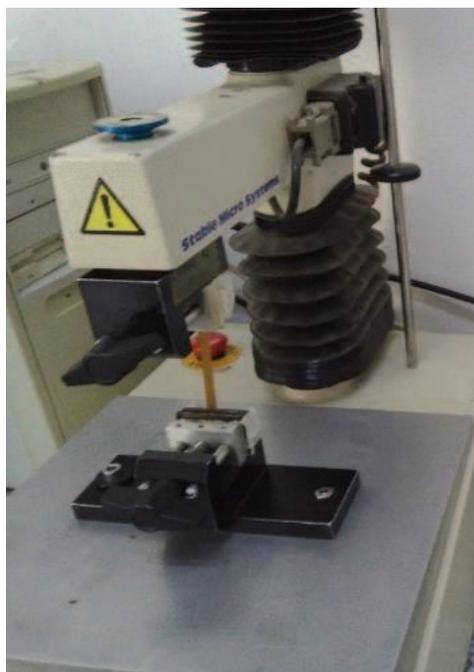


**Figura III.6** (A) Película proteica de hez de malta colocada en la celda de permeación (con sílica en su interior, HR<sub>c</sub>=0) (B) Desecador (con solución saturada de NaCl, HR<sub>d</sub>=0,75).

#### III.3.3.4. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las películas se realizaron de acuerdo con los procedimientos descritos en el método ASTM D882-02 (2004), empleando un texturómetro TA.XT2i (Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra), equipado con un sistema de mordazas para tensión A/TG y un software específico (TexturExpert V.1.22, Stable Micro Systems, Inglaterra), Figura III.7. Se ensayaron muestras de películas rectangulares de 70 x 6 mm, utilizando una separación inicial de mordazas de 50 mm y una velocidad de separación de estas de  $0,5 \text{ mm s}^{-1}$ . Se registró la curva fuerza (N) vs. distancia (mm), la cual se transformó en tensión ( $\sigma$ =fuerza/área transversal de la película) vs. elongación ( $\epsilon$ = porcentaje de elongación respecto de la separación inicial de las mordazas). De las mismas se obtuvieron la Tensión máxima a la tracción al momento de ruptura (MPa), la

elongación al momento de la ruptura (MPa) y el módulo elástico E (%) como la pendiente de la recta tangente a la curva tensión-deformación, en su sección lineal inicial (a bajas deformaciones). Se realizaron 12 determinaciones para cada formulación utilizando diferentes películas.



**Figura III.7.** Ensayo de tracción en películas de hez de malta, realizado con un texturómetro TA.XT2i (Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra).

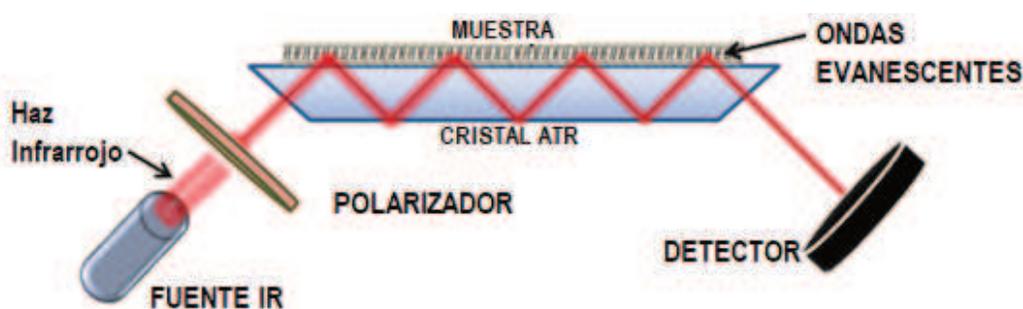
### **III.3.3.5. Propiedades estructurales**

#### **III.3.3.5.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR)**

Los espectros infrarrojos de películas se realizaron utilizando un espectrómetro de infrarrojo ATR-FTIR (Shimadzu, model IR Prestige 21) en el rango de número de onda  $400-4000\text{ cm}^{-1}$ . Las películas fueron depositadas sobre un cristal ATR de ZnSe (Figura III.8). Las medidas fueron realizadas a temperatura ambiente. Los espectros fueron analizados con Origin Pro-2015 software versión b9 2.2.214 (Origin Lab Corporation, USA). Los espectros fueron corregidos, al inicio del estudio, a  $1600-1700\text{ cm}^{-1}$  y se normalizaron para fines de comparación. Las posiciones máximas determinadas por deconvolución se confirmaron mediante un segundo espectro, derivado en la banda de amida I ( $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ ).

Los valores de cada estructura secundaria de proteína se obtuvieron en  $1630\text{ cm}^{-1}$  para hoja  $\beta$  antiparalela,  $1682\text{ cm}^{-1}$  para hoja  $\beta$  paralela,  $1642\text{-}1657\text{ cm}^{-1}$  para estructuras al azar,  $1662\text{-}1686\text{ cm}^{-1}$  para giros  $\beta$  y  $1648\text{-}1657\text{ cm}^{-1}$  para  $\alpha$ -hélices (Barth, 2007; Smith, 2011).

El porcentaje de cada estructura secundaria de proteína se calculó como la proporción de su área de pico deconvolucionada al área total de la banda de amida I (Wang y col., 2011). Se utilizaron los mismos parámetros para todos los espectros. Se realizaron tres repeticiones para cada formulación.



**Figura III.8** Principales componentes de FTIR-ATR

### III.3.3.6. Propiedades bioactivas de las películas

La fracción soluble de las películas obtenidas según se indicó en el punto III.4.2 se evaluó respecto a propiedades bioactivas.

#### III.3.3.6.1. Ensayo de bloqueo del radical ABTS<sup>+</sup>

El ensayo de capacidad de bloqueo del radical catión ABTS<sup>+</sup>, se realizó de acuerdo con Cian y col., (2012). Para estimar la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC), se realizó una curva de inhibición del ABTS<sup>+</sup> en función de la concentración (0-  $2.5\text{ mmol L}^{-1}$ ) de soluciones estándar de Trolox (6-hidroxi.2,5,7,8,-tetrametilcroman-2-carboxílico), en buffer salino a pH 7,4. Las lecturas de absorbancias se tomaron a  $734\text{ nm}$  y fueron registradas a los 6 min de iniciada la reacción. La TEAC de las películas se expresó como  $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  proteína. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

#### **III.3.3.6.2. Poder reductor**

Para la determinación del poder reductor (PR) de las películas se siguió la metodología propuesta por Cian y col., (2015). Brevemente, a 0,2 mL de cada extracto se le adicionaron 0,2 mL de buffer fosfato pH 6,6 (0,2 mol L<sup>-1</sup>) y 0,2 mL de ferricianuro de potasio (1 g 100 mL<sup>-1</sup>). La mezcla obtenida fue incubada a 50°C durante 20 min. Posteriormente, se adicionaron 0,2 mL de ácido tricloroacético (10 g 100 mL<sup>-1</sup>). Luego a 0,2 mL se les adicionó 0,2 mL de agua destilada y 40 µL de cloruro férrico (0,1 g 100 mL<sup>-1</sup>). Por último, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min y se leyó la absorbancia a 700 nm. Como blanco de reacción se utilizaron 0,2 mL de agua destilada en lugar de extracto. El poder reductor se expresó como un aumento de absorbancia a 700 nm. Se utilizó una curva estándar con ácido ascórbico (0-0,05 g L<sup>-1</sup> en buffer fosfato). El PR de las películas se expresó como mg de ácido ascórbico g<sup>-1</sup> proteína. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### **III.3.3.6.3. Bloqueo de radicales del ácido linoleico**

La decoloración de β-caroteno, mediada por radicales del ácido linoleico se determinó según Cian y col., (2015). Para estimar la capacidad de inhibición del blanqueamiento del β caroteno (BBI), se utilizó una curva concentración-respuesta para dicha inhibición en función de la concentración (0–114 mg L<sup>-1</sup>) de soluciones estándar de butilhidroxitolueno (BHT) en agua destilada. La absorbancia se midió a 470 nm después de 120 min. El BBI de las películas se expresó como mg BHT g<sup>-1</sup> proteína. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### **III.3.3.6.4. Actividad antimicrobiana**

La actividad antimicrobiana de las proteínas de HM se llevó a cabo según Reyes de Fuentes y Fernández Da Silva, (2014). Se evaluó la susceptibilidad de las cepas de bacterias *Bacillus cereus* (Gram positiva) y *Salmonella newport* (Gram negativa). Las bacterias se inocularon hasta ajustar 1×10<sup>7</sup> CFU mL<sup>-1</sup> en caldo BHI (infusión cerebro corazón). Las suspensiones bacterianas sin agregado

de CP se utilizaron como control positivo, mientras que CP en BHI sin cepas bacterianas se utilizó como control negativo.

Las propiedades antifúngicas de las películas se evaluaron con el método de difusión en agar descrito por Rojas y col., (2005) determinando la susceptibilidad del hongo *Penicillium corylophyllum* a  $4 \times 10^7$  mL<sup>-1</sup> de propágulos fúngicos.

Las cepas de bacterias y hongos utilizadas procedieron del laboratorio de microbiología de la Fac. de Ing. Química (Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### **III.3.4. Análisis estadístico**

Las diferencias estadísticas se determinaron mediante análisis de varianza utilizando el Software Statgraphics Centurion XV versión 15.2.06 (Statgraphics, Warrenton, EE. UU.). Para esto, se utilizó el método de la diferencia mínima LSD de Fisher a un nivel de confianza del 95%.

## **III.4. Estudio de la interacción de las carrageninas con las proteínas de hez de malta en fase acuosa. Capacidad de formar Espumas**

### **III.4.1. Materiales**

Se utilizó el concentrado proteico de hez de malta (CP) obtenido en planta piloto. El ácido ascórbico usado fue calidad analítica (Cicarelli). Las carrageninas (CG) utilizadas fueron: iota (i-CG) (Satiagel KHG 30) y lambda (l-CG) (Satiagum BDC 20) provistas por Cargill<sup>™</sup> (Argentina).

### **III.4.2. Obtención de los sistemas**

Las soluciones stock de CG (i-CG, l-CG) se prepararon a 0,2 g 100 g<sup>-1</sup> en agua MilliQ y se agitaron durante 30 min a 70°C para facilitar la solubilización. Luego se enfriaron durante 2 h a temperatura ambiente y se almacenaron hasta el día siguiente a 4°C, para favorecer su completa hidratación. La solución stock de CP se preparó de manera de contener una concentración de proteínas de HM de 0,2 g 100 g<sup>-1</sup> en agua milli Q y se agitó por 1 h.

Para obtener los diferentes sistemas mixtos, se mezclaron las soluciones stock de CP y CG, en cantidades adecuadas para obtener concentraciones relativas de biopolímeros ( $R_{CP:CG}$ ) de 1:1, 2:1 y 4:1, manteniendo constante la concentración de proteínas en  $0,1 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ .

Para evaluar el efecto del pH en las interacciones entre CP y CG, los sistemas mixtos fueron ajustados en el rango de pH 2 a 6, utilizando HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

#### **III.4.3. Mediciones de turbidez**

La turbidez de los sistemas mixtos CP:CG se determinó mediante la densidad óptica (OD) como indicador de las interacciones del biopolímero según Fioramonti y col., (2014). Las soluciones madre se prepararon 24 h antes del ensayo para promover una hidratación adecuada y los sistemas mixtos se obtuvieron el día del ensayo antes de las mediciones. Los valores de pH se ajustaron con una solución de HCl de  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ . Se analizó el rango de pH comprendido entre 6,00 a 2,00 disminuyendo de a 0,5 unidades de pH. La absorbancia se midió a 400 nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible Milton Roy Genesys 5 (Ivyland, EE. UU.). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Posteriormente, los sistemas mixtos y las soluciones de CP se mantuvieron a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ) durante 24 h. Se registró su apariencia visual al inicio y a las 24 h con una cámara sensor Sony IMX586RS 48 mpx, Xiaomi redmi note 8.

#### **III.4.4. Espectroscopia de fluorescencia intrínseca**

Para las mediciones de fluorescencia intrínseca del triptófano (Trp) se utilizó un espectrofluorómetro F2000 (Hitachi, Japón), equipado de una cubeta de cuarzo de 1,0 cm de ancho. Se aplicó una longitud de onda de excitación de 295 nm (Pérez y col., 2014). Se obtuvieron los espectros de emisión en el rango de 300-450 nm para cada uno de los sistemas mixtos, a diferentes valores de pH. Se efectuaron las medidas al menos por triplicado.

#### **III.4.5. Hidrofobicidad superficial**

La determinación de hidrofobicidad superficial se realizó según lo descrito por Pérez y col., (2014) con algunas modificaciones. A una alícuota de los sistemas mixtos preparados con diferentes relaciones CP:CG, a diferentes pHs, se adicionaron 9  $\mu\text{l}$  de una solución 15  $\text{mmol L}^{-1}$  de la sonda ácido 1-anilino-8-naftalen sulfónico (ANS) y se dejó reposar por 15 min. Las mediciones se realizaron a 25°C, a una longitud de onda de excitación a 390 nm y se registraron los espectros de emisión de fluorescencia en el rango de 400 a 600 nm en un espectrofluorómetro F2000 (Hitachi, Japón). Se efectuaron las medidas al menos por triplicado.

#### **III.4.6. Tamaño de partícula y potencial $\zeta$**

Para estas determinaciones se utilizó el equipo Zetasizer Nano ZS90 Malven Instruments Ltd. (Reino Unido), de acuerdo con lo indicado en el punto III.2.6.2.

#### **III.4.7. Medición de las propiedades dinámicas de la superficie**

Para esta determinación se utilizó el tensiómetro Attension Theta, Biolin Scientific (Helsinki, Finlandia) que permite conocer la tensión interfasial ( $\text{mN m}^{-1}$ ) de una gota a un tiempo dado. La gota se forma axisimétrica en la punta de la aguja de una jeringa cuya verticalidad es controlada por una computadora. El perfil se digitalizó y se analizó mediante una cámara CCD acoplada a una placa digitalizadora de perfiles de vídeo. La imagen es visualizada continuamente. Los perfiles de gotas son procesados según la ecuación de Young-Laplace.

Las soluciones de CP y los sistemas mixtos se cargaron en una jeringa Hamilton de vidrio con una aguja de acero inoxidable y a continuación en una cubeta rectangular de vidrio (5 mL) cubierta por un compartimento. A continuación, se liberó una gota (10  $\mu\text{l}$ ) de la solución de proteína y/o sistema mixto y se dejó reposar en la punta de la aguja por 180 min. La imagen de la gota se tomó continuamente con una cámara CDD y se digitalizó. La experiencia se realizó a 25 °C.

El software (One Attention) del equipo calculó por medio del perfil de la gota, la tensión superficial dinámica ( $\sigma$ ) en función del tiempo.

La cinética de adsorción de las proteínas sobre la interfase aire-agua se determinó a través de los perfiles de presión superficial dinámica ( $\pi$ ) que fueron calculados como Ec.10:

$$\pi = \sigma^0 - \sigma \quad (\text{Ecuación 10})$$

Donde,  $\sigma^0$  es la tensión superficial del agua pura en ausencia de cualquier componente tensoactivo y  $\sigma$  correspondiente a la tensión superficial de las muestras de CP o de los sistemas mixtos.

La cinética de la adsorción de CP y de los sistemas mixtos se analizó en tres etapas que consideran una secuencia para la migración de las proteínas desde la fase acuosa hacia la interfase aire-agua y la adsorción de las proteínas. Para la primera etapa que es rápida, puede emplearse una forma modificada de la ecuación de Ward & Tordai, (1946) para correlacionar el cambio de la presión superficial ( $\pi$ ) en función del tiempo ( $t^{1/2}$ ) (Ec. 11):

$$\pi = \frac{2}{\sqrt{3.14}} c_o kT [D \cdot t]^{1/2} \quad (\text{Ecuación 11})$$

Donde,  $\pi$  es la presión superficial,  $C_o$  es la concentración de la proteína en la fase acuosa,  $k$  es la constante de Boltzman,  $T$  es la temperatura absoluta, y  $D$  es el coeficiente de difusión.

Por lo tanto, el coeficiente de difusión ( $k_D$ ) puede definirse de la siguiente manera (Ec.12):

$$k_D = \frac{2}{\sqrt{3.14}} c_o kTD^{1/2} \quad (\text{Ecuación 12})$$

La segunda etapa es la transición de las proteínas de la capa superficial a la interfase aire-agua. La velocidad de adsorción (velocidad a la que las moléculas de proteína penetran a través de la capa interfasial) disminuye debido a la barrera de energía que aparece después del paso de difusión (Felix y col., 2018).

La Ec. 13 es una ecuación empírica de primer orden que se utilizó para el análisis de las constantes de las velocidades de penetración ( $K_P$ ) y reordenamiento ( $K_R$ ) de la adsorción de las proteínas en la interfase.

$$\ln \left[ \frac{(\pi_{180} - \pi_t)}{(\pi_{180} - \pi_0)} \right] = -k_A \cdot t \quad (\text{Ecuación 13})$$

Donde,  $\pi_{180}$ ,  $\pi_t$ ,  $\pi_0$  son las presiones superficiales a los 180 del tiempo de adsorción, en cualquier momento (t), y el tiempo inicial (0), respectivamente. La primera constante ( $k_A$ ) puede estar asociada con la penetración y reordenamiento de las proteínas en la interfase.

#### **III.4.8. Reología superficial**

Se utilizó un el tensiómetro Attension Theta, Biolin Scientific (Helsinki, Finlandia). Se realizó sometiendo a la interfase a 5 ciclos periódicos de deformación (compresión y expansión) sinusoidal, al final del proceso de adsorción estudiado (180 min), al 10% de la amplitud de la deformación dentro del régimen lineal y a 0,1 Hz de la frecuencia de oscilación, obteniendo los módulos dilatacional, elástico y el viscoso.

También se obtuvo la tangente del ángulo de fase ( $\text{Tan } \delta$ ), que es una representación de la viscoelasticidad relativa de la capa interfasial absorbida.

#### **III.4.9. Propiedades de espumado por el método de burbujeo**

Las propiedades espumantes de CP y de los sistemas mixtos CP:CG se determinaron burbujeando  $\text{N}_2$  durante 10 s a un flujo constante ( $75 \text{ mL min}^{-1}$ ) a través de una superficie de vidrio poroso, en 20 mL de soluciones de proteínas de HM de  $1 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$  contenidas en una columna de vidrio (31 mm de diámetro y 210 mm de altura). La evolución de la espuma luego de finalizado el burbujeo se registró por 30 min. Los datos fueron recolectados y filmados utilizando una cámara de celular. A partir de los datos registrados se determinaron los distintos parámetros para caracterizar las propiedades de espumado de las muestras que se describen a continuación. Las mediciones se realizaron por triplicado a  $25 \pm 0,2$  °C.

#### **III.4.10. Capacidad de espumado**

La capacidad de formación de espuma se definió a través de la expansión (porcentaje del volumen de espuma respecto al volumen inicial).

La expansión (E) fue calculada por la Ec. 14:

$$E (\%) = [(V_e (\text{ml})/V_l (\text{ml})) * 100] \quad (\text{Ecuación 14})$$

Donde,  $V_e$ : Volumen de la espuma;  $V_l$ : volumen de solución a partir del cual se produjo la espuma.

#### III.4.11. Estabilidad de las espumas

La estabilidad de la espuma se estimó como el tiempo requerido para drenar la mitad del volumen de líquido de la espuma ( $t_{1/2}$ ) después de detener el flujo de  $N_2$ .

Para la cinética de drenado, se registró el volumen de líquido drenado en función del tiempo. Se aplicó la siguiente ecuación para modelar los datos: (Ec. 15):

$$y(x) = y_0 + Ae^{-\frac{x}{T}} \quad (\text{Ecuación 15})$$

Donde,  $y$ : es el volumen de líquido drenado de la espuma en mL,  $x$ : es el tiempo en segundos;  $A$  y  $T$ : son parámetros de la ecuación.

La primera derivada del volumen drenado con respecto al tiempo inicial, y por lo tanto la velocidad inicial de drenado de líquido, es:

$$\frac{dy}{dt} = -A \cdot k = V_{0dren} \quad (\text{Ecuación 15})$$

#### III.4.12. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas se determinaron mediante análisis de varianza utilizando el Software Statgraphics Centurion XV versión 15.2.06 (Statgraphics, Warrenton, EE. UU.). Para esto, se utilizó el método de la diferencia mínima LSD de Fisher a un nivel de confianza del 95%.

### **III.5. Evaluación de los concentrados proteicos de hez de malta como agente de encapsulación del hierro**

#### **III.5.1. Materias primas**

Se utilizó el concentrado proteico de hez de malta (CP) obtenido en planta piloto. La goma de garrofín Polygum 14/1–125 (GG) y la maltodextrina 15 DE Globe® 019150 (MD) se adquirieron en Polygum S.C.P. ® (Sabadell, Barcelona, España) y Todo droga (Córdoba, Córdoba, Argentina), respectivamente. El sulfato ferroso heptahidratado (215422), el ácido l-ascórbico (A7506) y las enzimas digestivas empleadas fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Otros reactivos de grado analítico fueron de Cicarelli Laboratorios (San Lorenzo, Santa Fe, Argentina).

#### **III.5.2. Obtención de las microcápsulas**

Para preparar las diferentes formulaciones de microcápsulas de hierro y ácido ascórbico se utilizaron CP, GG y MD como material de pared (MP).

Para estudiar el efecto de la formulación en las propiedades de las microcápsulas se utilizó un diseño experimental  $2^2$  con 3 réplicas en el punto central, que resultaron en 7 corridas experimentales. Las variables independientes fueron la concentración de proteínas en el material de pared (CP:MP), en el rango 8,6 a 17,2 g 100 g<sup>-1</sup> y la relación molar ácido ascórbico: hierro (AA:Fe) en el rango de 0,9:1 a 1,8:1 (Tabla III.2). Las variables dependientes fueron la eficiencia de encapsulación del hierro (Efe), la eficiencia de encapsulación del ácido ascórbico (EAA), el potencial zeta (Pot  $\zeta$ ), la capacidad quelante del hierro (QFe), la hidrofobicidad superficial (Ho), el tamaño de partícula (Tam), la densidad ( $\rho$ ) de las microcápsulas y la bioaccesibilidad del hierro (BFe).

En cada caso, se preparó una dispersión acuosa conteniendo hierro (0,45–1,7 g de hierro 100 g<sup>-1</sup>), ácido ascórbico de manera de tener relaciones molares de AA:Fe de 0,9:1 a 1,9:1, CP (1,8-3,6 g 100 g<sup>-1</sup>), GG (1,0-2,0 g de GG 100 g<sup>-1</sup>) y se completó a 13 g 100 g<sup>-1</sup> de sólidos totales con MD. Las dispersiones se agitaron durante 30 min a temperatura ambiente y se secaron utilizando un Mini Secador por Pulverización Büchi B-290 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza)

equipado con una boquilla atomizadora de 700  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las dispersiones se introdujeron en la cámara principal a través de una bomba peristáltica y el caudal de alimentación se controló mediante la velocidad de rotación de la bomba (3,1 mL  $\text{min}^{-1}$ ). La temperatura de entrada fue de 120°C y de salida 47-48°C.

Los encapsulados obtenidos se colocaron en frascos herméticos de color caramelo y se mantuvieron a -20°C, hasta el momento del análisis.

**Tabla III.2.** Formulaciones del diseño experimental.

<b>Factores</b>	<b>CP:MP</b>	<b>AA:Fe</b>
-1	8,6	1,8
1	8,6	0,9
0/0	12,9	1,35
0/0	12,9	1,35
0/0	12,9	1,35
1/1*	17,2	1,8
1/-1	17,2	0,9

### **III.5.3. Evaluación del proceso de encapsulación y de las propiedades de las microcápsulas**

#### **III.5.3.1. Determinación de la composición de las microcápsulas**

##### **III.5.3.1.1. Contenido de proteínas y humedad**

Se determinaron de acuerdo con las metodologías de la A.O.A.C. (2000).

##### **III.5.3.1.2. Contenido de hierro**

Para la determinación del contenido de hierro se realizó una digestión por vía húmeda utilizando cápsulas Parr. Para ello, a 0,3 - 0,1 g de muestra se agregaron 4 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado y 2 mL de HCl 12 mol L<sup>-1</sup> y se digirió en microondas Milestone START D digester (Shelton, Connecticut, USA). Luego, las muestras fueron transferidas y enrasadas a 25 mL. El contenido de Fe se midió por espectrofotometría de absorción atómica, utilizando un equipo Perkin Elmer de 300, Instrumentation Laboratory (Norwalk, Connecticut, EE. UU.).

### **III.5.3.1.3. Contenido de ácido ascórbico (AA)**

Para la evaluación del contenido de AA, se siguió la técnica de Behrens y Madère (1987) modificada por Van de Velde y col., (2012). La determinación cromatográfica se realizó con un equipo Shimadzu, equipado con una bomba LC-20AT de la serie Shimadzu, con detector de arreglo de diodos Shimadzu SPDM20A, con una columna de fase reversa de 250 x 4,6 mm (Novapack C18, 5 µm; Gemini 110A C-18 Phenomenex). Los datos fueron procesados usando el software Shimadzu LC solution® (Shimadzu Co., Kyoto, Japón). La calibración se realizó con un estándar de AA entre 4 - 20 µg mL<sup>-1</sup>

El contenido de ácido ascórbico se expresó como g 100 g<sup>-1</sup> de sólidos. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### **III.5.3.2. Determinación de la eficiencia de encapsulación**

El rendimiento del proceso de encapsulación fue calculado teniendo en cuenta el contenido de sólidos en los polvos obtenidos inmediatamente después del secado, respecto del contenido de sólidos de las dispersiones iniciales.

Además, se calculó la eficiencia de encapsulación de hierro, proteínas y ácido ascórbico como la relación entre el contenido de hierro, proteínas y ácido ascórbico de las microcápsulas (g) y el contenido de hierro, proteínas y ácido ascórbico de las dispersiones de alimentación (g), respectivamente (Ruiz y col., 2013).

### **III.5.3.3. Caracterización de las microcápsulas**

#### **III.5.3.3.1. Morfología y tamaño**

La morfología y el tamaño de las microcápsulas se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Debido a que se trata de muestras no conductoras, éstas fueron recubiertas mediante una fina capa de oro de entre 5-7 nm en condiciones de vacío. Para ello, los polvos se montaron en trozos de aluminio utilizando una cinta de doble cara y

se recubrieron con una fina capa de oro, utilizando un sistema de pulverización catódica (SCD 005, BAL-TEC, Suiza).

Las imágenes SEM se adquirieron con un microscopio electrónico de barrido (SEM 505, Philips, Países Bajos) bajo alto vacío con un voltaje de aceleración de 20 kV. Las muestras se observaron con un aumento de 500 - 4000x.

Para determinar el tamaño de las microcápsulas se usó el software ImageJ (ImageJ, National Institutes of Health, EE. UU.).

La SEM de las microcápsulas obtenidas para cada fórmula se realizó por duplicado.

#### **III.5.3.3.2. Potencial $\zeta$**

Para esta determinación se utilizó el equipo Zetasizer Nano ZS90 Malven Instruments Ltd. (Reino Unido), equipado con un láser de He-Ne 4mW de longitud de onda de salida de 632,8 nm y un ángulo detector de 173°.

Las microcápsulas se dispersaron a 0,1 g 100 mL<sup>-1</sup> en agua destilada se agitaron y se equilibraron durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió 1 mL de cada muestra a la cámara de medición. El potencial  $\zeta$  se calculó sobre la base de la técnica de movilidad electroforética, utilizando el modelo de Helmholtz-Smoluchowski. Las mediciones se realizaron por triplicado a 25 ± 0,2 °C.

#### **III.5.3.3.3. Hidrofobicidad superficial de microcápsulas**

La hidrofobicidad superficial de las microcápsulas se determinó de acuerdo con Molina-Ortiz y col., (2009).

Las microcápsulas se dispersaron a 0,05 g de proteína 100 g<sup>-1</sup> en buffer fosfato de potasio 10 mmol L<sup>-1</sup> - pH 7,0. Se hicieron 5 diluciones en serie de la muestra de 0,05 a 0,005 g 100 g<sup>-1</sup> de proteína. Luego, a 2 mL de cada muestra se añadieron 10 µL de una solución de 8-anilina-1-naftalensulfonato (ANS) 8 mmol L<sup>-1</sup> de. La fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación de 390 nm y una longitud de onda de emisión de 468 nm usando un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi 2000 (Hitachi Ltd., Tokio, Japón).

La hidrofobicidad se calculó de acuerdo con Cian y col., (2020). Las medidas fueron llevadas a cabo por triplicado a temperatura ambiente.

#### III.5.3.3.4. Determinación del hierro quelado

Para estimar el hierro quelado (QFe), las microcápsulas se dispersaron en agua bidestilada a 8 mg de hierro L<sup>-1</sup> (contenido total de hierro).

Luego, se determinó el contenido de hierro libre de dispersión. Para esto, se mezclaron 40 µL de muestra con 200 µL de buffer de acetato 150 mmol L<sup>-1</sup> - pH 4.5 y 0,03 mmol L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico. Se agregaron 40 µL de una solución de ferrozina de 200 µmol L<sup>-1</sup>. La absorbancia a 560 nm se midió a los 5 min después de la adición de ferrozina. Además, se realizó un control negativo con 40 µl de agua bidestilada, 200 µl de buffer de acetato y 40 µl de ferrozina. Se utilizó una curva de calibración de hierro (0-10 mg L<sup>-1</sup>).

El porcentaje de hierro quelado (QFe) se calculó de la siguiente manera (Ec. 16):

$$QFe = \left[ \frac{\text{Contenido total de Hierro} - \text{contenido de hierro libre}}{\text{contenido total de hierro}} \right] \times 100 \quad (\text{Ecuación 16})$$

Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado

Además, se determinó la capacidad quelante de los diferentes materiales de pared de acuerdo con Cian y col., (2016).

Se tomaron 50 µL de dispersiones (1,0 g L<sup>-1</sup>) de los diferentes materiales (CP, GG o MD) y se mezclaron con 50 µL de una solución de hierro 8 mg L<sup>-1</sup>. Se incubó 30 min a temperatura ambiente. La mezcla de ensayo se ajustó a 300 µL con buffer acetato 150 mmol L<sup>-1</sup> - pH 4.5 con 0,03 mmol L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico. Luego, se agregaron 50 µL de una solución de ferrozina 200 µmol L<sup>-1</sup>. La absorbancia a 560 nm se midió después de 5 min de la adición de ferrozina. Se realizó un control con 50 µL de una solución de hierro 8 mg L<sup>-1</sup>, 250 µL de buffer de acetato y 50 µL de ferrozina.

Las determinaciones se realizaron por triplicado y la actividad quelante del hierro (QFe) se calculó como (Ec. 17):

$$QFe (\%) = [(Abs_{\text{Control}} - Abs_{\text{muestra}}) / Abs_{\text{Control}}] \times 100 \quad (\text{Ecuación 17})$$

Posteriormente se determinó la concentración que causa una actividad quelante de hierro del 50% ( $IC_{50}$ ). Para ello, se realizaron diluciones seriadas de las muestras (CP, GG o MD) de 0 a 50 mg mL<sup>-1</sup> y se procedió como se indicó anteriormente.

Los datos experimentales se ajustaron utilizando el software Origin versión 7.5 128 (OriginLab, Northampton, Masschusettes, EE. UU.), con la siguiente ecuación Ec. 18:

$$Y = y_0 + Ae^{R_0 \cdot x} \quad (\text{Ecuación 18})$$

Donde  $y$  es el rango de inhibición,  $a$ ,  $R_0$  y  $x$  son parámetros de regresión y  $x$  es la concentración (mg mL<sup>-1</sup>) de CP y GG o MD.

Los valores de  $IC_{50}$  (Ec. 19) fueron obtenidos como:  $y=50\%$ , se obtuvo el valor  $IC_{50}$  de CP, GG o MD (ecuación 18).

$$IC_{50} = (a - 50\%) / b \quad (\text{Ecuación 19})$$

Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

#### **III.5.3.3.5. Densidad**

La densidad se determinó pesando la cantidad de muestra ( $m$ ) contenida en un volumen ( $v$ ) de 10 mL. La densidad fue calculada con la ecuación Ec. 20:

$$P = \left( \frac{m}{v} \right) \quad (\text{Ecuación 20})$$

#### **III.5.3.3.6. Color (CIE-Lab)**

La determinación del color se realizó como se indicó en el inciso III.3.3.2.1.

#### **III.5.3.3.7. Isotermas de sorción**

Las isotermas de sorción se determinaron mediante el método gravimétrico. Se colocó una alícuota de las microcápsulas en estufa de vacío hasta alcanza un mínimo de humedad (3 días a 65°C, 1 bar). Luego, diferentes alícuotas se colocaron en cámaras herméticamente cerradas (25°C) con soluciones salinas saturadas (KOH, MgCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaCl, KCl, CuSO<sub>4</sub>) de  $a_w$  conocida (0,070, 0,328, 0,432, 0,753, 0,853, 0,972, respectivamente) (Greenspan, 1977; Alvarado, 2012).

Se realizó un control de peso hasta un valor constante. El contenido de humedad de equilibrio se determinó en estufa a 105°C ±1 °C durante 24 h.

Los datos experimentales de las isotermas se ajustaron mediante los modelos linealizados de Guggenheim-Andersen-de Boer (GAB) (Guggenheim, 1996. Anderson, 1946 y 1948, de Boer, 1953) (Ec.21) y también se utilizó la ecuación modificada de Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Brunauer y col., 1938) (Ec.22):

$$w_e = \frac{w_o k^* c^* a_w}{(1-k^* a_w) \times (1-k^* a_w + c^* k^* a_w)} \quad (\text{Ecuación 21})$$

Donde,  $w_e$ : humedad en el equilibrio [g 100 g<sup>-1</sup> sólidos];  $a_w$ : actividad de agua,  $w_o$ : humedad de mono capa [g 100 g<sup>-1</sup> sólidos],  $c^*$ : es el coeficiente de Guggenheim varía entre 1 a 20 y  $k^*$ : es un factor de corrección para el calor de sorción del agua en multicapas en relación con la masa líquida, varía de 0.7 a 1.

$$w_e = \frac{w_o c a_w}{(1-a_w) ((1-c) \ln(1-a_w))} \quad (\text{Ecuación 22})$$

Donde,  $w_e$ : humedad en el equilibrio [g 100 g<sup>-1</sup> sólidos o materia seca];  $a_w$ : actividad de agua,  $w_o$ : humedad de monocapa [g 100 g<sup>-1</sup> sólidos],  $c$ : constante relacionada con el calor desprendido en el proceso de sorción.

### III.5.3.3.8. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de las microcápsulas de hierro se realizaron con un espectrofotómetro FTIR (modelo Shimadzu Ir Prestige-21, Japón). Para ello se mezcló bromuro de potasio (KBr) con las microcápsulas (en una proporción de 1:100), para formar una pastilla, la cual se colocó en el espectrofotómetro. El espectro se registró con un rango de número de onda de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>, resolución de 4 cm<sup>-1</sup>. La adquisición de los datos se llevó con el programa Origin

versión 3, OriginPro 2015 (64-Bit) b9.2.214. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### **III.5.3.4. Evaluación del pH gastrointestinal en la liberación de hierro microencapsulado y proteínas**

Se evaluó el efecto del pH gastrointestinal en la liberación del hierro microencapsulado y proteínas, de acuerdo con Ruiz-Ruiz y col. (2013). Se preparó una dispersión 5% (p/v) de microcápsulas en agua destilada. Las muestras fueron dispersadas en 25 mL de agua y se ajustó a pH 2,0 con 2 mol de L<sup>-1</sup> HCl. Las dispersiones se incubaron a 37°C durante 2 h en un baño de agua con agitación. Luego, se tomó 1 mL y se centrifugó a 10000 g durante 15 min. Después de la fase gástrica, el pH se incrementó gradualmente a 6,5 con 1 mol L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub> durante 10 min. Luego la dispersión se incubó durante 2 h a 37°C. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 3500 × g durante 30 min a temperatura ambiente. El contenido de proteínas y grupos amino libres se midió de acuerdo con Lowry y col., (1951); Nielsen y col., (2001) métodos respectivamente, para pH 2 y pH 6.5. Se obtuvieron los miliequivalentes y se calcularon como: contenido del grupo amino (mEq L-Serina g<sup>-1</sup>) × de sobrenadante (g). El contenido de hierro se determinó por espectroscopia de absorción atómica.

#### **III.5.3.5. Determinación de la bioaccesibilidad de Fe**

La determinación de la bioaccesibilidad de hierro (BFe) se realizó de acuerdo con el método de Miller y col., (1981) modificado por Drago y col., (2005). El método mide la dializabilidad del mineral en condiciones de pH controladas después de una digestión *in vitro* que simula las condiciones gástricas e intestinales. Para esto, se preparó una dispersión de las microcápsulas de 10 g de sólidos 100 g<sup>-1</sup> dispersión, utilizando agua desionizada. Alícuotas de 25 g se ajustaron a pH 2 con HCl 4 mol L<sup>-1</sup>, se agregaron 0,8 mL de una solución de pepsina (16 g 100 mL<sup>-1</sup> en HCl 0,1mol L<sup>-1</sup>) y se incubaron durante 2 h a 37° en baño termostatzado con agitación. Luego, se colocaron bolsas de diálisis (6 -8 kDa, Spectrapore) que contenían 20 mL de una solución de buffer PIPES de 0,15

mol L<sup>-1</sup> y se incubaron durante 50 min en baño con agitación a 37 °C. Posteriormente, se añadieron en cada matriz 6,25 mL de una solución de bilis-pancreatina (2,5 g 100 mL<sup>-1</sup> y 0,4 g 100 mL<sup>-1</sup> , respectivamente en NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol mL<sup>-1</sup>) y la incubación continuó durante 2 h. Finalmente el contenido de la bolsa se pesó y analizó respecto al contenido de hierro, mediante espectrofotometría de absorción atómica utilizando un equipo Perkin Elmer-300 (PerkiElmer®, Norwalk, Connecticut, EE.UU.).

La bioaccesibilidad de hierro (% BFe) se calculó a partir de la cantidad de dicho mineral dializado, expresado como porcentaje de la cantidad total presente en la muestra (Ec. 23):

$$\% \text{ BFe} = \left( \frac{\text{mg DFe}}{\text{mg MFe}} \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 23})$$

Donde: mg DFe es la cantidad de Fe dializado y mg MFe es la cantidad de hierro en las microcápsulas.

Las mediciones se realizaron por triplicado.

### **III.5.3.6. Optimización del modelo de validación**

La función de deseabilidad de Derringer se utilizó para la optimización de respuestas múltiple, según Derringer y Suich, (1980). El método implica la transformación de cada respuesta predicha a una función de deseabilidad parcial adimensional (di). La función de deseabilidad global (D) se define como la media geométrica de los diferentes valores di. Un valor de D diferente de cero implica que todas las respuestas están en un rango deseable simultáneamente y, en consecuencia, para un valor de D cercano a 1, la combinación de los criterios es globalmente óptima. En este trabajo, EFe, BFe, EAA y QFe fueron maximizados.

Para la validación del modelo, las microcápsulas se obtuvieron por triplicado de la misma manera que se describió previamente, usando las relaciones CP:MP y AA:Fe dadas por el procedimiento de optimización.

Los datos experimentales (EFe, BFe, EAA y QFe) se compararon con los valores de estas respuestas predichas por los modelos, utilizando un análisis de prueba t.

#### **III.5.4. Análisis estadístico**

Para realizar el ANOVA, ajustar las ecuaciones polinómicas de los datos experimentales y para obtener los coeficientes de dichas ecuaciones se utilizó el programa STATGRAPHICS Centurion XV 15.2.06 (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginia, USA). Para la verificación de la adecuación del modelo, se calculó la falta de ajuste y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ). Este software también se utilizó para el procedimiento de optimización numérico a través de la función de deseabilidad de Derringer. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante el método de la diferencia mínima LSD de Fisher a un nivel de confianza del 95%.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**IV.1.CAPÍTULO  
OBTENCIÓN Y  
CARACTERIZACIÓN DE  
CONCENTRADOS PROTEICOS DE  
HEZ DE MALTA**

## CAPÍTULO IV.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CONCENTRADOS PROTEICOS DE LA HEZ DE MALTA

### IV.1.1. Composición de Hez de Malta

En la Tabla IV.1 se muestra la composición centesimal de las dos partidas de HM utilizadas. La humedad fue de  $81,08 \pm 0,45$  g  $100$  g<sup>-1</sup> para HM<sub>1</sub> y  $81,47 \pm 0,76$  g  $100$  g<sup>-1</sup> para HM<sub>2</sub>.

**Tabla IV.1.** Composición de la hez de malta (HM)

	HM <sub>1</sub> (g 100 g <sup>-1</sup> bs)*	HM <sub>2</sub> (g 100 g <sup>-1</sup> bs)*
Proteínas	24,64 ± 0,82	26,52 ± 0,37
Cenizas	4,20 ± 0,01	3,82 ± 0,14
Lípidos (extracto etéreo)	8,57 ± 0,02	9,11 ± 0,07
Fibra dietaria total	60,77 ± 2,39	60,38 ± 0,82

b.s.: base seca; \*media ± DS

La HM consiste principalmente de fibra, proteínas y menor cantidad de lípidos y cenizas. Los valores de proteínas y lípidos fueron ligeramente más altos para la HM<sub>2</sub>. Los valores obtenidos están de acuerdo con los resultados que se han reportado para HM (Celus y col., 2007; Connolly y col., 2013; Forssell y col., 2008).

La composición de la HM puede variar de acuerdo con la variedad de cebada, tiempo de cosecha, calidad del grano, condiciones de malteado, maceración y tipo de adjuntos agregados en el proceso de elaboración; pero, en general, es considerada como un material ligno-celulósico, rico en proteínas y fibra, que representan alrededor del 20-30 y 70% de la composición, respectivamente.

Con relación a la fibra, la HM contiene hemicelulosa (compuestos principalmente por arabinoxilanos), celulosa y lignina. Los arabinoxilanos son el principal componente de la hemicelulosa (Lynch y col., 2016).

Respecto a las proteínas, el malteado causa cambios en las proteínas de la cebada, ya que son parcialmente degradadas en aminoácidos y péptidos solubles por acción de las peptidasas endógenas, y son solubilizadas y extraídas durante el macerado y la obtención del mosto dulce (Benkovská y col., 2011). Entonces, las proteínas que permanecen en la HM son aquellas que no han sido extraídas en agua durante la obtención del mosto para la elaboración de la cerveza. El nivel de proteínas relativamente alto en la HM se debe a la solubilización extensiva de los carbohidratos del endospermo que tiene lugar durante el macerado (Rommi y col., 2018).

En cuanto a los lípidos en la HM, los valores estuvieron comprendidos entre 8 y 9 % del material seco. Valores similares han sido reportados por otros investigadores (del Río y col., 2013; Farcas y col., 2015; Niemi y col., 2012). El contenido de lípidos puede variar dependiendo del proceso de maceración en la obtención de la cerveza y del método aplicado para secar la HM (Niemi y col., 2013; Skendi y col., 2018). Aunque se han identificado 26 ácidos grasos diferentes, los más abundantes en la HM son los ácidos linoleico, palmítico y oleico (del Río y col., 2013; Farcas y col., 2015; Niemi y col., 2012). Además, la fracción lipídica de la HM contiene cantidades menores de monoglicéridos (1,6%), diglicéridos (7,7%) y compuestos esteroideos (5%) (del Río y col., 2013).

Por otra parte, se detectaron ácidos grasos libres en ambas partidas de HM, obteniéndose valores de  $3,87 \pm 0,13$  y de  $5,4 \pm 0,22$  mmol  $100 \text{ g}^{-1}$  b.s. para la HM<sub>1</sub> y la HM<sub>2</sub>, respectivamente.

#### **IV.1.1.1. Perfil de aminoácidos**

Los resultados del perfil de aminoácidos determinados sobre una muestra de hez de malta se muestran en la Tabla IV.2.

En general no se observaron diferencias importantes en la composición de aminoácidos, si bien la HM<sub>1</sub> y HM<sub>2</sub> fueron obtenidas de diferentes partidas de producción de cerveza y estaciones del año.

Los aminoácidos más abundantes fueron los ácidos aspárticos + glutámico, la leucina y la fenilalanina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Yu

y col., (2020). El alto contenido de ácido glutámico se debe a las hordeínas de la cebada (Ikram y col., 2017).

**Tabla IV.2.** Perfil de aminoácidos de la hez de malta

<b>Aminoácido*</b>	<b>HM<sub>1</sub></b> (g100 g <sup>-1</sup> proteína)	<b>HM<sub>2</sub></b> (g100 g <sup>-1</sup> proteína)
<b>Asp+Glu</b>	15,2±0,6	17,2±2,1
<b>Serina</b>	5,2±0,2	6,3±0,3
<b>Histidina</b>	2,3±0,0	2,8±0,2
<b>Glicina</b>	5,8±0,3	5,7±0,4
<b>Treonina</b>	5,3±0,2	5,0±0,0
<b>Arginina</b>	7,4±0,3	7,8±0,4
<b>Alanina</b>	7,0±0,4	6,4±0,1
<b>Prolina</b>	2,9±0,3	3,4±1,4
<b>Tirosina</b>	3,9±0,0	5,6±0,1
<b>Valina</b>	5,9±0,0	6,4±0,2
<b>Metionina</b>	2,0±0,1	0,8±0,1
<b>Cisteína</b>	1,3±0,0	1,2±0,0
<b>Isoleucina</b>	5,6±0,1	5,1±0,2
<b>Leucina</b>	10,7±0,0	11,3±0,5
<b>Fenilalanina</b>	9,2±0,5	9,7±1,6
<b>Lisina</b>	5,6±0,2	5,3±0,2
<b>Triptófano</b>	n.d.	0,56±0,0

\*media ± DS; n.d.: no determinado

Por otra parte, si bien el contenido de lisina es bajo en proteínas de cereales, su contenido en las proteínas de HM junto con el de leucina, valina, fenilalanina, tirosina, iso-leucina y treonina fue superior a los de maíz, trigo y arroz (Qin y col., 2018).

#### **IV.1.2. Estudio del proceso de obtención de concentrados proteicos de hez de malta.**

Las diferentes experiencias realizadas para definir las condiciones de extracción de proteínas de HM se basaron en información disponible en la bibliografía (Celus y col., 2006; Connolly y col., 2013; Mussatto y Fernandes, 2007; Niemi y col., 2013; Vieira y col, 2014; Vieira y col., 2016).

#### IV.1.2.1. Efecto del pH de extracción

En la Figura IV.1 se observa el efecto del pH sobre la solubilidad de las proteínas de HM. Los resultados muestran que la solubilidad fue mínima a pH 3 y que ésta aumentó al aumentar el pH. Por este motivo se seleccionó pH 10 para la extracción.

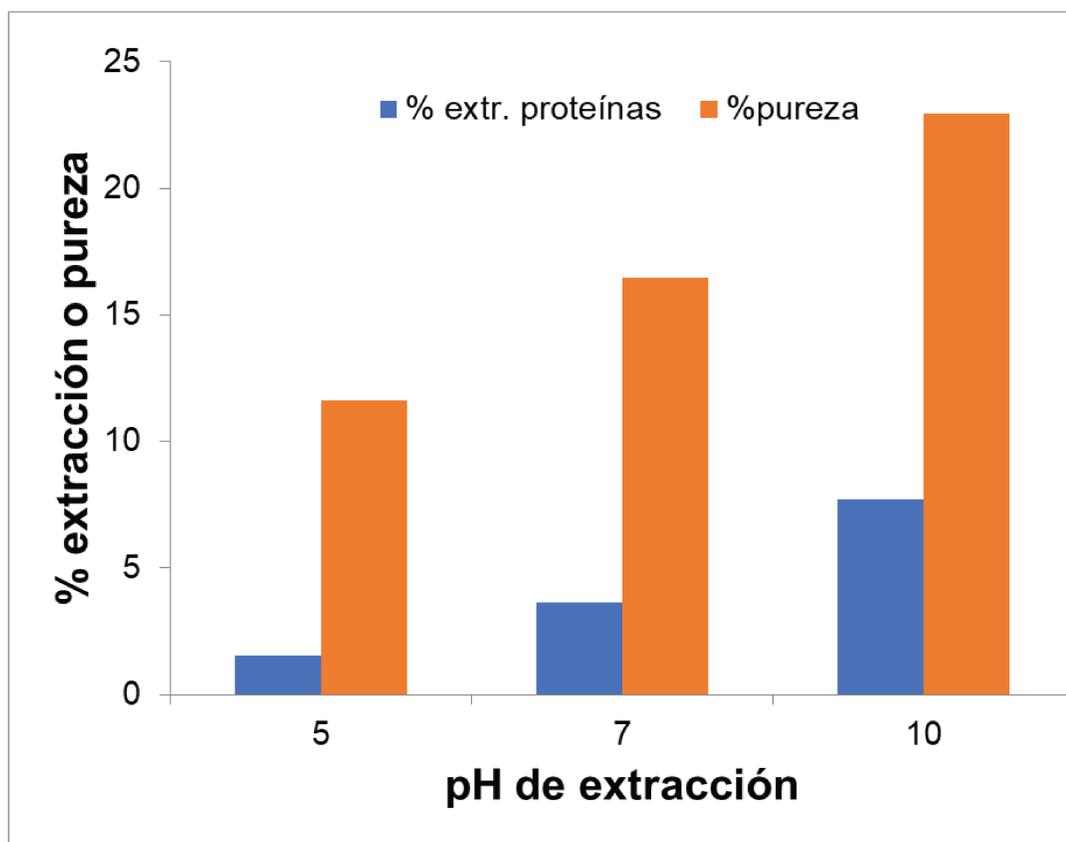


Figura IV.1. Solubilidad de proteínas de HM en función del pH.

La solubilidad de una proteína es la manifestación termodinámica del equilibrio entre las interacciones proteína-proteína y solvente-proteína y está muy influenciada por el pH del medio acuoso (Pilosof, 2000).

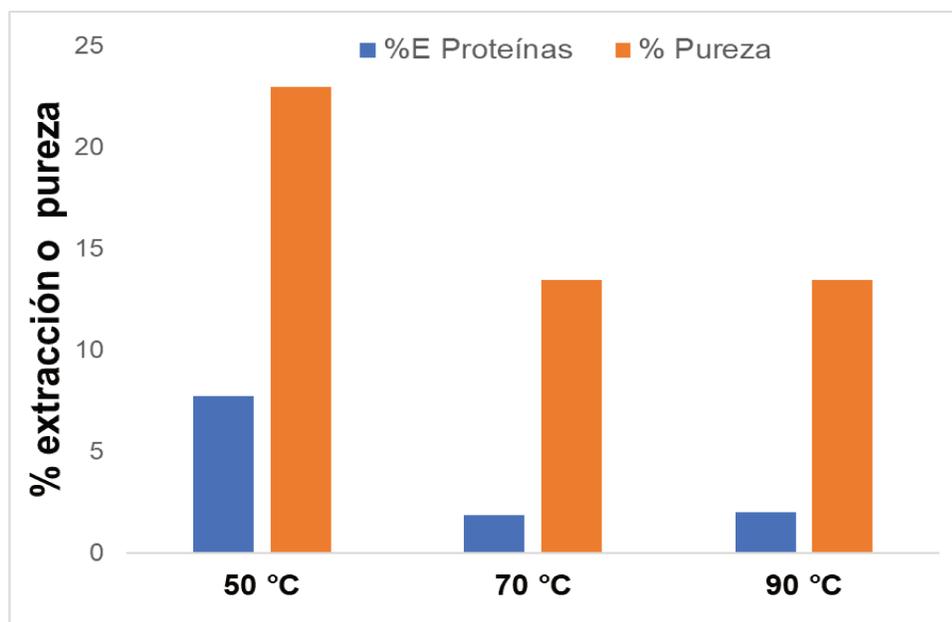
Cuanto más lejos del pI esté el pH, mejor será la solubilidad, debido a la creciente cantidad de cargas. Se ha demostrado que la solubilidad en agua de las proteínas de cebada es más baja en el entorno de pH 4, lo que sugiere que el pI de las proteínas está en ese rango y la solubilidad es más alta a pH 10-11. Sin embargo, la maceración en el proceso de elaboración de la cerveza puede inducir algunos cambios en las proteínas (Niemi y col., 2013).

El incremento de la carga superficial de las moléculas de proteína conduce a una solubilidad mejorada en el sistema acuoso (Wang y col., 2010). Conjuntamente, un pH alto también puede debilitar la matriz de la pared celular ayudando a liberar a las proteínas.

Diversos autores evaluaron diferentes tratamientos para la extracción de proteínas de hez de malta. Los resultados mostraron que la mayor extracción de proteínas (95%) a bajo costo, se obtuvo con pre-tratamientos alcalinos (Celus y col., 2007; Connolly y col., 2013; Niemi y col., 2013; Qin y col., 2018). A un pH alcalino, las proteínas adquieren una carga neta negativa, lo que aumenta las fuerzas repulsivas dentro y entre las moléculas. Esto facilita la interacción de las moléculas con el agua, por lo que la proteína se solubiliza (Jaeger y col., 2021).

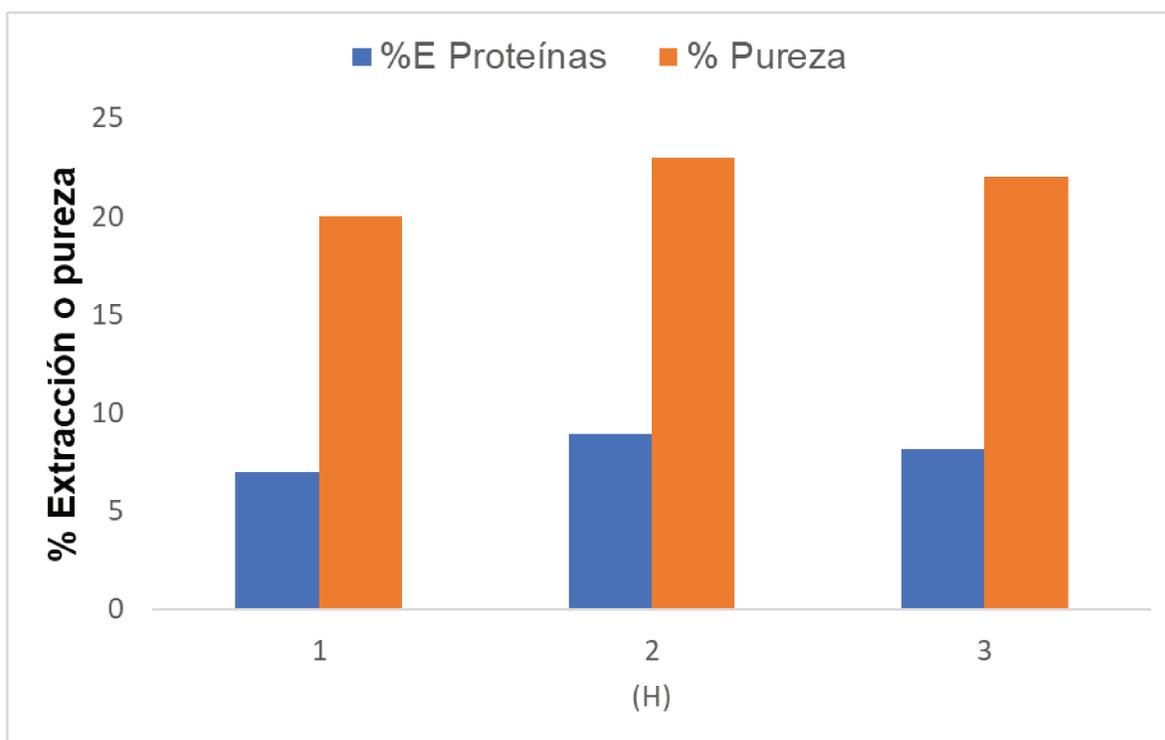
#### IV.1.2.2. Efecto de la temperatura y del tiempo de extracción

En la Figura IV.2 se muestra el efecto de la temperatura en la extracción de sólidos y proteínas a pH 10. Los mayores valores tanto de proteínas como de sólidos se obtuvieron a 50 °C. Similares resultados fueron obtenidos por Niemi y col., (2013) en la solubilización de las proteínas de HM.



**Figura IV.2.** Efecto de la temperatura sobre la extracción de proteínas y sólidos solubles de HM.

En la Figura IV.3 se muestra el efecto del tiempo en la extracción de proteínas y sólidos solubles realizada a pH 10 y 50°C. La solubilización de las proteínas alcanzó un máximo a los 120 min, por lo que seleccionó este tiempo de tratamiento.



**Figura IV.3.** Efecto del tiempo sobre la extracción de proteínas y sólidos solubles.

#### **IV.1.2.3. Estudio de pre-tratamientos facilitadores de la extracción**

Los resultados de los pretratamientos sobre la extracción alcalina de las proteínas de HM se muestran en la Tabla IV.3.

El 90% de las proteínas que permanecen en la hez de malta son hordeínas y glutelinas insolubles en agua. Las hordeínas son las principales proteínas de almacenamiento en la cebada y las glutelinas actúan como componentes estructurales de las células. El procesamiento provoca la formación de puentes disulfuro en las hordeínas, por lo que la extracción proteica se ve facilitada por el uso de un agente reductor (Niemi y col., 2013). Por este motivo, se investigó la utilización de sulfito de sodio.

**Tabla IV.3.** Porcentajes de extracción de sólidos y proteínas y pureza del extracto a pH 10 a partir de la HM con diferentes pre-tratamientos.

Pre -Tratamiento	Enzima	Extracción de sólidos (%) <sup>*</sup>	Extracción de Proteínas (%) <sup>*</sup>	Pureza (%) <sup>**</sup>
<b>Sin pretratamiento</b>		7,6	7,5	22,97
-	E	6,9	6,8	23,4
<b>Sulfito + AL (12 h - 50°C)</b>	-	9,1	9,8	25,0
<b>Sulfito + AL (12 h - 50°C)</b>	E	15,4	32,2	51,0
<b>Sulfito + AL (12 h - 25°C)</b>	E	15,7	31,8	51,0

AL: ácido láctico; <sup>\*</sup>CV < 10%; <sup>\*\*</sup>CV < 5%

El agregado de sulfito y ácido láctico en el agua de remojo incrementó la extracción de sólidos, proteínas y la pureza proteica del extracto. El sulfito de sodio disminuye la cristalinidad de los xilanos y la celulosa y aumenta la hidrofiliidad de la lignina, a través de la sulfonación (Idrees y col., 2013). Por otro lado, el ácido láctico en el agua de remojo favorece la ruptura de las paredes celulares (Haros & Suarez, 2001).

El uso de enzimas (carbohidrasas y proteasas) no resultó en una mayor extracción de sólidos solubles y proteínas o una mayor pureza respecto a la extracción sin tratamiento. Pero el uso combinado del pretratamiento de sulfito/AL y enzimas mejoró la extracción de sólidos y proteínas, y la pureza en proteínas del extracto. Por otra parte, el empleo de una menor temperatura durante el pre-

tratamiento de sulfito/AL no modificó la posterior extracción de proteínas, por lo que se seleccionó trabajar a temperatura ambiente.

Estos ensayos permitieron definir las condiciones de obtención de concentrados de proteínas de HM.

#### **IV.1.3. Proceso de obtención de concentrado proteico (CP)**

Una vez definidas las condiciones a escala de laboratorio se realizó el proceso de obtención del CP a escala piloto. En la Tabla IV.4 se muestran los contenidos de sólidos y proteínas de las muestras en diferentes etapas del proceso.

**Tabla IV.4.** Contenido de sólidos y de proteínas en diferentes etapas del proceso de obtención del concentrado proteico de hez de malta.

	<b>Sólidos</b> (g 100 g <sup>-1</sup> muestra b.s)	<b>Proteínas</b> (g 100 g <sup>-1</sup> muestra b.s)
<b>Hez de malta</b>	18,53	26,52
<b>Hez de malta con pre-tratamiento</b>	24,01	25,86
<b>Sobrenadante de extracción alcalina</b>	2,41	61,52
<b>Concentrado Proteico (CP)</b>	94,85	57,7

El porcentaje de extracción de proteínas fue del 42% y de sólidos del 14,9%. La pureza del CP fue del 57%. Otros investigadores han reportado la obtención de concentrados proteicos de HM con rendimientos diversos. Al respecto, Arauzo y col., (2019) reportaron un porcentaje de extracción de proteínas del 23% en medio alcalino. Rommi y col., (2018) informaron un porcentaje de extracción de proteínas del 42% tras un tratamiento alcalino y con proteasas. Connolly y col., (2019) reportaron un porcentaje de extracción alcalina de la HM seguida de la precipitación isoelectrica del 46% de la proteína.

#### **IV.1.4. Caracterización del concentrado proteico de hez de malta**

##### **IV.1.4.1. Color**

En la Figura IV.4 se muestra una fotografía de la HM y del CP y en la Tabla IV.5 los parámetros de color.



**Figura IV.4** Fotografía de la hez de malta seca (izquierda) y del concentrado proteico de hez de malta (derecha).

**Tabla IV.5** Resultados de color de la hez de malta (HM) y del concentrado proteico de hez de malta (CP)

	<b>HM</b>		<b>CP</b>	
	<i>media</i>	<i>DS</i>	<i>media</i>	<i>DS</i>
L*	41,17 <sup>a</sup>	0,39	51,85 <sup>b</sup>	0,05
a*	4,78 <sup>a</sup>	0,38	8,23 <sup>b</sup>	0,13
b*	14,54 <sup>a</sup>	0,65	17,77 <sup>b</sup>	0,22

X ± DE. Distintas letras en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

Se puede observar que el CP presentó cierta coloración mayormente debida al material del que proviene (HM) aunque más luminoso y rojizo.

#### **IV.1.4.2. Composición centesimal**

Los resultados de composición centesimal del CP se muestran en la Tabla IV.6.

Al respecto, Vieira y col., (2016) utilizaron extracción alcalina de HM y obtuvieron 49,13 g 100 g<sup>-1</sup> de proteínas. Asimismo, Niemi y col., (2013), informaron la obtención de un concentrado con 53 g 100 g<sup>-1</sup> de proteínas obtenidos en condiciones alcalinas. He y col., (2019) realizaron un tratamiento químico y enzimático a la HM, utilizando hidróxido de sodio, NaHSO<sub>3</sub> y enzimas alcalasas y

obtuvieron un concentrado proteico con 44 g 100 g<sup>-1</sup> de proteínas. Sin embargo, reportaron que el tratamiento con sulfito no fue efectivo. Celus y col., (2007) obtuvieron un concentrado con 40 g 100 g<sup>-1</sup> de proteínas, utilizando extracción alcalina y con enzimas alcalasa. Rommi y col., (2018) obtuvieron un concentrado con 39 g 100 g<sup>-1</sup> de proteínas utilizando medio alcalino y proteasas.

**Tabla IV.6.** Composición del Concentrado Proteico de HM

	<b>g 100 g<sup>-1</sup> bs</b>
<b>Proteínas</b>	57,7 ± 0,3
<b>Cenizas</b>	14,0 ± 0,1
<b>Grasa bruta (extracto etéreo)</b>	2,6 ± 0,4
<b>Fibra dietaria</b>	5,6 ± 1,4
<b>Carbohidratos*</b>	20,1

\* calculado por diferencia

En relación con el contenido de lípidos, además se midieron ácidos grasos libres, obteniéndose un valor de 4,95 ± 0,72 mmol 100 g<sup>-1</sup> b.s. Posiblemente el contenido de ácidos grasos libres en el CP se deba a la extracción alcalina, que afecta a la liberación de lípidos y lignina (Niemi y col., 2013).

Respecto al contenido de fibra dietaria, se obtuvo un CP con un valor inferior al reportado por He y col., 2019 (16,1 ± 1,1 g 100 g<sup>-1</sup>) que realizó una extracción alcalina con hidróxido de sodio de 5 g 100 g<sup>-1</sup>.

Además, se determinó el contenido de compuestos fenólicos libres, resultando un valor de 15,90 ± 0,00 mg AG 100 g<sup>-1</sup> b.s. Al respecto Vieira y col., (2016) midieron el contenido de compuestos fenólicos totales (por el método de Folin-Ciocalteu), que fue de 1,65 mg AG 100 g<sup>-1</sup> b.s en el concentrado proteico de HM después de una hidrólisis con proteasas. Asimismo, Connolly y col., (2013) reportaron un valor de 4,59±0,11 mg AG g<sup>-1</sup> b.s en el concentrado proteico de HM, obtenido por extracción alcalina, seguida de una precipitación en el punto isoeléctrico.

#### IV.1.4.3. Perfil de aminoácidos

En la Tabla IV.7 se muestra el perfil de aminoácidos del CP.

**Tabla IV.7.** Perfil de aminoácidos del concentrado proteico de hez de malta

<b>Aminoácido</b>	<b>g/ 100 g proteína</b>
<b>Asp + Glutámico</b>	16,6 ± 0,1
<b>Serina</b>	5,3 ± 0,2
<b>Histidina</b>	11,4 ± 0,8
<b>Glicina</b>	0,4 ± 0,1
<b>Treonina</b>	4,4 ± 0,2
<b>Arginina</b>	6,6 ± 0,3
<b>Alanina</b>	6,2 ± 0,1
<b>Prolina</b>	5,8 ± 1,8
<b>Tirosina</b>	4,4 ± 0,3
<b>Valina</b>	5,7 ± 0,3
<b>Metionina</b>	2,7 ± 1,4
<b>Cisteína</b>	1,7 ± 0,1
<b>Isoleucina</b>	4,7 ± 0,2
<b>Leucina</b>	10,1 ± 0,5
<b>Fenilalanina</b>	7,8 ± 0,4
<b>Lisina</b>	6,3 ± 0,4
<b>Triptófano</b>	0,7 ± 0,0

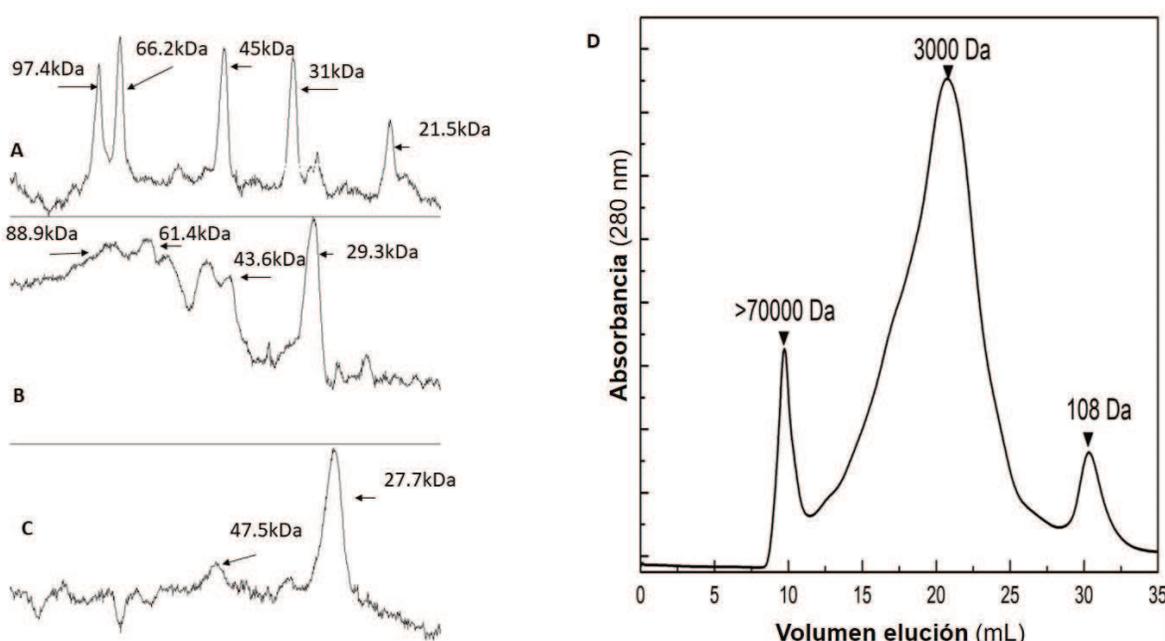
Los aminoácidos más abundantes fueron ácido aspártico y glutámico, histidina y leucina. Estos resultados concuerdan con Arauzo y col., (2019); McCarthy y col., (2013); Mussatto, (2014); Treimo y col., (2008). Wen y col., (2019) informaron que el perfil de aminoácidos de proteínas obtenidas de HM es similar al de cebada germinada.

Comparando el CP con el material de partida (HM<sub>2</sub>), el CP presentó mayor contenido de histidina ( $P < 0,05$ ) y cisteína ( $P < 0,05$ ). Además, teniendo en cuenta el perfil de aminoácidos de la proteína patrón para niños mayores de 3 años, adolescentes y adultos de FAO (2007) las proteínas de CP tienen un puntaje químico de 100%.

Teniendo en cuenta el contenido de aminoácidos indispensables puede decirse que el CP es una fuente interesante de proteínas para ser utilizadas en alimentación animal y humana.

#### IV.1.4.4. Perfil de pesos moleculares

En la Figura IV.5 se muestran los perfiles de pesos moleculares de las proteínas de HM y del CP, medidos a través de SDS-PAGE y FPLC.



**Figura IV.5.** Electroforesis SDS-PAGE con  $\beta$ -mercaptoetanol. A) estándar; B) perfiles de proteínas HM; C) perfiles de CP; D) FPLC del CP.

En el perfil proteico de la HM determinado por SDS-PAGE con un agente reductor ( $\beta$ -mercaptoetanol) se observaron componentes de alto peso molecular mayor a 90 kDa (bandas de proteínas no definidas), bandas entre 89-61 kDa y entre 45-29 kDa correspondiente a las hordeínas D, C y B respectivamente (Figura IV.5.B). Celus y col., (2007) y Connolly y col., (2013) informaron que la HM tenía hordeínas D (mayores de 94 kDa), hordeínas C (entre 80 y 55 kDa), hordeínas B (entre 35 y 50 kDa), albúminas y globulinas (menores de 20 kDa). Además, Yalcin y Celik, (2007) reportaron diferentes fracciones de hordeínas para la harina de cebada: hordeínas D (mayores de 66 kDa), hordeínas C (66 - 45 kDa), hordeínas

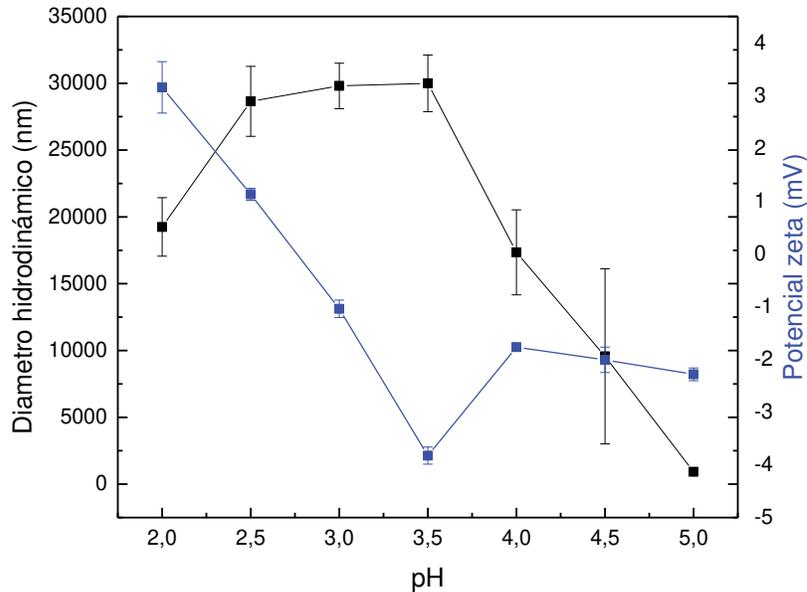
B (45 - 29 kDa), y albúminas y globulinas (menores de 29 kDa). Durante el malteado, las proteínas de cebada se degradan a aminoácidos y péptidos, por acción de una variedad de enzimas proteolíticas que luego se extraen en el mosto dulce (Benkovská y col., 2011). Por lo tanto, las proteínas que permanecen en la HM son insolubles y no extraíbles con agua.

En la Figura IV.5C se muestra el perfil del CP obtenido con PAGE-SDS con reductor, donde se observan dos bandas de polipéptidos de 47,5 kDa y 27,7 kDa y en la Figura IV.5D se presentan las fracciones moleculares de CP obtenidas por FPLC. El CP presentó una alta proporción de componentes de peso molecular intermedio (~3000 Da), mientras que la proporción de especies de alto peso molecular (>70000 Da) y aminoácidos libres (~108 Da) fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ). Estos resultados sugieren que CP está compuesto por polipéptidos de bajo PM, polipéptidos de mayor PM que podrían estar asociados por puentes disulfuro, y aminoácidos libres, obtenidos durante la extracción alcalina. Cian y col., (2018) mostraron que las condiciones alcalinas promovieron la solubilización de proteínas y oligopéptidos. En este sentido, Niemi y col., (2013) informaron que las proteínas solubilizadas de HM por pH alcalino (9,5) presentaron bandas inferiores a 10 kDa en una SDS-PAGE. Además, McCarthy y col., (2013) informaron que los perfiles de peso molecular del aislado proteico de HM tenían hasta 32% de péptidos inferiores a 5000 Da. El perfil de PM del CP es resultado del efecto de los pretratamientos reductores, enzimáticos y la extracción alcalina posterior sobre la estructura de los componentes proteicos.

#### **IV.1.4.5. Potencial $\zeta$ , punto Isoeléctrico y tamaño de partícula**

La magnitud del potencial  $\zeta$  es un indicador de la estabilidad de partículas coloidales en solución. Las partículas con potencial  $\zeta$  más positivas que +25 mV o más negativas que -25 mV se consideran estables, ya que poseerían la suficiente repulsión electrostática, para prevenir la formación de agregados (Malvern Instruments Ltd., 2014).

En la Figura IV.6 se muestra el efecto del pH sobre el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta del CP.



**Figura IV.6.** Efecto del pH sobre el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta de una dispersión del concentrado proteico de HM

Se observó que el incremento del pH del medio acuoso desde 2,0 a 3,5 produjo una disminución gradual del potencial  $\zeta$ . Se evidenció que la magnitud de este parámetro fue muy cercano a cero a nivel del pH 2,92, lo que correspondería al punto isoeléctrico de la proteína. Sin embargo, este valor de pI fue más bajo que el de 3,8 reportado por Connolly y col., (2013) y 3,3 informado por Arauzo y col., (2019) para las proteínas de hez de malta.

También puede observarse que los valores de potencial  $\zeta$  del CP para todos los pH evaluados fueron menores a 10 mV (en valor absoluto), denotando una baja estabilidad coloidal de las proteínas de HM en el rango de pH analizado.

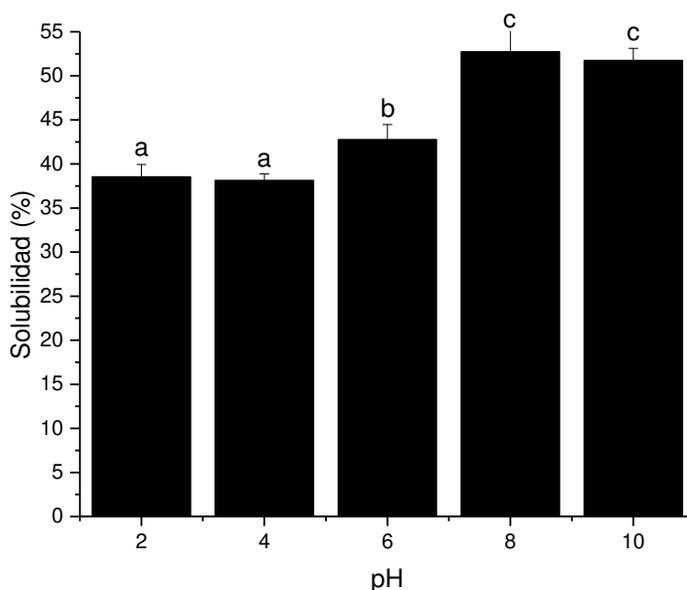
Respecto al tamaño de partículas de la dispersión del CP, fue altamente dependiente del pH del medio acuoso. Se observó que las proteínas alcanzaron un tamaño máximo en el rango de pH 2,5-3,5, siendo esto correspondiente al entorno del pI (2,92). A nivel de este último, como fue discutido previamente, se observó un potencial  $\zeta$  cercano a cero y esto estuvo acompañado de un gran incremento en el tamaño de partícula, sugiriendo la formación de grandes agregados proteicos (30  $\mu\text{m}$ ), fundamentalmente generados por una disminución de la repulsión electrostática entre dominios cargados de proteína. Estas

asociaciones moleculares de gran tamaño fueron observadas a simple vista ya que produjo un precipitado.

#### IV.1.5. Propiedades tecno-funcionales del concentrado proteico de hez de malta

##### IV.1.5.1. Solubilidad

En la Figura IV.7 se muestra la solubilidad del CP a diferentes valores de pH. Se observó que la solubilidad aumentó a medida que el pH se incrementó de 2 a 10. Los valores más bajos se observaron a pH 2-4 (~38%), mientras que los más altos a pH 8-10 (~50%). Estos resultados coinciden con los reportados por Connolly y col., (2014).



**Figura IV.7.** Solubilidad del concentrado proteico de HM a diferentes pHs

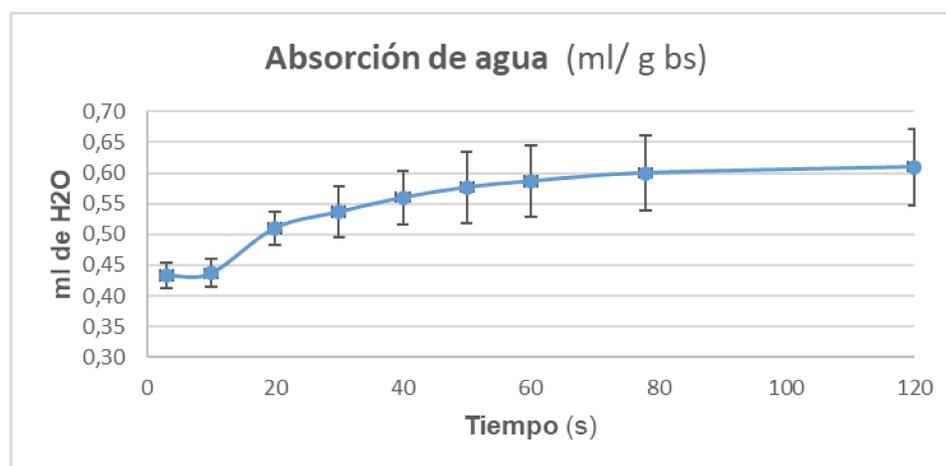
La solubilidad de las proteínas es la propiedad más importante en relación con su uso como ingrediente funcional en los alimentos. Está influenciada por la composición de aminoácidos. La presencia de cadenas laterales polares en la superficie de las proteínas favorece las interacciones agua-proteína y, por lo tanto, la solubilidad de las proteínas en soluciones acuosas (Arauzo y col., 2019). El pH afecta la carga en los grupos de cadena lateral débilmente ácidos y básicos, por lo que las proteínas generalmente muestran baja solubilidad en el punto isoeléctrico.

Las variaciones de solubilidad pueden atribuirse tanto a la carga neta de la proteína, que aumenta a medida que el pH se aleja del  $pI$ , como a la hidrofobicidad superficial, que promueve la agregación a través de la interacción hidrofóbica (Klompong y col., 2007). El aumento de la solubilidad se debe a la presencia de aminoácidos polares expuestos que pueden interactuar con las moléculas de agua a través de enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas (Noman y col., 2018).

En base a los resultados del perfil de aminoácidos (Tabla IV.7) se calculó que el 59,6% de los aminoácidos del CP son hidrofóbicos, lo que posiblemente explica la baja solubilidad proteica a pHs neutros.

#### IV.1.5.2. Absorción de agua

La curva de absorción de agua del CP en función del tiempo se muestra en la Figura IV.8. La absorción de agua de CP fue de  $6,00 \pm 0,41 \text{ mL g}^{-1}$  b.s., siendo mayor que la reportada por Li y col., (2021) para concentrados proteicos de HM obtenidos con la asistencia de ultrasonido ( $4,55 \text{ g g}^{-1}$ ). Estos autores reportaron que la sonicación podría estar involucrada con la exposición de grupos hidrofóbicos antes escondidos en la estructura molecular.



**Figura IV.8.** Curva de absorción de agua del concentrado proteico de HM en función del tiempo.

Cabe señalar que la determinación se realizó con el método Baumann, que se basa en el principio de la difusión de un líquido por acción capilar y se diferencia de otros métodos en que no se utiliza ninguna fuerza externa excepto la gravedad y la presión atmosférica (Santala y col., 2013)

#### IV.1.5.3. Capacidad de formar geles de las proteínas de HM

La gelificación es una propiedad tecno-funcional de las proteínas que indica la posibilidad de uso como ingrediente estructurante y texturizante en aplicaciones alimentarias (Hellebois y col., 2021).

La mínima concentración de gelificación del CP fue de 25 g 100 g<sup>-1</sup> a 80°C - 30 min. El tamaño de las proteínas, la temperatura y el pH de gelificación influyen en la MCG (Abbou y col., 2020).

Para investigar el efecto de la carga de la proteína sobre la capacidad de gelificación y características del gel se llevó a cabo una evaluación a tres valores de pH (3, 6, 8). Los resultados de retención de agua de los geles de proteínas de HM se muestran en la Tabla IV.8.

**Tabla IV.8.** Retención de agua de geles de proteínas de HM a diferentes pHs elaborados a la MCG

PH	% RETENCIÓN
3	96,1 ± 2,7 <sup>a</sup>
6	96,8 ± 0,9 <sup>a</sup>
8	100,0 ± 0,0 <sup>b</sup>

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05). MCG: mínima concentración de gelificación.

El % de retención de agua fue mayor para los geles formados a pH 8 (que no mostraron sinéresis) que para los preparados a pH 3 y 6, que no mostraron diferencias entre ellos. Los valores alcanzados fueron superiores a los de otros geles producidos con proteínas de HM u otras fuentes. Al respecto, Hellebois y col., (2021) evaluaron la capacidad de aislados de proteína HM para formar geles

a través de la acidificación inducida por delta-gluconolactona, que presentaron una capacidad de retención de agua superior al 86 %. Por su parte, la capacidad de retención de agua de geles de clara de huevo y de yema fue del 85,6% y 98,7%, respectivamente, ambos preparados con un 50% de sólidos (Li y col., 2018).

La menor retención de agua de los geles a pH cercanos al pl podría deberse a la reducción de repulsiones electrostáticas entre las moléculas de proteína (carga cercana a cero) y a la disminución de interacciones electrostáticas entre proteínas y agua, que conduce a una coagulación rápida y una retención de agua por capilaridad. En el mismo sentido, Wang y col., (2019) evaluaron el efecto del pH en geles de proteínas del suero lácteo preparados con una concentración de 12%. Ellos observaron que los preparados a pH 8 mostraban una mayor capacidad de retención de agua (85,5%) que los formados a pH 2,0 (81,4%) y pH 6,5 (80,0%) y lo atribuyeron en parte a la microestructura del gel en función de la cercanía al pl. A pH 6,5 (cerca del pl = 5,2) observaron una estructura granular formada durante el calentamiento debido a la débil repulsión electrostática, que resultó en una menor retención de agua. Sin embargo, a pH 8,0 las proteínas más cargadas formaron geles con estructura porosa y capilar, capaz de retener mayor contenido de agua.

En la Tabla IV.9 se muestran los resultados del perfil de textura de los geles de CP formados a pH 3, 6 y 8.

**Tabla IV.9.** Perfil de textura de las proteínas de HM a diferentes pHs.

pH	D (g.s)	R (%)	C	E (%)	G	M	A (g.s)
3,0	12,7±0,9 <sup>a</sup>	7,2±0,4 <sup>a</sup>	0,66±0,3 <sup>a</sup>	96,4±3,4 <sup>a</sup>	10,0±1,3 <sup>a</sup>	24,2±0,1 <sup>c</sup>	-2,2±0,4 <sup>b</sup>
6,0	19,1±0,8 <sup>b</sup>	7,7±0,5 <sup>a</sup>	0,67±0,0 <sup>a</sup>	98,3±0,6 <sup>a</sup>	12,7±0,6 <sup>b</sup>	12,5±0,5 <sup>a</sup>	-11,6±1,3 <sup>a</sup>
8,0	19,9±0,5 <sup>b</sup>	7,9±0,4 <sup>a</sup>	0,72±0,0 <sup>b</sup>	98,3±0,3 <sup>a</sup>	14,5±0,3 <sup>c</sup>	14,3±0,3 <sup>b</sup>	-11,7±0,3 <sup>a</sup>

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Dureza (D), Resiliencia (R), Cohesividad (C), Elasticidad (E), Gomosidad (G), Masticabilidad (M), Adhesividad (A)

La dureza está relacionada con la resistencia de la estructura del gel bajo compresión y es la fuerza máxima durante el primer ciclo de compresión. Se

observó que un aumento del pH por encima del  $pI$  (2,9) causó un aumento de la dureza del gel.

La resiliencia y la elasticidad de los geles no fueron afectadas por el pH. La resiliencia del gel se mide como la relación entre la energía ascendente y la energía descendente de la primera compresión. La elasticidad está altamente correlacionada con la recuperación de alimento entre el final de la primera compresión y el inicio de la segunda.

A pH 8 se obtuvo la mayor cohesividad, que se refiere a la fuerza de los enlaces internos que forman el cuerpo de un alimento y a la deformación antes de romperse.

A medida que aumentó el pH, aumentó la gomosidad (el producto de la dureza y la cohesión). La mayor masticabilidad se presentó a pH 3.

La adhesividad representa el trabajo requerido para vencer la fuerza de atracción entre la superficie del alimento y las superficies de otros materiales en contacto con el alimento. Se define como el área de fuerza negativa luego de la primera compresión. Los mayores valores de áreas negativas se obtuvieron a pH 6 y 8 respecto a pH 3.

El punto isoeléctrico de CP es 2,9, lo que explica las diferencias texturales entre geles. Cuando la gelificación se produce a valores de pH cercanos al punto isoeléctrico es posible que se obtenga una estructura más agregada, tipo coágulo debido a una reducción de la repulsión electrostática. Esto podría explicar los bajos valores de dureza, cohesividad y adhesividad de los geles obtenidos a pH 3. En este sentido, Liu y col., (2020) estudiaron geles de proteína de suero ( $pI \sim 5.2$ ) a diferentes valores de pH (5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0) y encontraron que cuando el valor de pH estaba cerca del punto isoeléctrico (pH 5,0 y 6,0), se induce la agregación de proteínas, lo que conduce a la formación de geles poco estructurados. Sin embargo, a pH superiores, la repulsión electrostática evita la agregación de proteínas, formando geles de alta resistencia (He y col., 2021).

A pH alcalino, las proteínas estarían más desplegadas, exponiendo más sitios para reacciones de entrecruzamiento, mejorando la formación de redes de

gel y la retención de agua, lo que se traduce en geles de mayor dureza, cohesividad y gomosidad.

El perfil de textura de los geles de proteínas de HM fue influenciado por el pH a causa de la variación de la carga neta de las proteínas. La microestructura de los geles de CP, y, en consecuencia, sus propiedades mecánicas se ven afectadas por el equilibrio entre las interacciones proteína -proteína y proteína – disolvente. Las interacciones proteína – proteína aumentan cerca del punto isoeléctrico. Por el contrario, las interacciones proteína-disolvente aumentan a medida que el pH aumenta por encima del punto isoeléctrico (Khemakhem y col., 2019). A pH cercano al pl se estaría formando un gel menos hidratado, como se indicó anteriormente. Los valores obtenidos de elasticidad y cohesividad fueron mayores que los reportados por Joshi y col., (2014) que elaboraron geles de proteínas de lenteja utilizando un 25% de sólidos en su formulación.

#### **IV.1.6. Conclusiones parciales**

- Se trabajó con hez de malta húmeda producida localmente (Cervecería Santa Fe), intentando incrementar el valor de este subproducto.
- Los pretratamientos realizados facilitaron la extracción de las proteínas de HM a pH alcalino, permitiendo la obtención de un producto enriquecido en proteína.
- El proceso se pudo escalar a planta piloto.
- El concentrado proteico obtenido presentó 57,7 % de proteínas, y estuvo formado mayoritariamente por proteínas de PM intermedios (entre 47,5 y 27,7 kDa). Las proteínas del concentrado registraron un punto isoeléctrico de 2,9 y solubilidades inferiores al 55% en todo el rango del pH estudiado.
- Las proteínas mostraron baja capacidad gelificante (CMG: 25%). Las propiedades de textura del gel se vieron afectadas por el pH, ya que aquellos formados a pH 8 presentaron mayor retención de agua, dureza, cohesividad, gomosidad y adhesividad que los formados a pH menores

**IV.2.CAPÍTULO**  
**PELÍCULAS DE PROTEÍNAS DE**  
**HEZ DE MALTA**

## **Películas de proteínas de Hez de malta**

### **IV.2.1. Selección de la formulación y condiciones de procesamiento**

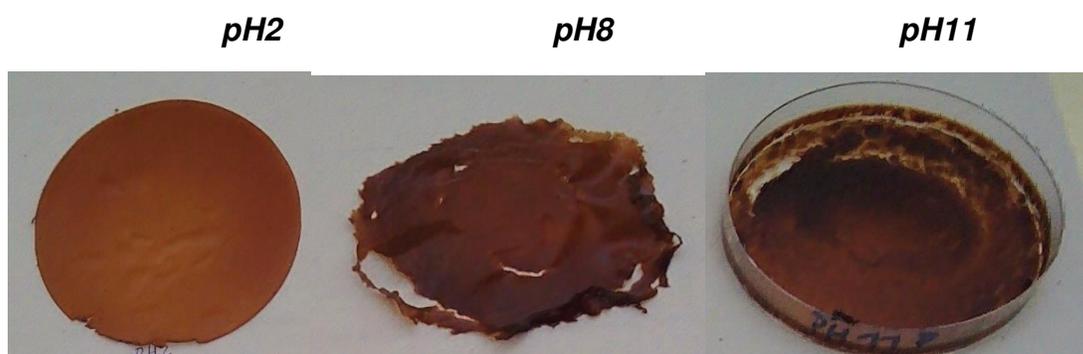
Teniendo en cuenta que no existían estudios reportados en la literatura científica de películas producidas sólo con proteínas de HM previas, inicialmente se realizó un *screening* para evaluar las condiciones en las que estas proteínas podían formar películas. Solo Lee y col., (2015) habían usado proteínas de HM para formular películas compuestas con quitosano, filtrando las dispersiones filmogénicas y utilizando glicerol como plastificante.

Inicialmente se analizó la posibilidad de formar películas a distintos pH, sin plastificantes agregados, considerando que algunos componentes de bajo peso molecular presentes en el concentrado podrían ejercer esta función. En experiencias previas en el laboratorio con otros sistemas, se observó que algunas proteínas y péptidos de bajo peso molecular, así como algunos polifenoles presentes en la formulación plastificaban las películas proteicas (Cian y col., 2014; Salgado y col., 2011). Las películas preparadas con CP a pH 8 y 11 presentaron una apariencia no homogénea y no pudieron ser desmoldadas. Por su parte, las películas preparadas a pH 2 sí tenían un aspecto homogéneo, sin poros visibles ni grietas o burbujas, pero su desmolde de la superficie donde habían sido formadas resultó difícil dada su fragilidad. Mauri & Añón, (2008) estudiaron el efecto del pH de la dispersión filmogénica sobre la funcionalidad de películas proteicas de soja y observaron que el pH afectaba la carga y el grado de desnaturalización de las proteínas, influyendo en la forma en que las cadenas peptídicas interactuaban durante la formación de las películas y, finalmente, en la naturaleza hidrofílica-hidrofóbica de las películas de proteínas. Aunque se demostró que las proteínas de CP tienen una menor solubilidad a pH ácido que alcalino, lo que sugiere una mayor interacción proteína-proteína a este pH, las proteínas podían estar bien dispersas en la dispersión filmógena, permitiendo obtener películas homogéneas. Además, las interacciones proteína-proteína están favorecidas a un pH cercano al pI, lo que podría favorecer la formación de la película.

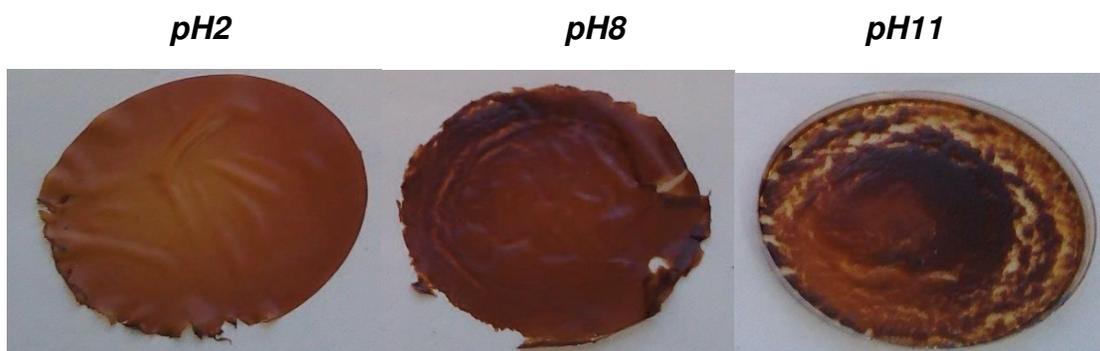
Con el fin de evitar la fragilidad observada, se analizó el uso de dos plastificantes diferentes comúnmente utilizados para este propósito, con diferentes

hidrofobicidades y PM: glicerol y PEG a tres pH diferentes: 2, 8 y 11, utilizando soportes plásticos. Los plastificantes, generalmente de bajo peso molecular, reducen las interacciones extensas entre las cadenas poliméricas, en este caso de proteínas disminuyendo la fragilidad del material con el consiguiente aumento de su flexibilidad, facilitando su manipulación (Mauri y col., 2016).

#### **Polietilenglicol-400 (PEG):**



#### **Glicerol:**



**Figura IV.9.** Películas de concentrados proteicos de hez de malta plastificadas con glicerol y PEG-400 preparadas a distintos pH.

La Figura IV.9 muestra la apariencia de estas películas. Nuevamente, los formulados a pH 2 resultaron homogéneos y pudieron desmoldarse fácilmente del soporte, mientras que el resto de las formulaciones resultaron en películas muy higroscópicas y poco homogéneas. Aquellas formuladas con PEG a pH 2 resultaron ser menos higroscópicas, por lo que se las seleccionó para completar el estudio, optimizando la concentración de plastificante.

El PEG es una molécula hidrófila relativamente pequeña, que puede ser fácilmente compatible con las proteínas de HM. Debido a su bajo peso molecular, el PEG-400 tiene alta polaridad y solubilidad, lo que favorece su capacidad de formar puentes de hidrógeno y su interacción con las cadenas proteicas (Turhan y col., 2001), sin la mayor interrupción de las interacciones proteína-proteína inducidas por el glicerol. Teóricamente, los plastificantes que contienen más grupos polares (-OH) deberían comportarse como mejores plastificantes para polímeros hidrofílicos debido al desarrollo de mayores interacciones proteína-plastificante, dentro de la película, principalmente a través del enlace de hidrógeno (Yang y Paulson, 2000). Sin embargo, el tamaño de la molécula, la solubilidad y la polaridad de los plastificantes también afectan la capacidad de formar enlaces de hidrógeno y la efectividad del plastificante (Kowalczyk y Baraniak, 2011; Suderman y col., 2018).

#### **IV.2.2. Efecto de la concentración de PEG en las propiedades de las películas**

Con el fin de optimizar la formulación de las películas, se estudió el efecto de la concentración de PEG (0,0 a 0,25 g / g CP) sobre las propiedades de las películas preparadas a pH 2. También, se prepararon películas sin PEG como control. Todas las películas fueron homogéneas y delgadas, fácil de desmoldar, a excepción de las películas sin PEG. La fragilidad característica de estas películas control hizo que se rompieran cuando se extraían del molde, lo que solo permitió analizar las propiedades que requerían pequeños trozos de película.

##### **IV.2.2.1. Susceptibilidad al agua**

En la Tabla IV.10. se presentan el contenido de agua, la solubilidad y la permeabilidad al vapor de agua de las películas proteicas preparadas a pH 2 con diferentes concentraciones de PEG.

**Tabla IV.10.** Susceptibilidad al agua de las películas proteicas de HM plastificadas con distintas concentraciones de PEG

<i><b>Películas</b></i>	<i><b>Humedad (g 100 g<sup>-1</sup>)</b></i>	<i><b>Solubilidad (g /100g)</b></i>	<i><b>WVP (g H<sub>2</sub>O/Pa.s.m) x10<sup>-10</sup></b></i>
F <sub>0</sub>	9,56 ± 0,37 <sup>a</sup>	-	-
F <sub>0.05</sub>	9,54 ± 0,24 <sup>a</sup>	70,40 ± 0,67 <sup>a</sup>	-
F <sub>0.10</sub>	9,70 ± 0,20 <sup>a</sup>	71,51 ± 2,13 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,03 <sup>a</sup>
F <sub>0.15</sub>	12,05 ± 0,43 <sup>b</sup>	77,47 ± 1,88 <sup>b</sup>	1,07 ± 0,03 <sup>b</sup>
F <sub>0.20</sub>	11,97 ± 0,15 <sup>b</sup>	88,58 ± 2,01 <sup>c</sup>	1,16 ± 0,03 <sup>b</sup>
F <sub>0.25</sub>	14,81 ± 0,40 <sup>c</sup>	89,78 ± 1,17 <sup>c</sup>	-

Los valores se expresaron como media ± desviación estándar. F<sub>0</sub> - F<sub>0.25</sub> indican relaciones de PEG / sólidos para cada fórmula de película; WVP: permeabilidad al vapor de agua

El contenido de agua de las películas estuvo dentro del rango de 9,54–14,81%. Estos valores aumentaron con el contenido de PEG y podrían relacionarse con la capacidad de retención de agua del plastificante (Jafarzadeh y col., 2018).

La solubilidad en agua de las películas proteicas aumentó de 70,4 a 89,8 g 100 g<sup>-1</sup>, al aumentar el contenido de PEG. Recientemente, Shroti y col., (2022) reportaron una solubilidad de 63,09 % en películas de proteínas de HM formuladas a pH 13 con glicerol.

En general, la adición de un plastificante aumenta la solubilidad debido a la disminución del entrecruzamiento entre las cadenas poliméricas, y en el caso de compuestos hidrofílicos, a su capacidad de retención de agua, que aumenta la plastificación (Ghasemlou y col., 2011).

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas varió de 8,49 × 10<sup>-11</sup> a 1,00 × 10<sup>-10</sup> (g H<sub>2</sub>O Pa<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup>). La WVP de las películas F<sub>0.05</sub> y F<sub>0.25</sub> no pudo determinarse dado que se rompieron durante la medida (F<sub>0.05</sub> por no contener la cantidad suficiente de PEG que permitiera su manipulación y F<sub>0.25</sub> por su higroscopicidad atribuida a la mayor concentración de PEG). Sólo fue posible medir esta propiedad en las películas con concentraciones de PEG intermedias entre 0,10 y 0,20 g PEG g<sup>-1</sup> CP, que mostraron valores de WVP que se incrementaron con el contenido de PEG y de agua, con valores entre 8,49 × 10<sup>-11</sup> y 1,16 × 10<sup>-10</sup> (g H<sub>2</sub>O Pa<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup>). La película F<sub>0.10</sub> resultó ser la que mejores propiedades barrera presentó. Pero vale resaltar que los valores de WVP

encontrados fueron significativamente más bajos que los informados por Lee y col., (2015) para películas preparadas con proteínas de hez de malta solas o con quitosano (100:0 y 30:70) usando glicerol como plastificante ( $2,93 \pm 0,20 \times 10^{-9}$  y  $2,72 \pm 0,15 \times 10^{-9}$  g H<sub>2</sub>O Pa<sup>-1</sup>. s<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup> respectivamente). La WVP para F<sub>0.10</sub> también fue inferior a la correspondiente a otras películas proteicas plastificadas con glicerol (50 g 100 g<sup>-1</sup> proteínas), como de gelatina ( $10,2 \times 10^{-10}$ g Pa<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> m<sup>-1</sup>), de aislado de proteína de soja ( $7,54 \times 10^{-10}$  g Pa<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> m<sup>-1</sup>), de concentrado de proteína de suero ( $1,54 \times 10^{-10}$ g Pa<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> m<sup>-1</sup>) (Kaewprachu y col., 2016), y de proteínas de hez de malta ( $3,99 \times 10^{-10}$ g. m m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup>) (Shrotri & Saini, 2022). El perfil de aminoácidos de las proteínas de HM (Tabla IV.7) indicó que el 38% de los aminoácidos son hidrofóbicos, lo que puede estar relacionado con las propiedades de barrera al agua de estas películas. La susceptibilidad al agua de las películas, analizada por el contenido de humedad, la solubilidad en agua y WVP, es una característica importante de las mismas, que determina su posible aplicación futura. Por ejemplo, la solubilidad de las películas comestibles es esencial, cuando se busca un material para el envasado de alimentos con alto contenido de agua, y también determina la biodegradabilidad y la capacidad del material para la liberación de compuestos bioactivos (Sharma y Singh, 2016).

#### **IV.2.2.2. Espesor y Propiedades ópticas**

El espesor y las propiedades ópticas de las películas de proteínas de HM y diferentes niveles de PEG se muestran en la Tabla IV.11.

Las películas presentaron espesores dentro del rango de 83,10 a 106,84 μm, observándose un valor máximo para F<sub>0.10</sub>, y disminuyendo a mayores niveles de PEG.

Respecto a los parámetros de color L\*, a\* y b\* de las películas estudiadas, al incorporar el PEG no se observó una tendencia en particular. En general, el agregado de PEG a niveles mayores o iguales a 0,10 g g<sup>-1</sup> CP disminuyó los valores de luminosidad. El parámetro b\*, que describe la cromaticidad de azul a amarillo de las películas, no tuvo una tendencia en particular con los niveles de

PEG, pero disminuyó en comparación con la película sin plastificante a partir de 0,10 g/ g CP.

**Tabla IV.11.** Espesor y propiedades ópticas de películas de HM y diferentes niveles de PEG

	<b>Espesor (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b><math>L^*</math></b>	<b><math>a^*</math></b>	<b><math>b^*</math></b>	<b><math>\Delta E^*</math></b>	<b>Opacidad (<math>\text{AU mm}^{-1}</math>)</b>
F <sub>0</sub>	95,6 ± 3,0 <sup>d</sup>	46,7 ± 1,0 <sup>c</sup>	19,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	34,5 ± 2,3 <sup>c</sup>	62,5 ± 0,1 <sup>ab</sup>	11,5 ± 0,2 <sup>b</sup>
F <sub>0.05</sub>	83,1 ± 3,3 <sup>a</sup>	47,9 ± 0,9 <sup>c</sup>	19,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	32,4 ± 1,0 <sup>bc</sup>	61,4 ± 1,2 <sup>a</sup>	12,6 ± 0,3 <sup>c</sup>
F <sub>0.10</sub>	106,8 ± 2,9 <sup>e</sup>	40,5 ± 0,9 <sup>a</sup>	21,4 ± 1,2 <sup>ab</sup>	28,2 ± 2,5 <sup>ab</sup>	66,5 ± 0,9 <sup>c</sup>	9,8 ± 0,2 <sup>a</sup>
F <sub>0.15</sub>	88,3 ± 2,9 <sup>c</sup>	41,2 ± 1,0 <sup>a</sup>	20,8 ± 0,4 <sup>abc</sup>	27,2 ± 3,1 <sup>a</sup>	65,3 ± 0,6 <sup>c</sup>	12,9 ± 0,2 <sup>cd</sup>
F <sub>0.20</sub>	85,8 ± 2,5 <sup>b</sup>	42,3 ± 0,4 <sup>ab</sup>	19,6 ± 0,8 <sup>bc</sup>	26,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	63,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	13,0 ± 0,2 <sup>d</sup>
F <sub>0.25</sub>	85,6 ± 2,3 <sup>b</sup>	44,0 ± 2,3 <sup>b</sup>	20,3 ± 1,1 <sup>abc</sup>	28,2 ± 3,4 <sup>ab</sup>	62,2 ± 0,8 <sup>ab</sup>	15,6 ± 0,2 <sup>e</sup>

Los valores se expresaron como media ± desviación estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0.05$ ); F<sub>0</sub> - F<sub>0.25</sub> corresponden a las relaciones de PEG / sólidos para cada fórmula de película.

Además, las películas F<sub>0.10</sub> y F<sub>0.15</sub> presentaron la mayor diferencia de color (valores  $\Delta E^*$ ), por lo que la adición de PEG indujo un cambio de color dependiendo de su concentración. El color se ve muy afectado por varios factores, como la adición de plastificantes, el tratamiento térmico, el proceso de fabricación y las condiciones de almacenamiento (Sui y col., 2016). Sin embargo, en el caso de las películas proteicas, el color se ve más afectado por la concentración de proteínas que por los tratamientos realizados (Su y col., 2012). En este caso, la cantidad de proteínas no cambió entre las fórmulas de película y la relación proteína / sólidos totales disminuyó de 0,57 a 0,45 g de proteína/ g sólidos al aumentar el nivel de PEG.

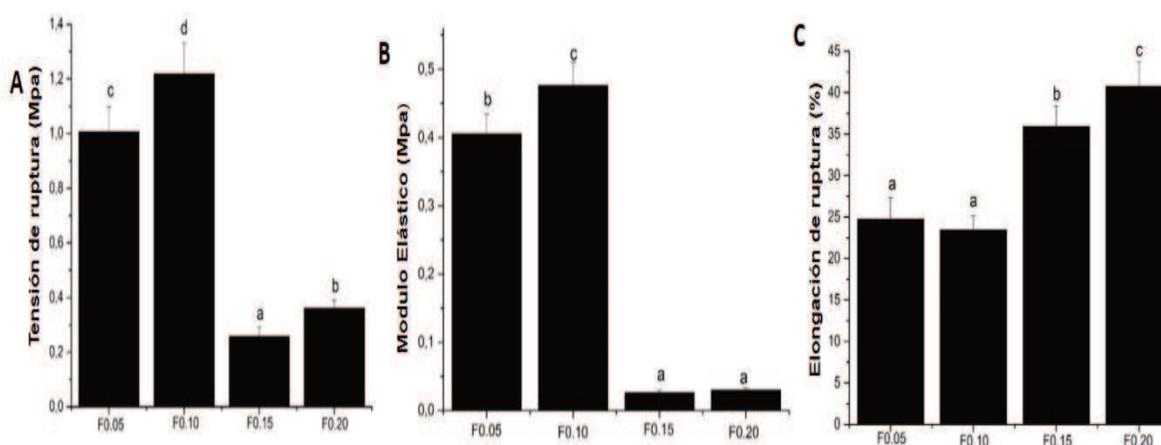
Por otra parte, considerando las películas con PEG, hubo una relación directa lineal entre el espesor y los valores de  $\Delta E^*$  (R: 0,6800).

Con respecto a la opacidad, hubo diferencias significativas en la opacidad de las películas según la concentración de PEG. Hubo una tendencia a aumentar la opacidad, a medida que aumentaba el contenido de PEG a partir de 0,10 g g<sup>-1</sup> sólidos. Sin embargo, las películas F<sub>0.10</sub> presentaron menores valores que la muestra sin PEG, en parte por el hecho de que estas películas presentaron el

mayor espesor. Es importante mencionar que las películas no mostraron transmitancia de 200 a 400 nm, por lo que podrían ser una barrera importante para la radiación UV. La opacidad es importante cuando se usan películas para envasar alimentos grasos, con el fin de frenar la degradación oxidativa catalizada por la luz, extendiendo la vida útil de los productos (Romani y col., 2018).

### IV.2.2.3. Propiedades Mecánicas

Los resultados de las propiedades mecánicas de las películas CP se muestran en la Figura IV.10.



**Figura IV.10.** Propiedades Mecánicas de películas de CP. A) Tensión de ruptura B) Modulo elástico C) Elongación de ruptura. Los valores se expresan como media ± desviación estándar. Diferentes letras significan diferencias significativas entre las muestras (p < 0.05); F<sub>0</sub> - F<sub>0.25</sub> indican relaciones de PEG / sólidos para cada formulación.

Las películas F<sub>0.25</sub> fueron muy higroscópicas y no pudieron analizarse con respecto de las propiedades mecánicas. Se observó que la adición de PEG a bajas concentraciones (0.05-0.10 g g<sup>-1</sup> sólido) resultó en una mayor resistencia a la tracción (Figura IV.10A) y módulo elástico (Figura IV.10B), y una menor elongación en la rotura (Figura IV.10C) que las películas formadas con concentraciones superiores de PEG (0,15-0,20 g g<sup>-1</sup>). Guerrero y Caba, (2010) informaron que al aumentar la cantidad de glicerol como plastificante en las películas de proteína de soja disminuyó la resistencia a la tracción y un aumentó la

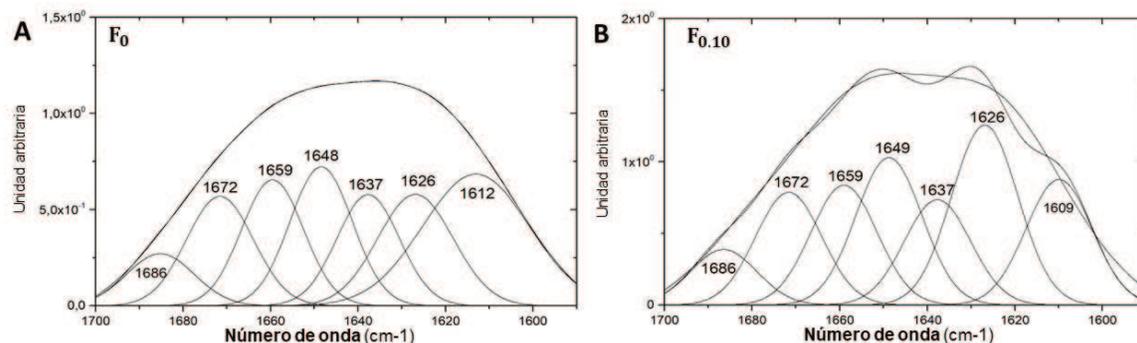
elongación en la rotura debido al hecho de que la plastificación reduce las interacciones entre las cadenas de proteínas, aumentando así su movilidad.

Al respecto, Lee y col., (2015) reportaron valores de 4,32 MPa, para la tensión de ruptura, y 36,38% para la elongación de las películas obtenidas con proteínas de HM y 40 g de glicerol 100 g<sup>-1</sup> de proteínas de HM; pero utilizaron proteínas solubles tratadas térmicamente para la elaboración de dichas películas. Por su parte, Shroti & Saini, (2022) obtuvieron películas de proteínas de HM con propiedades mecánicas similares a las de este trabajo (Tensión a la rotura: 1,4 MPa y elongación a la rotura: 52%) al trabajar con mayor concentración de proteínas (10 g 100 g<sup>-1</sup>) a pH13 y temperatura.

#### IV.2.2.4. Propiedades Estructurales de las películas

La Figura IV.11 muestra la deconvolución de la región amida I de los espectros ATR-FTIR de las películas F<sub>0</sub> y F<sub>0.10</sub> a modo de ejemplo.

La Tabla IV.12 muestra los porcentajes de  $\alpha$  hélice, lámina  $\beta$ , giros  $\beta$  y estructura al azar (*random coils*) determinados a partir de la banda amida I de los espectros ATR-FTIR.



**Figura IV.11.** Deconvolución de la región amida I de los espectros ATR-FTIR. A) F<sub>0</sub> y B) F<sub>0.10</sub>

El nivel de plastificante afectó el contenido de estructuras secundarias. Los valores hallados variaron entre 17,9 - 24,9% para  $\alpha$  hélice; 8,0-14,6% para giros  $\beta$ , 5,4-7,0% para láminas  $\beta$ , 6,9-14,85% para *random coils* y 9,9-16,0% para lámina  $\beta$  antiparalela. Las estructuras de  $\alpha$  hélice y giros  $\beta$  se forman a través de enlaces

de hidrógeno intramoleculares y las estructuras de lámina  $\beta$  se forman a través de enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares (Yun y col., 2016).

**Tabla IV.12.** Porcentajes de segmentos de estructura secundaria respecto al área total de la banda de amida I de películas proteicas de HM con diferentes niveles de PEG.

<b>Películas</b>	<b><math>\alpha</math>- hélice (%)</b>	<b>Giros <math>\beta</math> (%)</b>	<b>Lámina <math>\beta</math> paralela (%)</b>	<b><i>Radom coils</i> (%)</b>	<b>Lámina <math>\beta</math> antiparalela (%)</b>	<b><math>\alpha</math> Hél/ lám <math>\beta</math> (flexibilidad)</b>
F <sub>0</sub>	20,5±2,5 <sup>a</sup>	13,3±2,6 <sup>b</sup>	3,4±1,6 <sup>a</sup>	11,4±7,5 <sup>a</sup>	10,5±6,5 <sup>a</sup>	6,8±2,4 <sup>b</sup>
F <sub>0.05</sub>	20,4±2,2 <sup>a</sup>	8,1±0,9 <sup>a</sup>	6,4±0,7 <sup>b</sup>	14,8±4,8 <sup>a</sup>	14,5±4,3 <sup>a</sup>	3,2±0,7 <sup>a</sup>
F <sub>0.10</sub>	24,9±1,3 <sup>b</sup>	11,4±4,1 <sup>ab</sup>	5,4±1,7 <sup>ab</sup>	6,9±6,5 <sup>a</sup>	14,6±2,1 <sup>a</sup>	5,1±2,1 <sup>ab</sup>
F <sub>0.15</sub>	19,7±2,8 <sup>a</sup>	8,1±2,3 <sup>a</sup>	5,6±0,5 <sup>ab</sup>	14,9±2,1 <sup>a</sup>	9,9±3,3 <sup>a</sup>	3,5±0,2 <sup>a</sup>
F <sub>0.20</sub>	17,9±0,1 <sup>a</sup>	14,6±0,5 <sup>b</sup>	6,9±1,2 <sup>b</sup>	9,2±7,9 <sup>a</sup>	15,9±2,6 <sup>a</sup>	3,1±1,2 <sup>a</sup>

Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras en la misma columna significan diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0.05$ ); F<sub>0</sub> - F<sub>0.25</sub> indican relaciones de PEG / sólidos para cada fórmula de película.

La estructura proteica secundaria presente en las películas se relacionó con las propiedades mecánicas de las mismas. Se observó que el PEG aumentó la proporción de  $\alpha$  hélice sólo cuando se usó 0,10 g g<sup>-1</sup> CP (F<sub>0.10</sub>), lo que se tradujo en una mayor flexibilidad de estas películas. Esto podría estar relacionado con las mejores propiedades mecánicas de las películas F<sub>0.10</sub> (mayor resistencia a la tracción y módulo elástico) con respecto a las demás formulaciones.

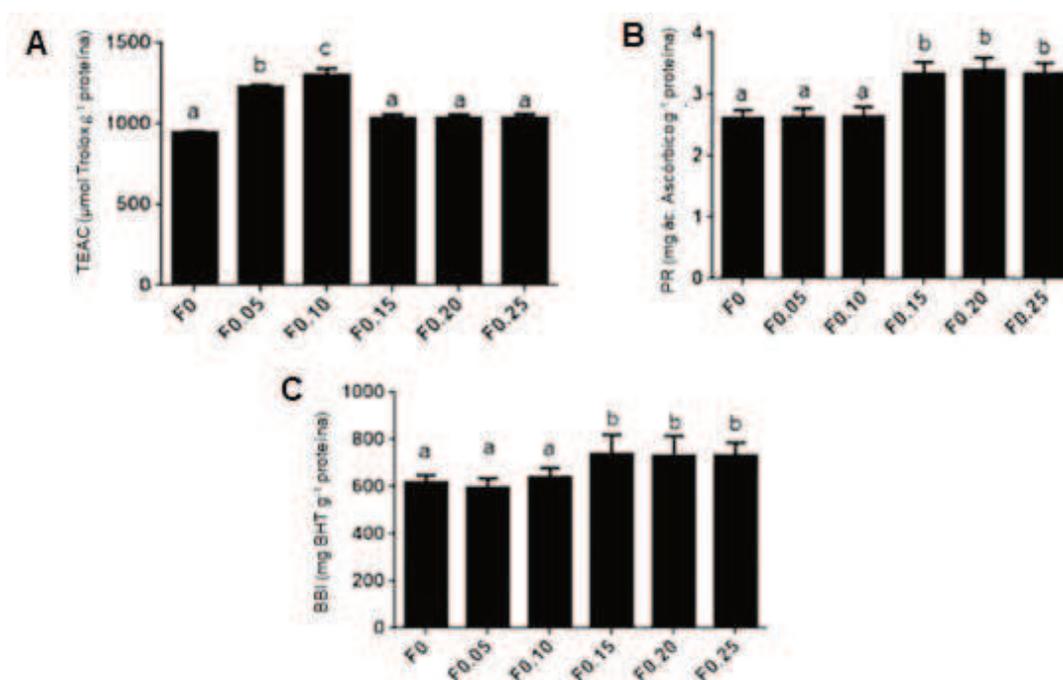
#### **IV.2.2.5. Efecto de la concentración de PEG sobre las propiedades bioactivas de las películas**

##### **IV.2.2.5.1. Propiedades antioxidantes**

En la Figura IV.12 se presenta la capacidad antioxidante de las películas de proteínas de HM elaborados a pH 2 con diferentes concentraciones de PEG. Los valores se expresaron teniendo en cuenta las proteínas solubilizadas de las películas.

Se observó que la capacidad de bloqueo del radical ABTS<sup>+</sup> (Figura IV.12 A) dependió de la concentración de PEG, siendo mayor a niveles bajos de PEG (0.05

y 0.10 g g<sup>-1</sup> CP). Este resultado puede atribuirse a la mayor solubilización de componentes proteicos antioxidantes de bajo peso molecular a menores niveles del plastificante. Como se mencionó anteriormente, las proteínas de HM tenían oligopéptidos (3000 Da) y aminoácidos libres (108 Da). Varios estudios han demostrado que los componentes proteicos de bajo peso molecular generalmente poseen una mayor capacidad de eliminación de radicales que las proteínas o péptidos de alto peso molecular (Cian y col., 2013; Wang y col., 2010). Al respecto, se ha sugerido que los componentes proteicos de bajo peso molecular accederían más fácilmente al sistema oxidante y conducirían a valores altos de TEAC (Dávalos y col., 2004).



**Figura IV.12.** Capacidad antioxidante de películas de CP elaborados a pH 2 con diferentes concentraciones de PEG (F<sub>0</sub>, F<sub>0.05</sub>, F<sub>0.15</sub>, F<sub>0.20</sub> y F<sub>0.25</sub>) evaluada a través de la eliminación de **A**) Bloqueo de radicales ABTS<sup>+</sup> (TEAC) **B**) Poder reductor (PR) **C**) Inhibición del blanqueo de β-caroteno (BBI). Diferentes letras significan diferencias significativas entre las muestras (p < 0.05); F<sub>0</sub> - F<sub>0.25</sub> indican relaciones de PEG / sólidos para cada fórmula de película.

Con respecto al poder reductor (PR), se observó una mayor capacidad antioxidante de las películas con una concentración de PEG superior a 0,10 g g<sup>-1</sup> (Figura IV.12.B). Entonces, el PR de las películas dependió de la concentración de

PEG. Esto puede deberse a la solubilización de componentes proteicos de alto peso molecular con capacidad antioxidante. Los niveles mayores de PEG en las formulaciones de las películas aumentaron la solubilidad de las proteínas en agua (Tabla IV.10), favoreciendo la solubilización de componentes proteicos de mayor peso molecular. Con relación a esto, Sonklin y col., (2018) informaron que los componentes proteicos con un peso molecular superior a 10 kDa de hidrolizados de proteínas de arvejas mostraron mayor PR. Por lo tanto, el mayor PR de las películas F<sub>0.15</sub>-F<sub>0.25</sub> puede deberse a la mayor solubilidad de los componentes activos, favorecida por el plastificante.

Al igual que lo ocurrido con el PR, un aumento en los niveles de PEG produjo un aumento en la inhibición del blanqueo de  $\beta$ -caroteno (Figura IV.12C), lo que indica que los componentes proteicos de alto peso molecular son los más activos. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por Pedroche y col., (2007) para hidrolizados de proteína de *Brassica carinata*. Ellos reportaron que el efecto antioxidante disminuyó al reducirse el tamaño de los péptidos, obteniéndose los valores más bajos de BBI para las fracciones de péptidos de 500 Da.

En general, se observó que el PEG afectó el mecanismo por el cual las proteínas ejercen su efecto antioxidante, probablemente induciendo cambios en la estructura secundaria de la proteína, afectando la accesibilidad de la proteína o los polipéptidos a los radicales o para la transferencia de electrones.

#### **IV.2.2.5.2. Actividad antimicrobiana**

Entre las propiedades bioactivas, se investigaron las propiedades antimicrobianas. Debido a que CP contiene oligopéptidos (Figura IV.5), podrían esperarse actividades antibacteriana y antifúngica (Brogden, 2005). Sin embargo, los resultados mostraron que las proteínas de HM de las películas no inhibieron el crecimiento de las cepas bacterianas (*Bacillus cereus* y *Salmonella* Newport), ni del hongo (*Penicillium corylophyllum*) ensayados.

### **IV.2.3. Conclusiones parciales**

- Fue posible formar películas a partir de las proteínas de HM extraídas.
- Su procesamiento por casting requirió del uso de plastificantes adicionales para lograr películas desmoldables y fáciles de manipular.
- El agregado de PEG en bajas concentraciones permitió obtener materiales con características aceptables: buenas propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua, buena barrera a la radiación UV y propiedades antioxidantes.
- Las características propias de las proteínas del concentrado proteico obtenido condujeron a materiales con altas solubilidades en agua y muy higroscópicos. Este punto podría ser el objetivo para mejorar en futuros estudios a través de distintas estrategias:
  - i) Modificando a las proteínas por tratamientos físicos, químicos o enzimáticos previo a la obtención de la película.
  - ii) Sometiendo a las películas resultantes a tratamientos físicos o químicos una vez formadas, intentando aumentar el entrecruzamiento.
  - iii) Agregando a la formulación otros biopolímeros, refuerzos y nano-refuerzos de distinta naturaleza química, con el fin de obtener materiales compuestos y/o nanocompuestos con mejores propiedades.
- Los concentrados proteicos de hez de malta podrían ser una alternativa económica para la preparación de películas biodegradables, debido al bajo costo. Además, las películas CP exhibieron cierta actividad antioxidante, lo que podría considerarse una ventaja para el envasado activo de alimentos.

**IV.3.CAPÍTULO**  
**INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS**  
**DE HEZ DE MALTA Y**  
**CARRAGENINAS. PROPIEDADES**  
**ESPUMANTES**

### **IV.3. Interacción entre proteínas de hez de malta y carrageninas. Propiedades espumantes**

En este capítulo se estudió la interacción entre las proteínas de hez de malta y dos tipos de carrageninas en solución acuosa y en interfases. Posteriormente, las propiedades resultantes de los sistemas evaluados se relacionaron con la capacidad de formar y estabilizar espumas.

#### **IV.3.1. Interacción entre proteínas de hez de malta y carrageninas en solución acuosa.**

##### **IV.3.1.1. Turbidez**

Las Figura IV.13, muestran las dispersiones obtenidas en el rango de pH de 6,00-2,00 para CP y los sistemas mixtos con  $R_{CP:CG}$  de 2:1 en el momento de la preparación y después de 24 h a 25 °C, respectivamente.

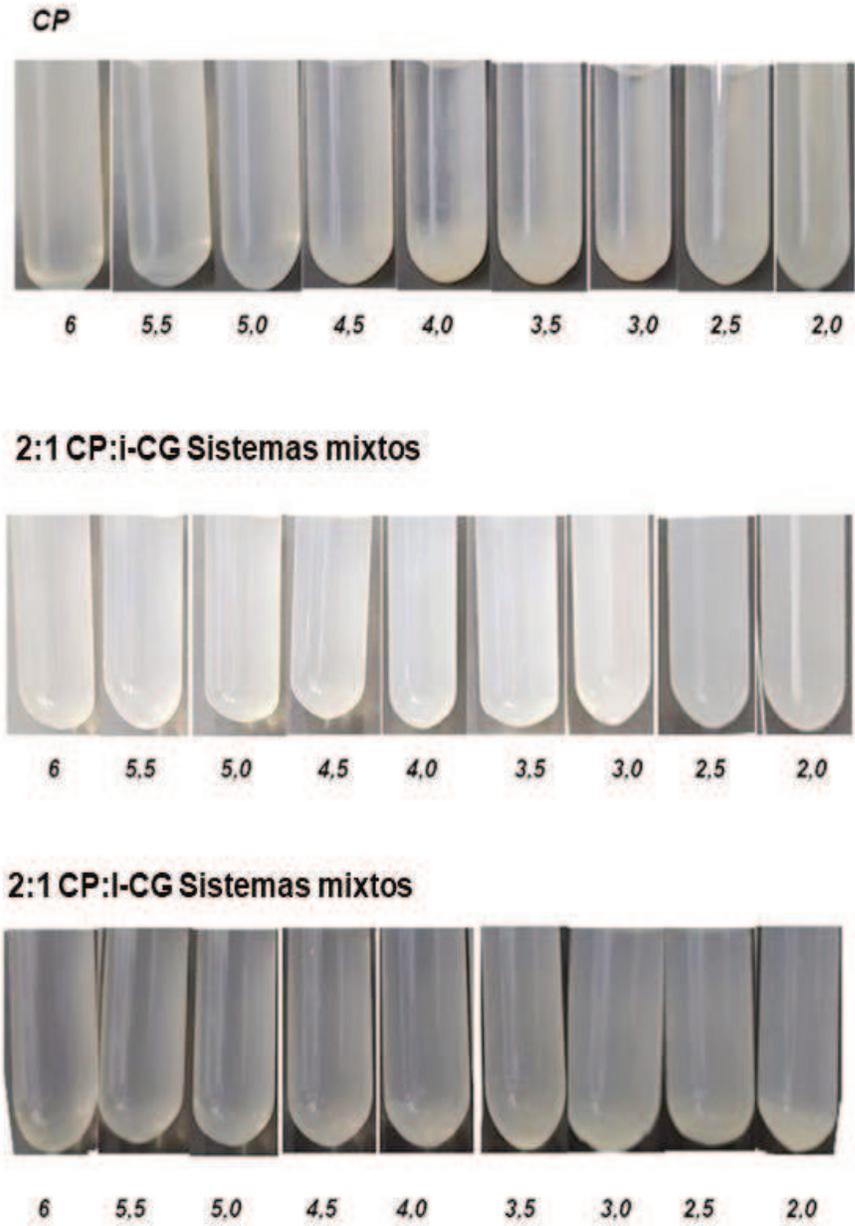
En el caso de la CP puro, se observó cierta precipitación en el rango de pH 2,5-4,0. Las dispersiones se volvieron inestables después de 30 min de preparadas debido a que la agregación de proteínas predomina en la proximidad del pl. Después de 24 h, todos los sistemas mostraron precipitación.

Las dispersiones puras de CG no mostraron cambios en el rango de pH estudiado.

Los sistemas mixtos fueron estables durante 9 h en todo el rango de pH estudiado. Sin embargo, después de 24 h, se registraron cambios visuales. Se observó precipitación en función del pH del medio acuoso y del tipo de CG.

En los sistemas mixtos con i-CG con  $R_{CP:CG}$  de 1:1 y 2:1 se observaron cambios en el rango de pH de 4,5 a 2,0, pero para  $R_{CP:CG}$  de 4:1, la separación fue macroscópica en todo el rango de pH.

En los sistemas mixtos con l-CG a  $R_{CP:CG}$  de 1:1, 2:1, 4:1 los precipitados se observaron en cantidades menores y cercanas al pl.

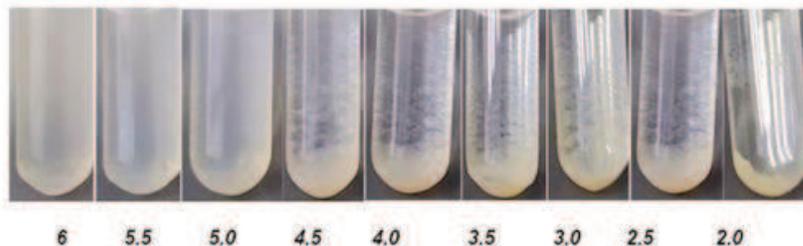


**A**

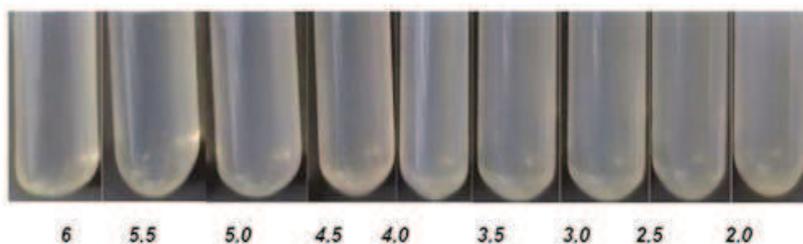
**Figura IV.13. A.** Dispersiones obtenidas en el rango de pH de 6,00-2,00 para CP y los sistemas mixtos  $R_{CP:CG}$  2:1 en el momento de la preparación.

**Después de 24 h**

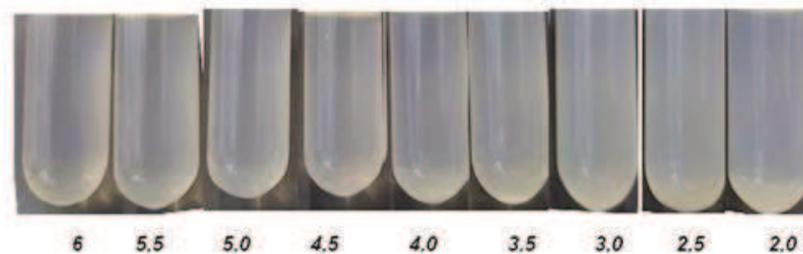
**CP**



**2:1 CP:i-CG Sistemas mixtos**



**2:1 CP:l-CG Sistemas mixtos**



**B**

**Figura IV.13.B** Dispersiones obtenidas en el rango de pH de 6,00-2,00 para CP y los sistemas mixtos  $R_{CP:CG}$  2:1 después de 24 h a 25 °C.

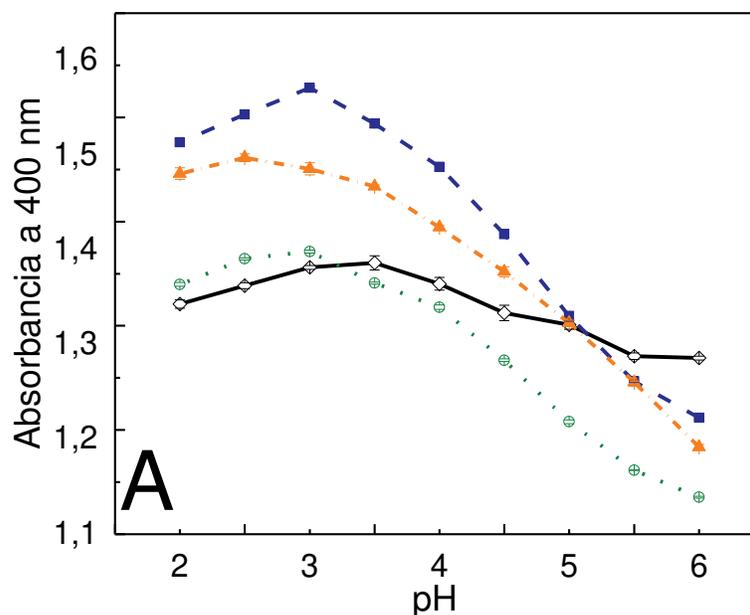
La Figura IV.14 muestra la turbidez (absorbancia a 400 nm) de los sistemas CP y mixtos en función del pH y  $R_{CP:CG}$ . Todas las muestras presentaron una tendencia similar a disminuir la turbidez a medida que el pH aumentó de 3,0 a 6,0.

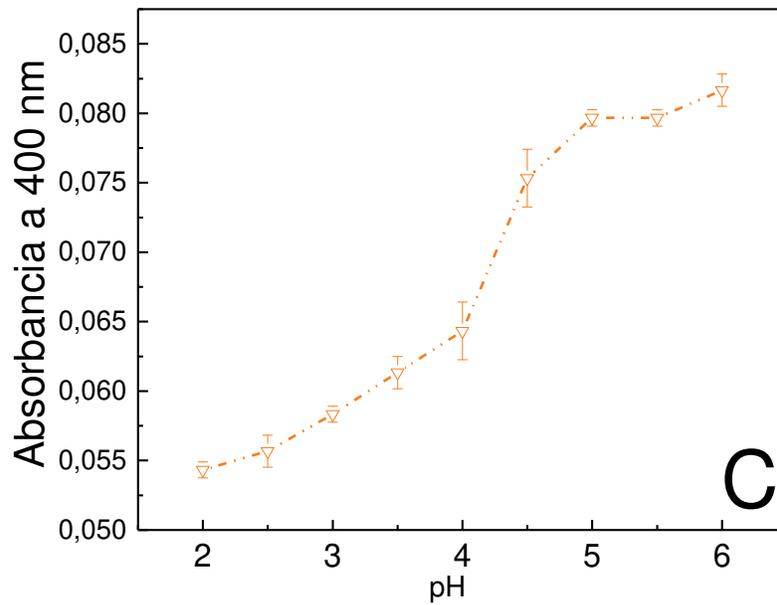
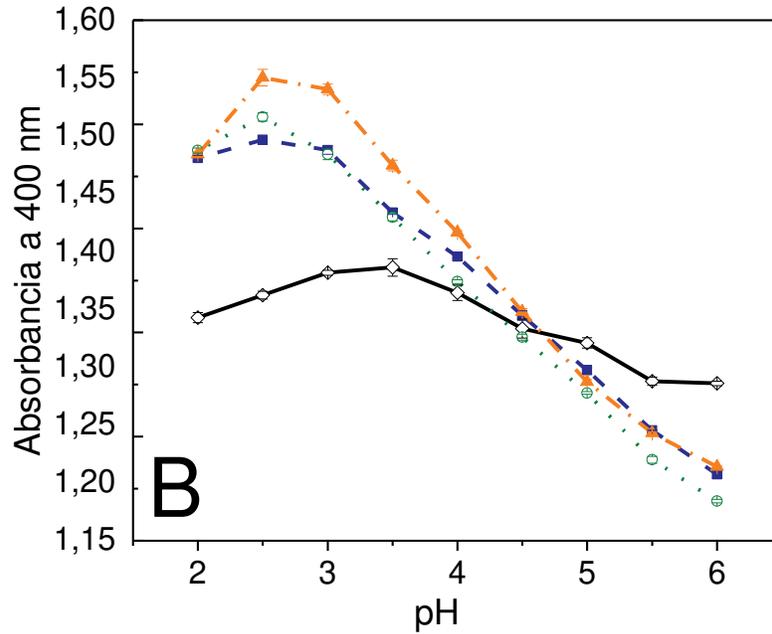
Las dispersiones de CP presentaron mayor turbidez en el rango de pH de 2,5-3,5, zona correspondiente a la vecindad del pl (2,9), lo que indica formación de agregados de gran tamaño en ese rango de pH. Esto también se observó con el examen a simple vista e incluso se manifestó precipitación con el tiempo (Figura IV.14 A y B).

Para las dispersiones de carrageninas se observaron valores de turbidez más bajos en comparación con los sistemas mixtos o de CP puro. En el caso de i-CG, no hubo cambio en la turbidez por efecto del pH (los valores oscilaron entre 0.012-0.015 AU). Mientras que para l-CG, estos valores aumentaron ligeramente al aumentar el pH del medio acuoso (Figura IV.14 C).

Para los sistemas mixtos se observó que los valores de turbidez fueron superiores a aquellos de CP, principalmente alrededor del pl. Sin embargo, el comportamiento fue diferente según el tipo de carragenina.

Para los sistemas CP:i-CG, la turbidez fue mayor de pH 2 a 5 que para CP. Sin embargo, a  $R_{CP:CG}$  de 1:1 los valores fueron ligeramente superiores a pH 3 y luego inferiores a los de CP.





**Figura IV.14.** Se muestra la turbidez (absorbancia a 400 nm) de los sistemas mixtos CP:i-CG (A), CP:l-CG (B) y de l-CG (C) en función del pH. Símbolos: (—◇—) CP, (---■---) 1:1, (····○····) 2:1, (-.-.-▲-.-.-) 4:1, (····▽····) l-CG. Temperatura: 25°C.

Todos los sistemas CP:I-CG presentaron mayor turbidez que CP de pH 2 a 4 y valores menores después de pH 4,5. Los valores de turbidez más altos de los sistemas mixtos en la vecindad de  $pI$ , concomitantes con el potencial zeta (como se explica más adelante), indicarían interacciones CP-CG atractivas y con formación de complejos. Se puede deducir que en el rango de pH de 2 a 4 hubo un fenómeno de coacervación complejo, que se relaciona con el aumento de la turbidez. Se observaron resultados similares para sistemas complejos de  $\beta$ -lactoglobulina y ovoalbúmina (Perez y col., 2015; Visentini y col., 2017).

#### **IV.3.1.2. Fluorescencia intrínseca de los sistemas**

Se evaluó el efecto del pH y de la concentración relativa de los biopolímeros (proteínas de hez de malta, CP y dos tipos de CG carrageninas: i-CG y I-CG) sobre la intensidad de emisión de Trp de los sistemas.

La espectroscopía de fluorescencia intrínseca, es decir, debida a la emisión de los residuos Trp de una proteína, constituye una herramienta útil para examinar los cambios conformacionales en una proteína bajo diferentes condiciones del medio acuoso (Misra, 2019), tratamientos fisicoquímicos (Pérez y col., 2009) y presencia de otros componentes de la matriz alimentaria (ligandos bioactivos, lípidos, polisacáridos) (Kasapis y col., 2009; Mohammadi y col., 2015; Pérez y col., 2014).

Los resultados se muestran en las Figura IV.15A (CP:i-CG) y Figura IV.15B (CP:I-CG).

Para las proteínas de HM, los valores de  $FI_{Trp}$  aumentaron con el incremento de los valores de pH ( $p < 0,05$ ), lo que sugiere que la conformación macromolecular de CP fue afectada por el pH del medio acuoso. El tipo de CG influyó significativamente ( $p < 0,05$ ) en la magnitud de la intensidad de emisión de Trp de CP, dependiendo del pH del medio acuoso y de la  $R_{CP:CG}$ .

Para los sistemas mixtos CP:i-CG se observó que la  $FI_{Trp}$  permaneció prácticamente similar a la de proteína hasta un valor de pH de  $\sim 3.5$ . Luego, un aumento del pH del medio acuoso provocó un incremento gradual de la intensidad

de emisión de fluorescencia. Además, la  $FI_{Trp}$  fue influenciada significativamente por  $R_{CP:CG}$ , particularmente en el rango de pH 3.5-5.0. Se observó un valor máximo para la  $R_{1:1}$  de CP:i-CG a pH 5,0, que fue disminuyendo al aumentar la proporción de proteína en la mezcla.

Para los sistemas mixtos CP:l-CG (Figura IV.15B), se observaron cambios significativos en la  $FI_{Trp}$  tanto por debajo como por arriba del pH 3,5. Por debajo del mismo, el agregado de l-CG promovió una disminución gradual de la  $IF_{Trp}$  en comparación con CP sin gomas; mientras que por arriba de pH 3,5 se observó el efecto contrario. Por otro lado, con un mayor contenido de l-CG a  $R_{1:1}$  el sistema mixto mostró valores de  $IF_{Trp}$  ligeramente más altos en todo el rango de pH evaluado, que los registrados para los otros sistemas mixtos.

Considerando que la concentración de CP permaneció constante en todos los sistemas mixtos, en virtud de los resultados obtenidos podría deducirse que la presencia de CG afectó el estado conformacional de la proteína dependiendo del tipo de CG, del pH del medio acuoso y de la concentración relativa de biopolímeros.

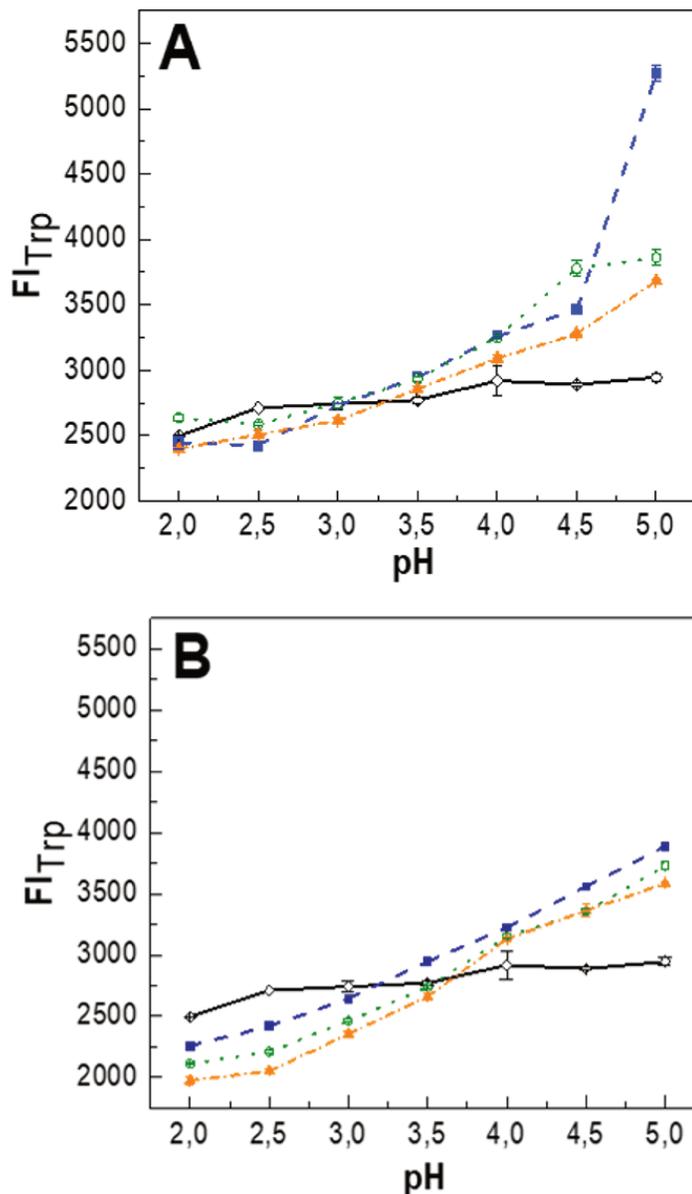
Diferentes comportamientos pudieron distinguirse a partir de un valor de pH de ~3.5. Por arriba del mismo, el agregado de CG promovió un aumento de la  $IF_{Trp}$  en comparación con la proteína pura, para ambas gomas evaluadas (i-CG y l-CG). Este incremento podría ser provocado por un cambio conformacional en la proteína, que promueve la disponibilidad y/o exposición de este fluoróforo intrínseco para la emisión de fluorescencia.

Por otra parte, a valores de pH inferiores a 3,5, los principales cambios en  $FI_{Trp}$  fueron observados para los sistemas mixtos formados con l-CG, donde se ve el efecto contrario, que el agregado del polisacárido a esos valores de pH promovió una oclusión de los residuos Trp presentes en la proteína, siendo este efecto más evidente en los sistemas con menor concentración de l-CG (mayor  $R_{CP:CG}$ ).

Esto podría evidenciar la fuerte influencia del pH en el plegamiento de la proteína en presencia de las carrageninas y en el comportamiento de interacción

entre los biopolímeros, ya que para una misma  $R_{CP:CG}$  se observaron valores de  $FI_{Trp}$  muy distintos por arriba o por debajo de pH 3,5 (principalmente con I-CG).

Estos cambios demostraron que las proteínas modificaron su estructura tridimensional no sólo en función del pH sino también de la concentración y el tipo de polisacáridos presente en la mezcla (Romo y col., 2020).



**Figura IV.15.** Efecto del pH del medio acuoso y de la concentración relativa de biopolímeros sobre la intensidad de emisión de fluorescencia del Trp de los sistemas. CP:CG (**A:** i-CG, **B:** l-CG). Símbolos: (—◇—) CP, (---■---) 1:1, (····○····) 2:1, (-.-.-▲-.-.-) 4:1. Temperatura: 25°C.

Por otro lado, los valores de las longitudes de onda correspondiente al máximo de emisión para los diferentes sistemas oscilaron entre 359,7 - 360,7 nm (no se muestran los datos) que son valores típicos de los residuos de triptófano que están completamente expuestos a un ambiente polar. Los mayores valores de longitud de onda se registraron a valores de pH superiores a 3,5, lo que se correspondería con la mayor exposición de los grupos Trp mencionada anteriormente.

### **IV.3.1.3. Hidrofobicidad superficial**

Se examinó la fluorescencia extrínseca de los sistemas mixtos usando la sonda fluorescente ANS. Es bien conocido que dicha sonda se une preferentemente a dominios hidrofóbicos de las proteínas, lo cual es un requisito molecular importante para la emisión de fluorescencia (Misra, 2019). De esta manera, el análisis del comportamiento fluorescente del ANS permite tener una idea de las regiones hidrofóbicas superficialmente expuestas en una proteína, las que influyen significativamente sobre las propiedades funcionales de las mismas, por ejemplo, propiedades emulsionantes, espumantes, gelificantes y de interacción con ligandos bioactivos (Fioramonti y col., 2014; Li y col., 2016; Mohammadi y col., 2015; Simões y col., 2020).

La Figura IV.16 muestra el efecto del pH del medio acuoso y de la concentración relativa de biopolímeros  $R_{CP:CG}$  sobre la intensidad de emisión de fluorescencia del ANS de los sistemas mixtos CP:i-CG (Figura IV.16A) y CP:l-CG (Figura IV.16B).

Para CP, se observó que el aumento del pH en el rango de 2.0-5.0 produjo una disminución de la  $F_{ANS}$  ( $p < 0,05$ ). Estos resultados indicarían que los dominios superficiales hidrofóbicos de CP estarían más ocluidos a valores de pH más elevados.

Además, se observó que la longitud de onda correspondiente al máximo de intensidad de emisión disminuyó gradualmente conforme aumentó el pH del medio acuoso (Figura IV.17 A y B). Este efecto es conocido en la literatura como *blue shift* (corrimiento hacia el azul), el cual indicaría que el aumento del pH del medio

acuoso promovería un ambiente molecular más apolar para los dominios hidrofóbicos superficiales de la proteína (Ruan y Balny, 2002; Zhang y col., 2008).

Entonces, si bien el incremento de pH promovió una disminución en la cantidad de sitios hidrofóbicos expuestos en la superficie de la proteína (Figura IV.16 A y B), el entorno de estos sitios fue más apolar (Figura IV.17 A y B), lo que podría estar indicando una ubicación de esos sitios más hacia el interior de las moléculas proteicas a mayores valores de pH y no tanto en la superficie.

La presencia de CG en los sistemas mixtos produjo una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la intensidad de emisión de fluorescencia del ANS con respecto a CP puro, fundamentalmente a bajos valores de pH. A pH 5,0, se observó que los valores de la  $FI_{ANS}$  de los sistemas mixtos fueron similares a los de CP, lo que sugiere que, en estas condiciones, CG no tuvo influencia sobre el comportamiento de fluorescencia extrínseco de CP.

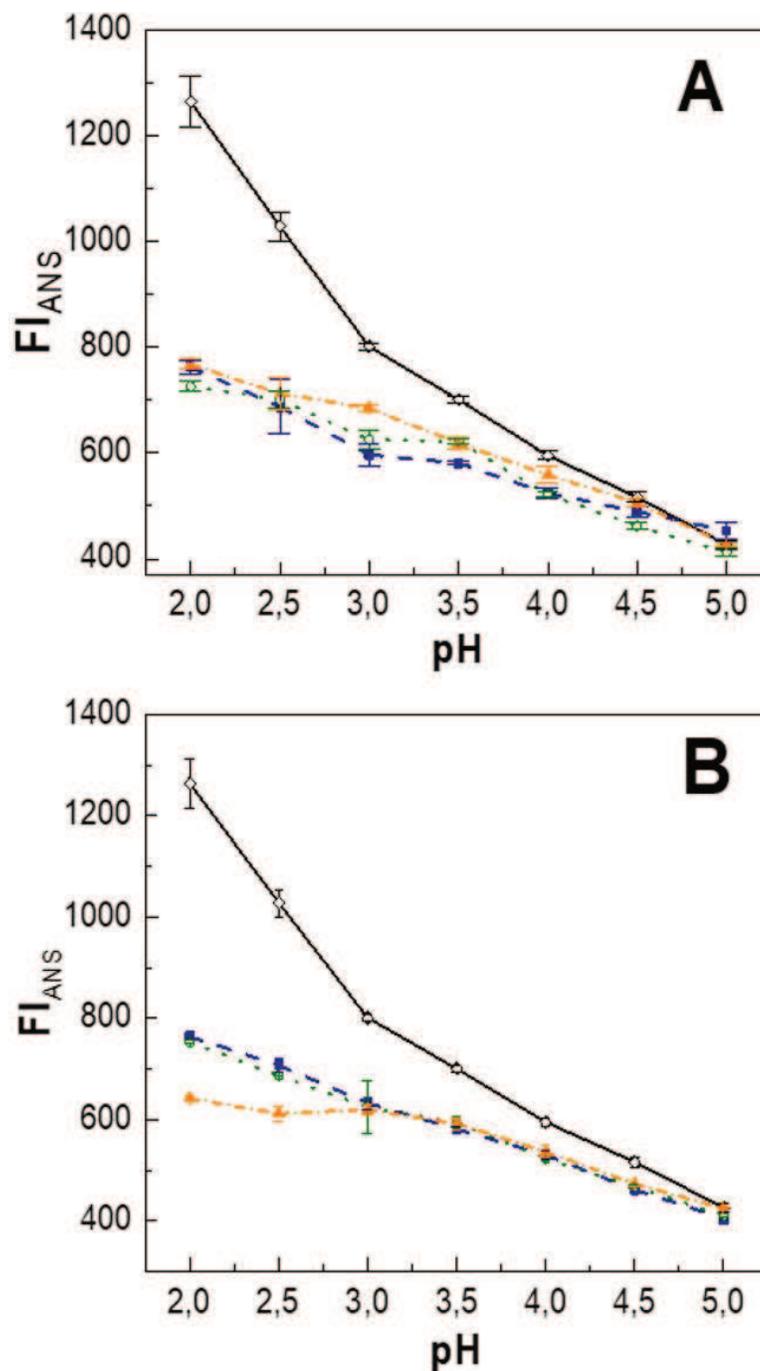
Sin embargo, a medida que el medio se hizo más ácido, la presencia de CG en los sistemas tuvo un efecto más significativo en la disminución de la  $FI_{ANS}$  de las proteínas, lo que indica que la interacción entre la proteína y el polisacárido podría ocluir mucho más los dominios hidrofóbicos expuestos en la superficie proteica a valores de pH más ácidos.

Además, se observó que la evolución de la longitud de onda correspondiente al máximo de intensidad de fluorescencia del ANS  $\lambda_{(MAX-ANS)}$  en los sistemas mixtos fue similar a la observada para CP puro (Figura IV.17), poniendo en evidencia que la presencia de CG en los sistemas mixtos no modificaría la polaridad del ambiente molecular de los dominios hidrofóbicos de CP.

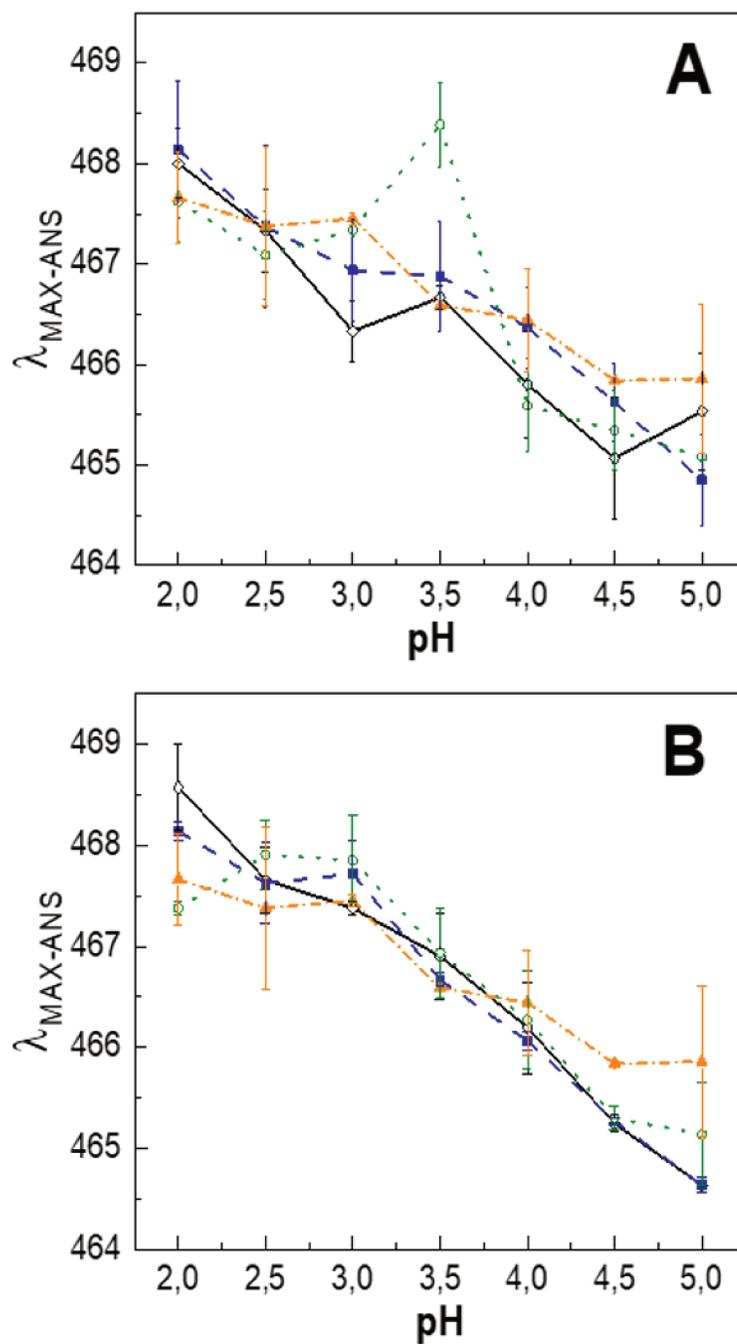
En general, el tipo de CG y la concentración relativa de biopolímeros en los sistemas mixtos no tuvo incidencia significativa en  $FI_{ANS}$  (Figura IV.16) y  $\lambda_{(MAX-ANS)}$  (Figura IV.17). Una excepción fue hallada para el sistema CP:I-CG en la  $R_{(CP:CG)}$  4:1, para el cual se registró un mínimo de  $FI_{ANS}$  en el rango de pH 2.0-3.0.

Perez y col., (2009) han reportado resultados similares en su estudio de interacciones entre proteínas del lactosuero y distintos polisacáridos aniónicos en fase acuosa. Atribuyeron la disminución en el valor de la hidrofobicidad superficial

a una reducción en el número de sitios hidrofóbicos superficiales disponibles en las proteínas debido a la formación de complejos proteína-polisacárido.



**Figura IV.16.** Efecto del pH del medio acuoso y de la concentración relativa de biopolímeros sobre la intensidad de emisión de fluorescencia del ANS de los sistemas mixtos CP:CG (**A:** i-CG, **B:** l-CG). Símbolos: (—◇—) CP, (---■---) 1:1, (····○····) 2:1, (---▲---) 4:1. Temperatura: 25°C.



**Figura IV.17.** Efecto del pH del medio acuoso y de la concentración relativa de biopolímeros sobre la longitud de onda correspondiente a la máxima intensidad de emisión de fluorescencia del ANS de los sistemas mixtos CP:CG (**A**: i-CG, **B**: l-CG). Símbolos: (—◇—) CP, (---■---) 1:1, (····○····) 2:1, (-.-.-▲-.-.-) 4:1. Temperatura: 25°C.

#### IV.3.1.4. Potencial $\zeta$ de los sistemas

Con el fin de examinar la naturaleza de las interacciones macromoleculares entre CP y las carrageninas en solución acuosa, se determinó el efecto del pH y de la concentración relativa de biopolímeros sobre el potencial  $\zeta$  (Figura IV.18.A CP:i-CG, Figura IV.18.B: l-CG). Se incluyeron además los valores para ambas carrageninas (i-CG y l-CG).

En el caso de proteínas, el potencial  $\zeta$  es particularmente sensible al pH del medio acuoso, la fuerza iónica, al estado conformacional de las mismas y a la presencia de polisacáridos (Youse y col., 2019).

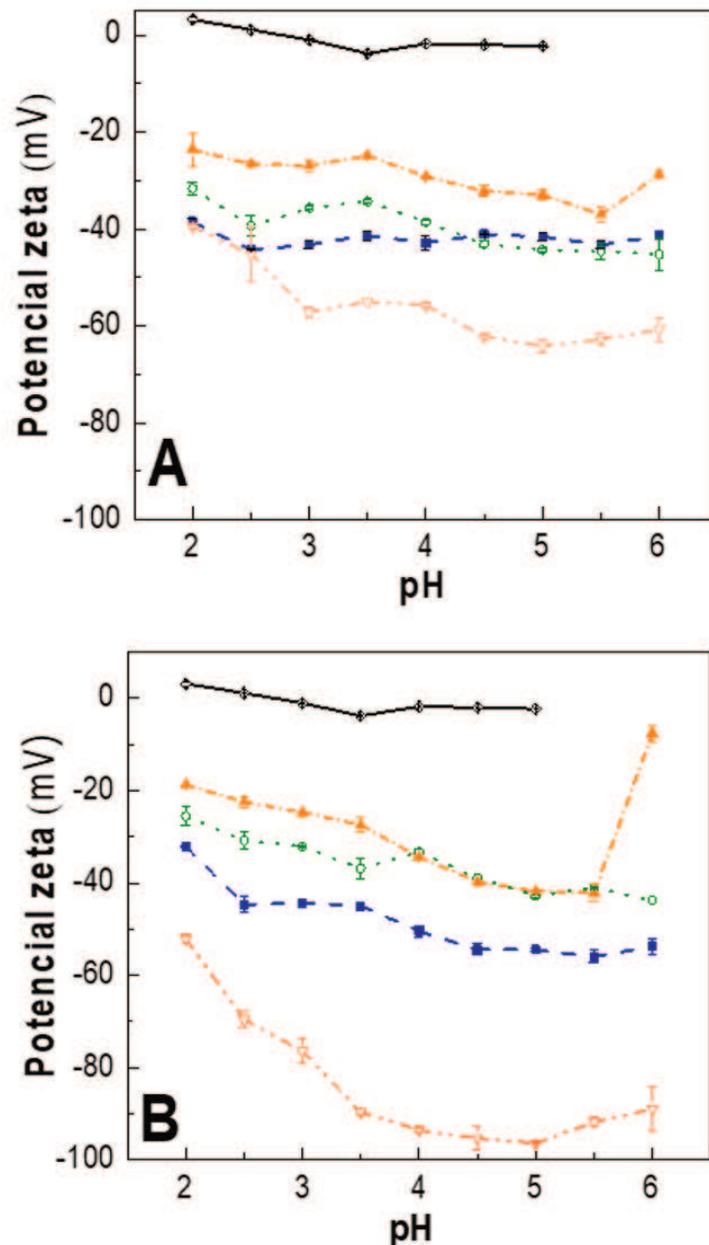
Para CP, se observó que el aumento del pH del medio acuoso produjo una disminución gradual del potencial  $\zeta$ . Su valor fue muy cercano a cero a pH 3,0, que está muy cerca del punto isoeléctrico de las proteínas de hez de malta (2,9). Además, los valores del potencial  $\zeta$  en todos los valores de pH fueron inferiores a 10 mV (en valor absoluto), lo que denota una baja estabilidad coloidal para CP en ausencia de CG. Esto es consistente con el comportamiento macroscópico observado en soluciones proteicas donde, a medida que el pH disminuía, se precipitaba más sedimento en el fondo del tubo.

Con respecto a las carrageninas, los potenciales  $\zeta$  fueron altamente negativos en el rango de pH evaluado. Se observó un aumento gradual de la magnitud en valor absoluto de este parámetro conforme aumentó el pH del medio acuoso, lo que estaría relacionado con la desprotonación de los grupos sulfato a valores de pH por encima del pKa de disociación de dichos grupos.

Además, el potencial  $\zeta$  de l-CG fue mayor que el de i-CG, lo cual es consistente con su mayor grado de sustitución de grupos sulfato (3 por unidad de galactosa). Es importante resaltar que los grupos sulfatos presentes en las carrageninas podrían prevenir la precipitación de proteínas cuando el pH está cerca del pI (Zhao y col., 2015).

En cuanto a los sistemas mixtos, se observaron valores de potencial  $\zeta$  intermedios entre CP y CG. Este comportamiento sugiere la existencia de interacciones electrostáticas atractivas en el rango de pH del medio acuoso

evaluado (2.0-6.0). Estas interacciones podrían ser particularmente predominantes por debajo del pI de las proteínas de HM, donde las cargas negativas de los grupos sulfato de CG serían neutralizadas por una mayor densidad de cargas positivas expuestas en la superficie proteica.



**Figura IV.18.** Efecto del pH del medio acuoso y de la concentración relativa de biopolímeros sobre el potencial  $\zeta$  de los sistemas mixtos CP:CG (**A**: i-CG, **B**: l-CG). Símbolos: (—◇—) CP, (---■---) 1:1, (···○···) 2:1, (---▲---) 4:1 (---▽---) CG puro. Temperatura: 25°C

Si bien el valor absoluto del potencial  $\zeta$  de los sistemas conteniendo sólo proteínas es muy cercano a cero, las proteínas por debajo de su  $pI$  mostrarían en su superficie una mayor densidad de segmentos con carga positiva que, a su vez, estarían compensados por segmentos con densidad de carga negativa también, y como consecuencia la carga neta de las proteínas sería cercana a cero (Jones y McClements, 2011).

Sin embargo, por arriba del  $pI$ , la existencia de interacciones atractivas podría ser igualmente probable considerando la gran electronegatividad de los grupos aniónicos sulfato de las CG. Esto se ha reportado en varios sistemas proteína-carragenina, por ejemplo, proteínas de suero (WPI)-CG, proteínas de canola (CPI)-CG (Stone y col., 2013).

En todos los sistemas mixtos CP:CG, el valor del potencial  $\zeta$  fue negativo y de gran magnitud, lo que supondría una elevada movilidad de los complejos proteína-polisacárido en el campo eléctrico durante las mediciones. Esto sugeriría que la carga neta de los complejos estaría fundamentalmente gobernada por los grupos funcionales de la CG. Al respecto, Klassen y col., (2011) reportó que los grupos  $-OSO_3^-$  tienen una mayor atracción por los grupos  $NH_3^+$  en la superficie de la proteína que la que tienen los grupos  $-COO^-$  presentes en otros polisacáridos.

Por lo tanto, las moléculas de CG podrían adherirse fuertemente a los segmentos con carga positiva expuestos en la CP, aumentando la carga y la estabilidad de los complejos mixtos.

Los valores de potencial  $\zeta$  disminuyeron a medida el pH del medio acuoso aumentó hasta un valor de 5,5, y prácticamente no dependieron del tipo de CG.

Sin embargo, la magnitud de estos dependió de la concentración relativa de biopolímeros, siendo el potencial  $\zeta$  del sistema mixto con  $R_{CP:CG}$  4:1 el que presentó menores valores absolutos. Este comportamiento podría explicarse considerando que en esta relación existe una menor concentración relativa de CG en el sistema, por lo tanto, existiría una menor cantidad de moléculas de polisacárido para interactuar con las proteínas y formar compuestos solubles. De esta manera, como las moléculas de CG son las que aportan una elevada carga negativa a los complejos (debido a la presencia de grupos sulfato), a

menores concentraciones de CG, los complejos mostrarían un valor de potencial  $\zeta$  menor en valor absoluto.

Los resultados mostraron que el comportamiento de interacción entre CP y CG corresponde fundamentalmente a interacciones electrostáticas atractivas, que dependieron de la  $R_{CP:CG}$  y en menor medida del tipo de CG. Además, se vio que la presencia del polisacárido en el medio incrementó la solubilidad de las proteínas de hez de malta a todos los niveles de pH evaluados.

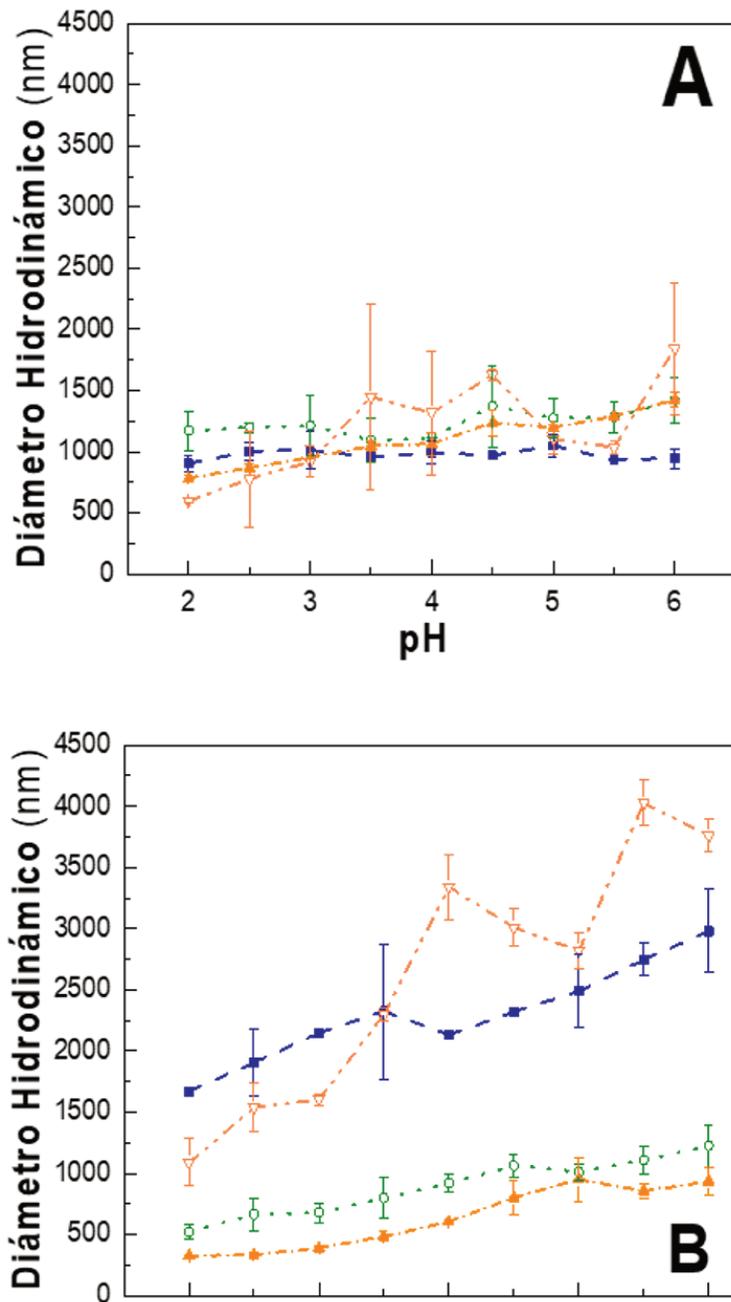
Como se mencionó anteriormente, las proteínas de hez de malta poseen una elevada proporción de aminoácidos hidrofóbicos (59,6 % del total de los aminoácidos) y esto se relacionaría con los bajos valores de potencial  $\zeta$  y la baja solubilidad de la proteína en medios acuosos en el rango de pH evaluados. Sin embargo, estas propiedades se vieron mejoradas por la interacción de las proteínas con las carrageninas a través de la formación de complejos CP:CG que incrementaron la carga negativa y la repulsión electrostática entre las partículas a través de los grupos sulfato presentes en el polisacárido, mejorando así su solubilidad.

#### **IV.3.1.5. Tamaño de partícula de los sistemas**

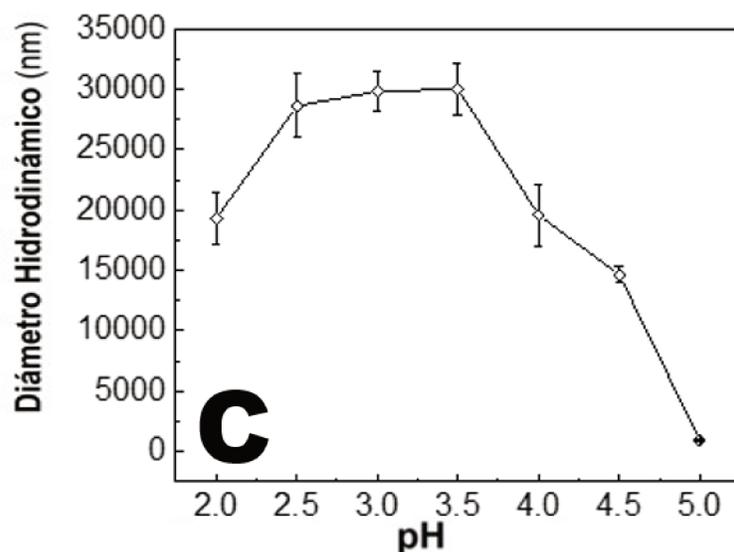
Los efectos del pH del medio acuoso y de la  $R_{CP:CG}$  sobre el tamaño de partícula de los sistemas mixtos se muestran en las Figuras IV.19.A: CP:i-CG; IV.19.B: I-CG y Figura.IV.19.C: CP.

Para las proteínas de hez de malta, el tamaño de partícula fue altamente dependiente del pH del medio acuoso. Se observó que la proteína alcanzó un tamaño máximo en el rango de pH 2,5-3,5, correspondiendo al entorno del pI (2,9) (Figura IV.19C).

Como se discutió previamente, a pH 3 el potencial  $\zeta$  fue cercano a cero, lo que fue acompañado de un gran incremento en el tamaño de partícula, sugiriendo la formación de grandes agregados proteicos (30  $\mu\text{m}$ ), estos podrían generarse fundamentalmente como consecuencia de una disminución de la repulsión electrostática entre dominios cargados de proteína. Estas grandes asociaciones moleculares precipitaron con el tiempo, lo que fue observado a simple vista.



**Figura IV.19.** Efecto del pH del medio acuoso y de la concentración relativa de biopolímeros sobre el tamaño de partícula (Z-average) promedio de los sistemas mixtos CP:CG (**A**: i-CG, **B**: l-CG). Símbolos: (---■---) 1:1, (---○---) 2:1, (---▲---) 4:1 (---▽---) CG puro. Temperatura: 25°C



**Figura IV.19.C** Efecto del pH del medio acuoso sobre el tamaño de partícula (Z-average) promedio de CP. Temperatura: 25°C

Las CG puras presentaron un tamaño muy inferior en comparación con CP. Además, el menor tamaño fue registrado para i-CG. Se observó que el tamaño de ambas CG se incrementó con el aumento del pH del medio acuoso, siendo este efecto más evidente para I-CG. Este comportamiento podría explicarse considerando la conformación predominantemente lineal de estos polisacáridos y su gran contenido de grupos aniónicos sulfato. Así, conforme aumenta el pH del medio acuoso, estos grupos son más electronegativos provocando una gran repulsión intramolecular en la cadena del polisacárido, lo que promovería una mayor rigidez y una conformación altamente lineal y rígida. La repulsión intramolecular de estos polisacáridos podría explicar el mayor tamaño (mayor radio hidrodinámico) de los sistemas I-CG en comparación con i-CG.

El tamaño de partículas registrado para los sistemas mixtos dependió del tipo de CG. Para los sistemas mixtos CP:i-CG, se observó que el tamaño de partículas fue muy similar al de i-CG pura y, en general, no se observaron diferencias entre las distintas concentraciones relativas de biopolímeros.

Si bien para la relación 1:1, el tamaño de partículas de los sistemas mixtos fue similar al de I-CG pura, el aumento de la concentración relativa de proteína provocó una notable disminución en el tamaño de partículas, siendo menor para el sistema mixto formulado a una  $R_{CP:CG}$  de 4:1.

Considerando la existencia de interacciones atractivas entre CP y CG en el rango de pH evaluado en este trabajo, el análisis de tamaño de partícula es compatible con la formación de complejos electrostáticos solubles, fundamentalmente a pH comprendidos en el entorno del pI de CP.

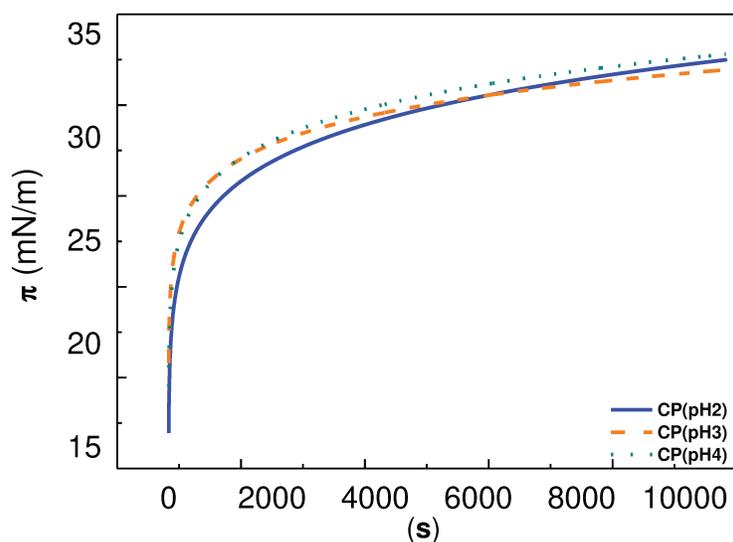
Es importante destacar que la presencia de CG en los sistemas mixtos mejoró la estabilidad coloidal del sistema y ésta además se mantuvo con el tiempo. Esta estabilidad coloidal sería debida al pequeño tamaño de los complejos electrostáticos CP:CG y a la elevada repulsión electrostática que aportarían las cargas negativas presentes en las carrageninas.

### **IV.3.2. Propiedades superficiales y espumantes de las proteínas de hez de malta.**

#### **IV.3.2.1. Propiedades Interfasiales de las proteínas de HM**

En la Figura IV.20 se muestra el efecto del pH del medio acuoso sobre la evolución de la presión superficial de la película de proteínas adsorbidas sobre la interfase aire-agua. Puede observarse que el pH del medio acuoso en el rango 2-4 no afectó de manera significativa la adsorción de las proteínas, aún al valor de su punto isoeléctrico (pH 2,9).

Si bien las proteínas manifiestan un mínimo de solubilidad en el entorno del pI debido a una disminución de la repulsión electrostática entre macromoléculas, existiría una fracción soluble capaz de adsorberse sobre la interfase aire-agua promoviendo un aumento gradual de la presión superficial de la película. Este comportamiento fue verificado para otras proteínas de interés alimentario tales como proteínas de amaranto (Bolontrade, Scilingo y Añón 2016), de clara de huevo (Sadahira y col., 2018), de leche (Zhou y col., 2020), y de haba (Felix y col., 2019).



**Figura IV.20.** Efecto del pH del medio acuoso sobre la evolución de la presión superficial de la película de proteínas de HM adsorbidas sobre la interfase aire-agua.

El efecto del pH sobre las propiedades interfasiales de las proteínas de HM adsorbidas sobre la interfase aire – agua se muestran en la Tabla IV.13.

**Tabla IV.13.** Efecto del pH sobre la presión superficial final ( $\pi_f$ ), la constante de velocidad de difusión ( $k_{dif}$ ), penetración ( $k_p$ ) y reordenamiento ( $k_r$ ) de las películas de proteínas de HM adsorbidas sobre la interfase aire – agua.

	pH	$\pi_f$ (mN/m)	$k_{dif}$ (mN/m.s <sup>-0.5</sup> )	$k_p$ (10 <sup>-4</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_r$ (10 <sup>-4</sup> s <sup>-1</sup> )
CP	2	34,12± 0,58 <sup>a</sup>	1,01±0,00 <sup>c</sup>	2,59±0,01 <sup>a</sup>	4,70±0,05 <sup>a</sup>
	3	33,43±0,14 <sup>a</sup>	0,86±0,02 <sup>a</sup>	2,55±0,00 <sup>b</sup>	3,67±0,01 <sup>b</sup>
	4	34,07±0,55 <sup>a</sup>	0,95±0,02 <sup>b</sup>	2,52±0,00 <sup>c</sup>	3,58±0,03 <sup>b</sup>

Media ± DE. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

A pH 3 (cercano al pI) se observó el menor valor de la constante de difusión. Este resultado podría estar relacionado con el mayor tamaño proteico

producido por la asociación inducida por la reducción de la repulsión electrostática entre las macromoléculas en el seno de la solución. Este aumento del tamaño a nivel del punto isoeléctrico fue confirmado mediante la técnica de DLS y fue discutido previamente. Además, se observó una correlación negativa entre la constante de difusión y el tamaño de partícula ( $R = -0,8680$ ). La velocidad de difusión ( $k_{dif}$ ) depende de factores como el tamaño y la forma de la molécula, así como de las propiedades químicas de la superficie proteica, tal como la hidrofobicidad (Ruíz-Henestrosa y col., 2007). Perez y col., (2012) mostraron que un bajo tamaño de partícula aumenta la flexibilidad y la difusión de la  $\beta$ -lactoglobulina.

Además, a pH 2 los valores de las constantes de difusión y de la velocidad de penetración y reordenamiento fueron mayores, sugiriendo que a este pH las proteínas de HM adoptarían una conformación que promovería todas las etapas de su adsorción interfásial (difusión, penetración y reordenamiento). La promoción de la adsorción interfásial a pH 2 podría relacionarse con una mayor hidrofobicidad superficial, tal como fue reportado previamente.

#### **IV.3.2.2. Características reológicas**

El efecto del pH sobre las propiedades reológicas de las películas de proteínas de HM adsorbidas sobre la interfase aire – agua se muestran en la Tabla IV.14.

El módulo dilatacional superficial ( $E$ ) es un parámetro que permite evaluar la resistencia a la deformación de la interfaz que suele estar relacionado con sus propiedades sólidas (Bolontrade y col., 2016).

Se observa que los valores del  $E$  fueron similares a los correspondientes a la componente elástica o elasticidad dilatacional ( $E'$ ), mientras que los valores de la componente viscosa o viscosidad dilatacional ( $E''$ ) fueron significativamente más bajos, lo que indica que la capa interfásial absorbida exhibió un comportamiento elástico. Estos resultados son acordes a los reportados para proteínas de ovoalbúmina (Xiong y col., 2019) y  $\beta$ -lactoglobulina (Rafe y col., 2022).

**Tabla IV.14.** Efecto del pH sobre el módulo dilatacional superficial (E), la componente elástica (E'), la componente viscosa (E'') y el ángulo de fase ( $\delta$ ) correspondientes a las películas proteicas de HM adsorbidas sobre la interfase aire – agua.

	pH	E (mN/m)	E' (mN/m)	E'' (mN/m)	Tan $\delta$
CP	2	35,6±0,3 <sup>a</sup>	34,7±0,2 <sup>a</sup>	5,8±0,2 <sup>a</sup>	0,16±0,00 <sup>b</sup>
	3	36,2±0,2 <sup>a</sup>	35,5±0,2 <sup>b</sup>	7,0±0,1 <sup>b</sup>	0,14±0,01 <sup>a</sup>
	4	47,5±0,5 <sup>b</sup>	47,0±0,4 <sup>c</sup>	7,4±0,4 <sup>b</sup>	0,16±0,01 <sup>b</sup>

Media  $\pm$  DE. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Además, se observó que el aumento del pH de 2 a 4 produjo un gran aumento en los valores de E y E' poniendo en evidencia un mayor número de interacciones macromoleculares entre segmentos de proteína adsorbidos. No obstante, al mayor valor de pH evaluado se observó un incremento de E'', sugiriendo un cierto grado de viscoelasticidad, posiblemente caracterizado por la presencia de multicapas de proteínas adsorbidas sobre la interfase aire-agua (Pérez y col., 2009).

Los valores de E, E' y E'' a pH 2, aunque más bajos que los encontrados a pH 4, sugieren la predominancia del carácter sólido neto de una monocapa de película proteica adsorbida, promovida por interacciones macromoleculares eficientes entre segmentos de la proteína, siendo este comportamiento explicado por los mayores valores de las constantes de difusión, penetración y reordenamiento.

#### **IV.3.2.3. Propiedades Espumantes de proteínas de las HM**

El efecto del pH sobre las propiedades espumantes de las proteínas de HM se muestra en la Tabla IV.15.

**Tabla IV.15.** Efecto del pH sobre las propiedades espumantes de las proteínas de HM.

	<b>pH</b>	<b>Expansión (%)</b>	<b>V<sub>0</sub> de drenado (mL/s)</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (s)</b>
CP	2	475 ±5,0 <sup>b</sup>	0,3±0,0 <sup>a</sup>	3,6±0,6 <sup>b</sup>
	3	428±2,5 <sup>a</sup>	2,3±0,1 <sup>a</sup>	6,0±0,6 <sup>c</sup>
	4	425±5,0 <sup>a</sup>	56,2±1,8 <sup>b</sup>	2,5±0,0 <sup>a</sup>

Media ± DE. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $t_{1/2}$ : tiempo de vida media de la espuma.

Los mayores valores de expansión fueron alcanzados a pH 2, indicando que este pH favoreció la formación de las espumas. En estas condiciones, las propiedades espumantes de las proteínas podrían ser explicadas considerando su comportamiento interfasial ( $\pi_f$ ,  $k_{dif}$ ,  $k_p$ ,  $k_r$ ,  $E$ ,  $E'$  y  $E''$ ), el cual estaría gobernado fundamentalmente por una mayor hidrofobicidad superficial.

Sin embargo, cabe aclarar que las propiedades espumantes de las proteínas de HM fueron pobres en comparación con otras proteínas alimentarias que se usan habitualmente como agentes espumantes. Aun así, la abundancia y el bajo costo de la HM hacen que se pueda considerar la obtención de proteínas y su aplicación en alimentos.

Por otra parte, el comportamiento interfasial de las proteínas puede modificarse en presencia de polisacáridos. Es bien conocido que bajo condiciones del medio acuoso adecuadas (pH, fuerza iónica y concentración relativa de biopolímeros) se puede favorecer su adsorción interfasial, por mecanismos tales como complejación o incompatibilidad termodinámica en el entorno interfasial (Pérez y col., 2009; Warnakulasuriya y Nickerson 2018). Por lo tanto, la mejora de las propiedades funcionales de las proteínas de HM mediante el empleo de polisacáridos aniónicos, tales como las carrageninas (CG) constituiría una estrategia de formulación interesante para obtener nuevas aplicaciones de estas en diferentes sistemas alimentarios.

Como fue mencionado previamente, las interacciones entre las proteínas de HM y las CG fueron de naturaleza electrostática, fundamentalmente atractivas,

entre cargas positivas de las proteínas y cargas negativas de las CG, resultando en la formación de complejos electrostáticos solubles. El análisis del comportamiento interfasial y espumante de los sistemas mixtos será abordado en las siguientes secciones.

### **IV.3.3. Propiedades superficiales y espumantes de sistemas mixtos**

#### **CP:CG**

En la bibliografía existen varios reportes sobre el estudio de la influencia de las CG sobre el comportamiento interfasial y espumante de proteínas alimentarias (Dickinson 2020; Pérez y col., 2009, 2012; Salem y col., 2020; Wang, Zhang, y Vardhanabhuti 2015; Warnakulasuriya y Nickerson 2018). Teniendo en cuenta los resultados del estudio de los sistemas mixtos de proteínas de hez de malta y las carrageninas en estado acuoso puede inferirse que, bajo las condiciones experimentales aplicadas, el comportamiento interfasial y espumante de las proteínas podría ser influenciado por la presencia de las CG, debido a la formación de complejos electrostáticos solubles CP-CG, cuyas características fisicoquímicas son dependientes del pH del medio acuoso, de la concentración relativa de biopolímeros y de la densidad de carga de CG (i-CG o l-CG).

En primer lugar, se analizó el comportamiento interfasial y espumante de los sistemas mixtos CP:i-CG, luego el comportamiento de los sistemas mixtos CP:l-CG. Para cada uno se compararon los resultados con los obtenidos para las proteínas de HM. Por último, a fin de vislumbrar los posibles efectos de la densidad de carga de CG sobre las características interfasiales y espumantes de los sistemas mixtos, se realizó una comparación entre ambos sistemas mixtos.

#### **IV.3.3.1. Propiedades interfasiales de los sistemas mixtos CP:i-CG**

Las propiedades interfasiales de los sistemas CP:i-CG se muestran en la Tabla IV.16.

La presencia de i-CG produjo modificaciones en el valor de  $\pi_f$  dependiendo del pH y de la  $R_{CP:CG}$ . En general, se observaron aumentos significativos en el valor de  $\pi_f$  fundamentalmente a pH 2, para todas las  $R_{CP:CG}$  ensayadas y con

respecto a CP. Este comportamiento sugiere la primera evidencia de una acción sinérgica entre ambos biopolímeros que promovería una mayor capacidad de adsorción de la proteína sobre la interfase aire-agua. Tal acción sinérgica podría ser atribuida a la formación de complejos electrostáticos solubles CP:i-CG, ya mencionada.

**Tabla IV.16.** Efecto del pH y la concentración relativa de biopolímeros,  $R_{CP:CG}$ , sobre la presión superficial final ( $\pi_f$ ), la constante de velocidad de difusión ( $k_{dif}$ ), penetración ( $k_p$ ) y reordenamiento ( $k_r$ ) de las películas de proteínas y sistemas mixtos CP:i-CG adsorbidas sobre la interfase aire – agua.

	pH	$R_{CP:CG}$	$\pi_f$ (mN/m)	$k_{dif}$ (mN/m.s <sup>-0.5</sup> )	$k_p$ (10 <sup>-4</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_r$ (10 <sup>-4</sup> s <sup>-1</sup> )
CP	2		34,12 ± 0,58 <sup>ab</sup>	1,01±0,00 <sup>e</sup>	2,59±0,01 <sup>a</sup>	4,70±0,05 <sup>a</sup>
	3		33,43±0,14 <sup>a</sup>	0,86±0,02 <sup>b</sup>	2,55±0,00 <sup>b</sup>	3,67±0,01 <sup>b</sup>
	4		34,07±0,55 <sup>ab</sup>	0,95±0,02 <sup>d</sup>	2,52±0,00 <sup>d</sup>	3,58±0,03 <sup>bc</sup>
CP:i-CG	2	1:1	35,83±0,37 <sup>d</sup>	0,92±0,02 <sup>cd</sup>	2,54±0,06 <sup>c</sup>	3,50±1,80 <sup>cd</sup>
	3	1:1	34,37±0,06 <sup>bc</sup>	0,91±0,01 <sup>c</sup>	2,53±0,06 <sup>c</sup>	3,45±0,00 <sup>d</sup>
	4	1:1	34,95±0,01 <sup>c</sup>	0,91±0,04 <sup>cd</sup>	0,07±0,01 <sup>e</sup>	0,10±0,01 <sup>e</sup>
	2	2:1	35,75±1,08 <sup>d</sup>	0,80±0,01 <sup>a</sup>	0,07±0,02 <sup>e</sup>	0,14±0,00 <sup>e</sup>
	3	2:1	33,63±0,25 <sup>ab</sup>	0,78±0,02 <sup>a</sup>	0,07±0,05 <sup>e</sup>	0,10±0,02 <sup>e</sup>
	4	2:1	34,15±0,09 <sup>ab</sup>	0,91±0,02 <sup>cd</sup>	0,07±0,06 <sup>e</sup>	0,14±0,24 <sup>e</sup>
	2	4:1	35,91±0,14 <sup>d</sup>	0,79±0,01 <sup>a</sup>	0,07±0,04 <sup>e</sup>	0,11±0,05 <sup>e</sup>
	3	4:1	34,24±0,13 <sup>c</sup>	0,80±0,03 <sup>a</sup>	0,07±0,02 <sup>e</sup>	0,13±0,20 <sup>e</sup>
	4	4:1	34,24±0,70 <sup>bc</sup>	0,89±0,05 <sup>bc</sup>	0,07±0,01 <sup>e</sup>	0,15±0,08 <sup>e</sup>

Media ± DE. Los valores con diferentes letras superíndice en una columna son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Para una dada  $R_{CP:CG}$  (entre 1:1 y 4:1), se observó que el aumento del pH del medio acuoso produjo una disminución significativa de los valores de  $\pi_f$  de los sistemas mixtos CP:i-CG. Los valores de  $R_{CP:CG}$  2:1 a pH 3 y  $R_{CP:CG}$  4:1 a pH 4 tendieron a estar cercar de los valores de  $\pi_f$  obtenidos para CP.

Además, se encontró una correlación directa entre los valores de  $\pi_f$  y de hidrofobicidad superficial ( $R=0,7734$ ), sugiriendo que la formación de complejos electrostáticos solubles entre CP y i-CG (fundamentalmente a pH entre 2 y 3) podrían ser responsables de una mayor actividad superficial de la proteína en el sistema mixto formado con i-CG. Un fenómeno similar fue reportado para sistemas mixtos conformados por proteínas de haba (globulina 11 S) y i-CG (Galazka y col., 2000).

Con respecto a CP pura, se observó que la presencia de i-CG produjo algunas modificaciones del valor de  $k_{dif}$  dependiendo del pH y de la  $R_{CP:CG}$ .

En general, la presencia de i-CG causó una leve disminución en la velocidad de difusión de la proteína desde el seno de solución hacia la interfase aire-agua. Además, cuando la  $R_{CP:CG}$  fue de 2:1 y 4:1 se observó que el aumento del pH de 2 a 4 provocó un aumento de la constante de difusión.

Por otro lado, la presencia de i-CG produjo una disminución de las constantes de penetración y reordenamiento de la proteína adsorbida en la interfase aire-agua. Esta reducción en el comportamiento de penetración y reordenamiento fue mucho más notoria para los sistemas mixtos formados a  $R_{CP:CG}$  2:1 y 4:1. Estos resultados podrían comprenderse considerando un fenómeno de impedimento en la penetración y reordenamiento interfasial de la proteína como una consecuencia de su complejación con i-CG.

En condiciones de complejación, los segmentos hidrofóbicos de la proteína capaces de penetrar y reordenarse a nivel de la interfase aire-agua podrían estar menos disponibles para su interacción debido al ensamblaje electrostático entre la proteína y el polisacárido que promovería una barrera para la ejecución de estas etapas de adsorción interfasial, fundamentalmente en comparación con la proteína sin agregado de la carragenina.

#### **IV.3.3.2. Propiedades reológicas de los sistemas mixtos CP:i-CG**

Las propiedades reológicas de los sistemas CP:i-CG se muestran en la Tabla IV.17.

Los valores de E y E' de las películas adsorbidas de los sistemas mixtos CP:i-CG fueron similares y mayores que los valores de E'' a los diferentes valores de pH y R<sub>CP:CG</sub> evaluados, sugiriendo la predominancia de un carácter elástico.

**Tabla IV.17.** Efecto del pH y la concentración relativa de biopolímeros (R<sub>CP:CG</sub>) sobre el módulo dilatacional superficial (E), la componente elástica (E'), la componente viscosa (E'') y la tangente del ángulo de fase ( $\delta$ ) correspondientes a las películas de proteínas de HM y de los sistemas mixtos CP:i-CG adsorbidas sobre la interfase aire – agua.

	pH	R <sub>CP:CG</sub>	E (mN/m)	E' (mN/m)	E'' (mN/m)	Tan $\delta$
CP	2		35,6±0,3 <sup>a</sup>	34,7±0,2 <sup>a</sup>	5,8±0,2 <sup>a</sup>	0,17±0,00 <sup>b</sup>
	3		36,2±0,2 <sup>a</sup>	35,5±0,2 <sup>b</sup>	7,0±0,1 <sup>b</sup>	0,20±0,01 <sup>d</sup>
	4		47,5±0,5 <sup>d</sup>	47,0±0,3 <sup>b</sup>	7,4±0,4 <sup>b</sup>	0,16±0,01 <sup>a</sup>
CP:i-CG	2	1:1	47,3±0,2 <sup>d</sup>	46,5±0,2 <sup>d</sup>	8,8±0,4 <sup>d</sup>	0,19±0,01 <sup>cd</sup>
	3	1:1	56,7±0,2 <sup>g</sup>	55,6±0,3 <sup>f</sup>	11,1±0,2 <sup>e</sup>	0,20±0,01 <sup>de</sup>
	4	1:1	64,9±1,9 <sup>h</sup>	61,9±1,3 <sup>g</sup>	16,0±0,2 <sup>h</sup>	0,26±0,01 <sup>g</sup>
	2	2:1	43,0±0,9 <sup>c</sup>	42,0±0,7 <sup>c</sup>	8,9±0,3 <sup>d</sup>	0,22±0,02 <sup>e</sup>
	3	2:1	39,6±0,3 <sup>b</sup>	38,6±1,0 <sup>b</sup>	6,3±0,1 <sup>a</sup>	0,16±0,02 <sup>ab</sup>
	4	2:1	50,3±0,5 <sup>e</sup>	51,0±1,7 <sup>e</sup>	13,4±0,4 <sup>f</sup>	0,26±0,01 <sup>g</sup>
	2	4:1	40,8±0,5 <sup>b</sup>	40,1±0,5 <sup>b</sup>	7,3±0,3 <sup>b</sup>	0,18±0,01 <sup>c</sup>
	3	4:1	52,99±1,0 <sup>f</sup>	51,6±1,1 <sup>e</sup>	8,4±0,3 <sup>c</sup>	0,16±0,01 <sup>ab</sup>
	4	4:1	65,7±1,1 <sup>h</sup>	64,0±1,7 <sup>h</sup>	14,8±0,3 <sup>g</sup>	0,23±0,00 <sup>f</sup>

Media  $\pm$  DE. Los valores con diferentes letras superíndice en una columna son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

La presencia de i-CG en los sistemas mixtos produjo un aumento de los valores de E y E'. Los mayores valores de estos parámetros fueron obtenidos a una R<sub>CP:CG</sub> de 1:1 y la magnitud de estos aumentó con el incremento del pH del medio acuoso. Si bien los mayores valores de E y E' fueron obtenidas a pH 4, a este pH también se registró un aumento del valor de tan  $\delta$ , sugiriendo una disminución en el grado de estructura de la película.

### IV.3.3.3. Propiedades espumantes de sistemas mixtos CP-i-CG

Lo resultados de las propiedades espumantes de los sistemas mixtos CP:i-CG y CP se muestran en la Tabla IV.18. Cabe destacar que las soluciones correspondientes de i-CG puras no formaron espuma.

**Tabla IV.18.** Efecto del pH y de la concentración relativa de biopolímeros ( $R_{CP:CG}$ ), sobre las propiedades espumantes de CP y de los sistemas mixtos CP:i-CG.

	pH	$R_{CP:CG}$	Expansión (%)	$V_0$ de drenado (mL/s)	$t_{1/2}$ (s)
CP	2		475 ±5,0 <sup>b</sup>	0,3±0,0 <sup>a</sup>	3,6±0,6 <sup>a</sup>
	3		428±2,5 <sup>a</sup>	2,3±0,2 <sup>b</sup>	6,0±0,6 <sup>a</sup>
	4		425±5,0 <sup>a</sup>	56,2±1,8 <sup>c</sup>	2,5±0,6 <sup>a</sup>
CP:i-CG	2	2:1	866±4,0 <sup>f</sup>	nd	nd
	3	2:1	869±5,0 <sup>f</sup>	nd	nd
	4	2:1	609±0,6 <sup>c</sup>	0,1±0,0 <sup>a</sup>	203±8,5 <sup>e</sup>
	2	4:1	802±4,0 <sup>e</sup>	0,3±0,1 <sup>a</sup>	55±5,5 <sup>c</sup>
	3	4:1	801±5,0 <sup>e</sup>	0,3±0,0 <sup>a</sup>	78±7,5 <sup>d</sup>
	4	4:1	755±6,5 <sup>d</sup>	0,8±0,2 <sup>a</sup>	39±1,0 <sup>b</sup>

Media ± DE. Los valores con diferentes letras superíndice en una columna son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).  $t_{1/2}$ : tiempo de vida medio de la espuma. Nd: No detectado.

Los sistemas mixtos CP:i-CG con una  $R_{CP:CG}$  de 1:1 no formaron espumas por el método de burbujeo. Probablemente la elevada viscosidad que presentaron estos sistemas dificultó la generación de espumas por insuflado de gas. Martínez y col., (2005) reportaron que la disminución de la capacidad espumante de una proteína en presencia de un polisacárido puede ser atribuido al aumento de la viscosidad de las soluciones impidiendo la incorporación de aire a la espuma. Además, se ha informado este comportamiento para sistemas de proteínas de girasol en presencia de goma xantana, evaluados a concentraciones de proteína: polisacárido de 6:1 y para proteína de soja con k-CG (los sistemas se formaron a una concentración de proteína/polisacárido de 1:2, respectivamente). (Warnakulasuriya y Nickerson 2018).

Se observó que el agregado de i-CG a  $R_{CP:CG}$  de 2:1 y 4:1 produjo un aumento de la formación y estabilidad de espumas respecto a CP, probablemente mediado por la formación de los complejos electrostáticos solubles.

En términos de formación de la espuma (expansión), un valor de pH comprendido entre 2 y 3 fue óptimo para la formación de espumas de los sistemas mixtos CP:i-CG. A una  $R_{CP:CG}$  de 2:1 se observó que el aumento del pH de 3 a 4 causó una disminución de la expansión. Estos resultados pueden explicarse por medio de una menor formación de complejos electrostáticos solubles de elevada actividad superficial, tal como fue mencionado con anterioridad. Sin embargo, Xu y col., (2020) reportaron que los complejos proteína-polisacárido formados a diferentes pH y concentraciones relativas, mostraron similar capacidad de formación de espuma, pero una diferente estabilidad de espuma.

La mayor capacidad de formar y estabilizar espumas fue alcanzada por los sistemas mixtos elaborados a pH 2-3 a una  $R_{CP:CG}$  de 2:1. Incluso se destaca que la estabilidad de las espumas medida a través de la velocidad de drenado y el  $t_{1/2}$  no pudo ser determinada debido a que no se observó drenaje de líquido durante el tiempo de ensayo (400 min) y la estabilidad de estas espumas perduró por semanas.

Schmitt y col., (2005) han demostrado que los complejos electrostáticos pueden formar una gruesa capa hidratada sobre la superficie de la burbuja, más eficaz que la formada por una proteína pura para evitar fenómenos de desestabilización fundamentalmente debido a la desproporción. Además, Jarpa-Parra y col., (2016) han reportado que los complejos electrostáticos formados por proteínas de lenteja y polisacáridos (xántica, guar y pectina) han demostrado fuertes sinergismos en la proximidad del pI de las proteínas, favoreciendo la formación de películas interfaciales más gruesas debido a una mayor cohesión de los agregados, mejorando así las propiedades de estabilización de la espuma.

Además, la expansión de las espumas formadas a partir de los sistemas mixtos CP:i-CG presentó una correlación positiva con la hidrofobicidad ( $R:0,7315$ ).

Para los sistemas mixtos formados a una  $R_{CP:CG}$  de 4:1 se observó una gran dependencia de la estabilidad de las espumas con el pH del medio acuoso.

En el rango de pH evaluado, la mayor estabilidad en términos del  $t_{1/2}$  fue encontrada a pH 3 (cerca al pI). Algunos reportes científicos informaron una mayor estabilidad de la espuma en el entorno del pI. Al ajustar el pH de la solución cerca del pI, las cadenas de proteínas tienden a agregarse debido a la mínima repulsión intermolecular, haciendo las películas más cohesivas (Jarpa-Parra y col., 2016; Xu y col., 2020).

Por otra parte, respecto a los valores obtenidos para la  $R_{CP:iCG}$  4:1, la menor estabilidad de las espumas podría ser explicada considerando una menor viscosidad de la fase acuosa continua, la cual es determinada por la menor concentración de i-CG en el sistema mixto. Está bien documentado en la literatura que la concentración relativa de biopolímeros modula la viscosidad de la fase acuosa continua (Dickinson 2010; Murray 2020; Rodríguez Patino y Pilosof 2011; Zhan y col., 2020), controlando la formación y estabilidad de una espuma proteica (Zhu y col., 2020).

Por otra parte, se observó que el parámetro de  $t_{1/2}$  de las espumas formadas a partir de los sistemas mixtos CP:i-CG presentaron una correlación negativa con el potencial  $\zeta$  de los mismos ( $R:-0,8785$ ), indicando que un aumento de la carga neta de los complejos electrostáticos produce una reducción de las propiedades espumantes. También el  $t_{1/2}$  mostró una correlación positiva con el tamaño de partícula ( $R: 0,6938$ ).

Estos resultados indicarían que la formación y estabilidad de las espumas generadas con los sistemas mixtos CP:i-CG involucran condiciones del medio acuoso que promueven un balance entre el tamaño de partícula y la hidrofobicidad superficial que permita a las proteínas de HM promover sus propiedades espumantes cuando se encuentran complejadas con i-CG.

A partir de estas evidencias puede concluirse que las interacciones biopoliméricas que dan lugar a la formación de complejos solubles contribuyen a la formación y estabilidad de espumas, tal como fue reportado por van den Berg y col., (2015).

#### IV.3.3.4. Propiedades interfasiales de los sistemas mixtos CP:I-CG

Las propiedades interfasiales de los sistemas CP:I-CG se muestran en la Tabla IV.19.

**Tabla IV.19.** Efecto del pH y la concentración relativa de biopolímeros ( $R_{CP:CG}$ ) sobre la presión superficial final ( $\pi_f$ ), la constante de velocidad de difusión ( $k_{dif}$ ), penetración ( $k_p$ ), reordenamiento ( $k_r$ ) de las películas de proteínas de HM y de los sistemas mixtos CP:I-CG adsorbidas sobre la interfase aire – agua.

	pH	$R_{(CP:CG)}$	$\pi_f$ (mN/m)	$k_{dif}$ (mN/m.s <sup>-0.5</sup> )	$k_p$ (10 <sup>-4</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_r$ (10 <sup>-4</sup> s <sup>-1</sup> )
CP	2		34,12 ± 0,58 <sup>bcd</sup>	1,01±0,00 <sup>f</sup>	2,59±0,00 <sup>a</sup>	4,75±1,70 <sup>a</sup>
	3		33,43±0,14 <sup>a</sup>	0,86±0,02 <sup>b</sup>	2,55±0,00 <sup>b</sup>	3,67±0,10 <sup>b</sup>
	4		34,07±0,55 <sup>bcd</sup>	0,95±0,02 <sup>de</sup>	2,52±0,00 <sup>c</sup>	3,58±0,35 <sup>c</sup>
CP:I-CG	2	1:1	34,80±0,14 <sup>e</sup>	0,88±0,03 <sup>be</sup>	0,07±0,02 <sup>de</sup>	0,14±0,13 <sup>de</sup>
	3	1:1	33,56±0,23 <sup>ab</sup>	0,92±0,02 <sup>cd</sup>	0,07±0,01 <sup>d</sup>	0,16±0,20 <sup>d</sup>
	4	1:1	33,90±0,24 <sup>ab</sup>	1,00±0,03 <sup>f</sup>	0,07±0,03 <sup>de</sup>	0,12±0,13 <sup>e</sup>
	2	2:1	34,58±0,14 <sup>cde</sup>	0,82±0,01 <sup>a</sup>	0,07±0,05 <sup>de</sup>	0,14±0,05 <sup>de</sup>
	3	2:1	34,04±0,02 <sup>bc</sup>	0,82±0,02 <sup>a</sup>	0,07±0,01 <sup>de</sup>	0,12±0,00 <sup>e</sup>
	4	2:1	33,66±0,12 <sup>ab</sup>	0,96±0,05 <sup>e</sup>	0,07±0,07 <sup>de</sup>	0,13±0,04 <sup>de</sup>
	2	4:1	35,98±0,38 <sup>f</sup>	0,96±0,01 <sup>e</sup>	0,07±0,08 <sup>e</sup>	0,13±0,00 <sup>de</sup>
	3	4:1	34,66±0,78 <sup>de</sup>	0,89±0,02 <sup>bc</sup>	0,07±0,01 <sup>de</sup>	0,12±0,01 <sup>e</sup>
	4	4:1	33,88±0,07 <sup>ab</sup>	0,95±0,01 <sup>de</sup>	0,07±0,02 <sup>de</sup>	0,13±0,11 <sup>de</sup>

Media ± DE. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

La presencia de I-CG produjo modificaciones en el valor de  $\pi_f$  con respecto a CP pura dependiendo del pH y de la  $R_{CP:CG}$  considerada. Se observó un aumento significativo en el valor de  $\pi_f$  a pH 2 para todas las  $R_{CP:CG}$  ensayadas y especialmente para una  $R_{CP:CG}$  de 4:1.

Para una dada  $R_{CP:CG}$  (entre 1:1 y 4:1), se observó que el aumento del pH del medio acuoso a 4 produjo también una disminución significativa de los valores

de  $\pi_f$  de los sistemas mixtos CP:I-CG. Además, en general a pH 3 y 4 los valores de  $\pi_f$  no fueron diferentes a los obtenidos para CP, con excepción de R<sub>CP:CG</sub> 4:1 a pH 3.

Además, se observó una correlación positiva entre los valores de  $\pi_f$  y hidrofobicidad (R=0,8168), sugiriendo que una mayor hidrofobicidad superficial de las moléculas facilita una rápida adsorción a la interfase (Tamm & Drusch, 2017). Similares resultados fueron observados en sistemas mixtos de proteínas  $\beta$ -lactoglobulina y pectina a una relación de proteína/polisacárido de 2:1 (Wijaya y col., 2017).

Asimismo, se observó una correlación positiva entre los valores de  $\pi_f$  y el potencial  $\zeta$  (R=0,8061), indicando que una mayor carga neta negativa de los complejos electrostáticos solubles CP:I-CG podría ejercer un efecto negativo en su adsorción y reacomodamiento estructural en la interfase aire-agua debido a la fuerte repulsión electrostática, lo que también reduciría la estabilidad de las espumas (Dombrowski y col., 2016).

La presencia de I-CG produjo modificaciones del valor de  $k_{dif}$ , con respecto a CP pura dependiendo del pH y de la R<sub>CP:CG</sub>. La presencia de I-CG causó una leve disminución en la velocidad de difusión de la proteína desde el seno de solución hacia la interfase aire-agua a pH 2. Los menores valores se obtuvieron a R<sub>CP:CG</sub> de 1:1 y 2:1 y pH 2. Bajo estas condiciones los efectos combinados de formación de complejos electrostáticos solubles, su tamaño, carga neta (potencial  $\zeta$ ), hidrofobicidad superficial y viscosidad de la fase acuosa continua podrían retardar la etapa de difusión de la proteína (Zinoviadou y col., 2012).

A una dada R<sub>CP:CG</sub> se observó que el aumento del pH provocó un aumento de  $k_{dif}$ , con excepción de la R<sub>CP:CG</sub> 4:1. Cabe destacar que en esta condición los complejos electrostáticos estarían menos cargados en comparación con aquellos formados en las demás condiciones de R<sub>CP:CG</sub>.

Por otro lado, con respecto a CP pura, la presencia de I-CG produjo una disminución de las constantes de penetración y reordenamiento de la proteína adsorbida sobre la interfase aire-agua. Este comportamiento fue anteriormente explicado considerando un fenómeno de impedimento en la penetración y

reordenamiento interfasial de la proteína como consecuencia de su complejación con I-CG y de la existencia de una barrera electrostática para el desarrollo de estas etapas, debido a que los complejos electrostáticos adsorbidos podrían retardar la exposición de segmentos hidrofóbicos de la proteína a nivel de la interfase aire-agua, enlenteciendo la penetración y reordenamiento. Similar fenómeno fue observado en proteínas de  $\beta$ -lactoglobulina y I-CG (Baeza y col., 2006).

#### IV.3.3.5. Propiedades reológicas de los sistemas mixtos CP:I-CG

Las propiedades reológicas de los sistema mixtos CP:I-CG se muestran en la Tabla IV.20.

**Tabla IV.20.** Efecto del pH y la concentración relativa de biopolímeros ( $R_{CP:CG}$ ) sobre el módulo dilatacional superficial (E), la componente elástica (E'), la componente viscosa (E'') y la tangente del ángulo de fase ( $\delta$ ) correspondientes a las películas de proteínas de HM y de los sistemas mixtos CP:I-CG adsorbidas sobre la interfase aire – agua.

	pH	$R_{(CP:CG)}$	E (mN/m)	E' (mN/m)	E'' (mN/m)	Tan $\delta$
CP	2		35,6±0,3 <sup>a</sup>	34,7±0,2 <sup>a</sup>	5,8±0,2 <sup>a</sup>	0,16±0,00 <sup>b</sup>
	3		36,2±0,2 <sup>ab</sup>	35,5±0,2 <sup>a</sup>	7,0±0,1 <sup>b</sup>	0,14±0,01 <sup>a</sup>
	4		47,5±0,5 <sup>d</sup>	47,0±0,4 <sup>d</sup>	7,4±0,4 <sup>c</sup>	0,16±0,01 <sup>b</sup>
CP:I-CG	2	1:1	56,7±0,9 <sup>h</sup>	55,2±0,3 <sup>g</sup>	12,3±0,4 <sup>g</sup>	0,22±0,00 <sup>de</sup>
	3	1:1	56,0±1,6 <sup>gh</sup>	54,8±0,5 <sup>g</sup>	11,7±0,2 <sup>e</sup>	0,21±0,01 <sup>d</sup>
	4	1:1	57,3±0,4 <sup>h</sup>	56,5±0,4 <sup>h</sup>	11,8±0,0 <sup>ef</sup>	0,21±0,01 <sup>d</sup>
	2	2:1	49,6±2,2 <sup>e</sup>	47,0±0,9 <sup>d</sup>	13,4±0,4 <sup>i</sup>	0,28±0,01 <sup>h</sup>
	3	2:1	46,3±1,3 <sup>cd</sup>	44,7±0,7 <sup>c</sup>	10,8±0,1 <sup>e</sup>	0,23±0,01 <sup>f</sup>
	4	2:1	53,4±0,4 <sup>f</sup>	51,8±0,3 <sup>e</sup>	12,9±0,2 <sup>h</sup>	0,25±0,01 <sup>g</sup>
	2	4:1	37,3±0,6 <sup>b</sup>	36,2±0,5 <sup>b</sup>	8,6±0,1 <sup>d</sup>	0,23±0,01 <sup>f</sup>
	3	4:1	45,2±0,4 <sup>c</sup>	44,3±0,5 <sup>c</sup>	8,7±0,1 <sup>d</sup>	0,19±0,00 <sup>c</sup>
	4	4:1	55,0±0,7 <sup>g</sup>	53,4±0,7 <sup>f</sup>	12,2±0,5 <sup>fg</sup>	0,23±0,01 <sup>ef</sup>

Media  $\pm$  DE. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

A los niveles de pH y  $R_{CP:CG}$  evaluados, los valores de E y E' de las películas adsorbidas de los sistemas mixtos CP:I-CG fueron similares y mayores

que los de E", sugiriendo la prevalencia de un carácter sólido. El mismo comportamiento fue evidenciado para los sistemas mixtos CP:i-CG.

La presencia de I-CG provocó un aumento significativo de los valores de E y E' con respecto a CP. Los mayores valores de estos parámetros fueron obtenidos a una R<sub>CP:CG</sub> 1:1. A esta R<sub>CP:CG</sub> el incremento gradual del pH del medio acuoso no tuvo efectos. Sin embargo, para las demás R<sub>CP:CG</sub> evaluadas se observó que el aumento del pH del medio acuoso de 2 a 4 promovió un aumento en los valores de E y E', indicando un incremento de la elasticidad de las películas adsorbidas.

#### IV.3.3.6. Propiedades espumantes de los sistemas mixtos CP:I-CG

Las propiedades espumantes de los sistema mixtos CP:I-CG se muestran en la Tabla IV.21.

**Tabla IV.21.** Efecto del pH y la concentración relativa de biopolímeros (R<sub>CP:CG</sub>) sobre las propiedades espumantes de las proteínas de HM y de los sistemas mixtos CP:I-CG.

	pH	R <sub>(CP:CG)</sub>	Expansión (%)	V <sub>0</sub> de drenado (mL/s)	t <sub>1/2</sub> (s)
CP	2		475 ±5,0 <sup>b</sup>	0,3±0,0 <sup>a</sup>	3,6±0,6 <sup>a</sup>
	3		428±2,5 <sup>a</sup>	2,3±0,2 <sup>b</sup>	6±0,6 <sup>a</sup>
	4		425±5,0 <sup>a</sup>	56,2±1,8 <sup>c</sup>	2,5±0,5 <sup>a</sup>
CP:I-CG	2	1:1	791±1,52 <sup>d</sup>	0,1±0,0 <sup>a</sup>	350±7,0 <sup>h</sup>
	3	1:1	838±6,5 <sup>f</sup>	0,1±0,0 <sup>a</sup>	365±4,5 <sup>i</sup>
	4	1:1	547±2,0 <sup>c</sup>	0,1±0,0 <sup>a</sup>	185±8,7 <sup>g</sup>
	2	2:1	875±6,0 <sup>h</sup>	0,2±0,0 <sup>a</sup>	174±5,2 <sup>f</sup>
	3	2:1	876±7,0 <sup>h</sup>	0,2±0,1 <sup>a</sup>	132±5,5 <sup>d</sup>
	4	2:1	866±6,5 <sup>g</sup>	0,3±0,0 <sup>a</sup>	87±3,0 <sup>c</sup>
	2	4:1	879±2,5 <sup>h</sup>	0,1±0,0 <sup>a</sup>	158±3,8 <sup>e</sup>
	3	4:1	864±0,6 <sup>g</sup>	0,2±0,0 <sup>a</sup>	132±2,6 <sup>d</sup>
	4	4:1	829±0,6 <sup>e</sup>	0,4±0,1 <sup>a</sup>	60±3,0 <sup>b</sup>

Media ± DE. Los valores con diferentes letras superíndice en una fila son significativamente diferentes (p < 0,05). t<sub>1/2</sub>: tiempo de vida media de la espuma

Con respecto a CP pura, se observó un aumento de la formación y estabilidad de espumas tras el agregado de I-CG.

Los sistemas CP:I-CG formados a una  $R_{CP:CG}$  de 1:1 manifestaron un comportamiento espumante apreciable con respecto a los sistemas mixtos CP:i-CG a la misma  $R_{CP:CG}$  probablemente debido a una menor viscosidad aparente (Martínez y col., 2005; Warnakulasuriya y Nickerson 2018).

Para todas las  $R_{CP:CG}$  evaluadas y a valores de pH de 2 y 3 se observaron valores elevados de expansión. En general, la mayor capacidad espumante de los sistemas mixtos CP:I-CG fue registrada a una  $R_{CP:CG}$  de 2:1. El mismo comportamiento fue observado para los sistemas mixtos CP:i-CG.

La estabilidad de las espumas evaluada sobre la base de la velocidad inicial de drenado no registró cambios en el rango de las condiciones de  $R_{CP:CG}$  y pH evaluados. No obstante, la magnitud del parámetro  $t_{1/2}$  dependió de ambas variables. Se observó que para todos los niveles de  $R_{CP:CG}$ , el aumento del pH del medio acuoso causó una disminución de los valores de  $t_{1/2}$ . Los mayores valores fueron encontrados a  $R_{CP:CG}$  de 1:1 y pHs de 3 y 2. Xu y col., (2020) demostraron una menor estabilidad de las espumas de sistemas mixtos de proteínas de suero y alginato de sodio a concentraciones relativas de 4:1, debido a que los complejos tenían una carga negativa muy alta.

Además, la estabilidad de la espuma fue favorecida por el tamaño de los complejos, debido a que los sistemas I-CG mostraron una correlación directa entre el  $t_{1/2}$  y el tamaño ( $R= 0,7098$ ).

#### **IV.3.4. Comparación de las propiedades interfasiales de los sistemas mixtos CP:CG**

A fin de observar la incidencia del tipo de CG, pH del medio acuoso y de la  $R_{CP:CG}$  sobre las propiedades interfasiales de ambos tipos de sistemas mixtos, se realizó un ANOVA multifactor. Los resultados para la presión superficial se muestran en la Tabla IV.22.

**Tabla IV.22.** Análisis de Varianza para  $\pi_f$  (mNm<sup>-1</sup>) -Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:pH	20,6207	2	10,3104	58,61	<b>0,0000</b>
B:Carragenina	3,57285	1	3,57285	20,31	<b>0,0001</b>
C:R <sub>CP:CG</sub>	3,40931	2	1,70466	9,69	<b>0,0004</b>
INTERACCIONES					
AB	0,572669	2	0,286335	1,63	0,2091
AC	2,54774	4	0,636936	3,62	<b>0,0131</b>
BC	1,4956	2	0,747799	4,25	<b>0,0212</b>
RESIDUOS	7,03606	40	0,175901		
TOTAL (CORREGIDO)	39,6341	53			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

**Tabla IV.22.A** Pruebas de Múltiple Rangos para  $\pi_f$  por pH

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
4	34,13	A
3	34,1978	A
2	35,4844	B

**Tabla IV.22.B** Pruebas de Múltiple Rangos para  $\pi_f$  por tipo de carragenina

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Carragenina</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
I-CG	34,3456	A
i-CG	34,8256	B

**Tabla IV.22.C** Pruebas de Múltiple Rangos para  $\pi_f$  por R<sub>CP:CG</sub>

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>R<sub>CP:CG</sub></i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2:1	34,3109	A
1:1	34,5674	A
4:1	34,9339	B

Se encontró que el pH, el tipo de carragenina y R<sub>CP:CG</sub> fueron significativos para  $\pi_f$ . A pH 2 se observaron los mayores valores de  $\pi_f$  probablemente debido a la formación de complejos de proteínas HM-carrageninas de menor tamaño y carga y mayor hidrofobicidad superficial que a los otros pHs evaluados, que disminuyeron la tensión interfasial. Además, los sistemas con i-CG presentaron mayores valores que con I-CG y a su vez, los sistemas con R<sub>CP:CG</sub> de 4:1 presentaron mayores valores que a las otras concentraciones relativas evaluadas.

Respecto a las interacciones, el efecto del pH no dependió del tipo de carragenina, pero sí de la  $R_{CP:CG}$  y el efecto de esta relación dependió del tipo de carragenina. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que la formación de complejos solubles con polisacáridos puede afectar las propiedades de las proteínas en la interfase. Al respecto, Martínez y col., (2007) mencionaron varios factores que pueden contribuir a disminuir la  $\pi_f$ : i) la complejación disminuye la concentración de proteína libre, lo que implica que hay menos proteínas “disponibles” para llegar a la interfase aire-agua, ii) el complejo se difunde más lentamente, posiblemente al mayor tamaño del biopolímero iii) la unión de la proteína a la interfase aire-agua puede verse obstaculizada por la presencia del polisacárido circundante.

La influencia de i-CG y l-CG en la adsorción interfasial de las proteínas de HM fue diferente según las condiciones ensayadas, particularmente teniendo en cuenta la  $R_{CP:CG}$ . Esto puede atribuirse a una fuerza disímil de las interacciones de los complejos en la interfase aire/ agua y la fase acuosa, que depende de la atracción electrostática entre los grupos sulfatados aniónicos en las moléculas de carragenina y los residuos de aminoácidos catiónicos en las moléculas de proteína (Seta y col., 2013) y la proporción de ambos biopolímeros.

Los sistemas CP:i-CG mostraron una correlación directa entre  $\pi_f$  y la hidrofobicidad superficial, lo que indica que la proteína se encuentra desplegando y exponiendo sus grupos hidrofóbicos en diferente extensión según las condiciones del medio. En cambio, los sistemas l-CG mostraron una correlación directa entre la  $\pi_f$  y el potencial  $\zeta$ , probablemente porque la fuerte interacción electrostática con la proteína minimiza la exposición de grupos hidrofóbicos superficiales y las condiciones del medio impactan más fuertemente sobre la carga del complejo. Conjuntamente los dos sistemas mostraron una correlación directa de la  $\pi_f$  vs la hidrofobicidad superficial (R: 0,6381).

En la Tabla IV.23 se muestran los resultados del ANOVA multifactor para  $k_{dif}$ . Al igual en el caso anterior, los tres factores fueron significativos, como también las interacciones de la  $R_{CP:CG}$  con el pH y el tipo de carragenina.

**Tabla IV.23.** Análisis de Varianza para Difusión - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:pH	0,0790006	2	0,0395003	31,98	<b>0,0000</b>
B:Carragenina	0,0368414	1	0,0368414	29,83	<b>0,0000</b>
C:R <sub>CP:CG</sub>	0,0415282	2	0,0207641	16,81	<b>0,0000</b>
INTERACCIONES					
AB	0,00185876	2	0,000929382	0,75	0,4777
AC	0,020741	4	0,00518525	4,20	<b>0,0062</b>
BC	0,0208488	2	0,0104244	8,44	<b>0,0009</b>
RESIDUOS	0,0494015	40	0,00123504		
TOTAL (CORREGIDO)	0,247748	53			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

**Tabla IV.23.A** Pruebas de Múltiple Rangos para la difusión por pH

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
3	0,854444	A
2	0,858704	A
4	0,937778	B

**Tabla IV.23.B** Pruebas de Múltiple Rangos para la difusión por Carragenina

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Carragenina</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
i-CG	0,857407	A
I-CG	0,909877	B

**Tabla IV.23.C** Pruebas de Múltiple Rangos para la difusión por R<sub>CP:CG</sub>

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>R<sub>CP:CG</sub></i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2:1	0,850811	A
4:1	0,881111	B
1:1	0,919004	C

La  $k_{dif}$  fue mayor a pH 4, para I-CG y para los sistemas con mayor proporción relativas de CG (R<sub>CP:CG</sub> de 1:1). Esto indicaría que una mayor densidad de carga facilitarían la difusión a la interfase. Asimismo, interacciones de la R<sub>CP:CG</sub> con el pH y el tipo de carragenina se pueden explicar considerando que todas ellas intervienen directamente sobre la carga de los complejos.

En la Tabla IV.24 se muestran los resultados del ANOVA multifactor para  $k_p$ . En este caso los tres factores y sus interacciones fueron significativos.

**Tabla IV.24.** Análisis de Varianza para Penetración - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:pH	1,89882E-8	2	9,49408E-9	9,32	<b>0,0005</b>
B:Carragenina	4,2168E-8	1	4,2168E-8	41,39	<b>0,0000</b>
C:R <sub>CP:CG</sub>	8,08939E-8	2	4,0447E-8	39,70	<b>0,0000</b>
INTERACCIONES					
AB	2,12315E-8	2	1,06157E-8	10,42	<b>0,0002</b>
AC	4,02887E-8	4	1,00722E-8	9,89	<b>0,0000</b>
BC	8,32181E-8	2	4,1609E-8	40,84	<b>0,0000</b>
RESIDUOS	4,07558E-8	40	1,01889E-9		
TOTAL	3,23053E-7	53			
(CORREGIDO)					

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

**Tabla IV.24.A** Pruebas de Múltiple Rangos para kp por pH

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
3	-4,84E-05	A
2	-4,60E-05	A
4	-7,44E-06	B

**Tabla IV.24.B** Pruebas de Múltiple Rangos para kp por Carragenina

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Carragenina</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
i-CG	-6,20E-05	A
I-CG	-5,91E-06	B

**Tabla IV.24.C** Pruebas de Múltiple Rangos para kp por R<sub>CP:CG</sub>

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>R<sub>CP:CG</sub></i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1:1	-8,83E-05	A
4:1	-7,31E-06	B
2:1	-6,33E-06	B

La kp fue menor a pH 4, para I-CG y para los sistemas con mayor proporción relativa de proteínas (R<sub>CP:CG</sub> de 2:1 y 4:1). Esto indicaría que una mayor densidad de carga dificultaría la penetración en la interfase. Asimismo, las interacciones de la R<sub>CP:CG</sub> con el pH y el tipo de carragenina se pueden explicar considerando que todas ellas intervienen directamente sobre la carga de los complejos y que el pH también afecta la carga de las CG, particularmente de I-CG.

En la Tabla IV.25 se muestran los resultados del ANOVA multifactor para kr. En este caso los tres factores y sus interacciones fueron significativos, al igual que para kp.

La kr fue menor a pH 4, para I-CG y para los sistemas con mayor proporción relativa de proteínas (R<sub>CP:CG</sub> de 2:1 y 4:1). Esto indicaría que una mayor densidad de carga dificultaría el reordenamiento en la interfase. Asimismo, las interacciones de la R<sub>CP:CG</sub> con el pH y el tipo de carragenina se pueden explicar considerando que todas ellas intervienen directamente sobre la carga de los complejos y que el pH también afecta la carga de las CG, particularmente de I-CG. Una mayor densidad de carga aumentaría las repulsiones electrostáticas dificultando la formación de la película interfásial.

**Tabla IV.25.** Análisis de Varianza para Reordenamiento - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:pH	3,51973E-8	2	1,75986E-8	9,14	<b>0,0005</b>
B:Carragenina	7,66943E-8	1	7,66943E-8	39,82	<b>0,0000</b>
C:R <sub>CP:CG</sub>	1,49262E-7	2	7,46309E-8	38,75	<b>0,0000</b>
INTERACCIONES					
AB	3,83214E-8	2	1,91607E-8	9,95	<b>0,0003</b>
AC	7,72004E-8	4	1,93001E-8	10,02	<b>0,0000</b>
BC	1,51173E-7	2	7,55864E-8	39,25	<b>0,0000</b>
RESIDUOS	7,70358E-8	40	1,9259E-9		
TOTAL (CORREGIDO)	6,04984E-7	53			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

**Tabla IV.25.A** Pruebas de Múltiple Rangos para kr por pH  
Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
3	-6,81E-05	A
2	-6,61E-05	A
4	-1,29E-05	B

**Tabla IV.25.B** Pruebas de Múltiple Rangos para kr por Carragenina  
Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Carragenina</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
i-CG	-8,69E-05	A
I-CG	-1,12E-05	B

**Tabla IV.25.C** Pruebas de Múltiple Rangos para  $k_r$  por  $R_{CP:CG}$   
Método: 95,0 porcentaje LSD

$R_{CP:CG}$	Media LS	Grupos Homogéneos
1:1	-1,23E-04	A
4:1	-1,30E-05	B
2:1	-1,13E-05	B

#### IV.3.4.1. Comparación de las propiedades reológicas de los sistemas mixtos CP:CG

A fin de observar la incidencia del tipo de CG, pH del medio acuoso y de la  $R_{CP:CG}$  sobre las propiedades reológicas de ambos tipos de sistemas mixtos, se realizó un ANOVA multifactor.

Los resultados se muestran en las Tablas VI.26 para E, Tablas IV. 27 para E', Tablas IV.28 para E'' y Tablas IV.29 para  $\tan \delta$ .

**Tabla IV.26.** Análisis de Varianza para Modulo dilatacional-Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:pH	1837,89	2	918,945	369,95	<b>0,0000</b>
B:Carragenina	5,33061	1	5,33061	2,15	0,1482
C: $R_{CP:CG}$	1012,77	2	506,383	203,86	<b>0,0000</b>
INTERACCIONES					
AB	233,313	2	116,657	46,96	<b>0,0000</b>
AC	663,108	4	165,777	66,74	<b>0,0000</b>
BC	561,037	2	280,518	112,93	<b>0,0000</b>
RESIDUOS	149,037	60	2,48395		
TOTAL	4704,43	73			
(CORREGIDO)					

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

**Tabla IV.26.A** Pruebas de Múltiple Rangos para E por pH  
Método: 95,0 porcentaje LSD

pH	Media LS	Grupos Homogéneos
2	45,6905	A
3	49,5041	B
4	57,8001	C

**Tabla IV.26.B** Pruebas de Múltiple Rangos para E por Carragenina  
Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Carragenina</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
I-CG	50,7236	A
i-CG	51,2729	A

**Tabla IV.26.C** Pruebas de Múltiple Rangos para E por R<sub>CP:CG</sub>  
Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>R<sub>CP:CG</sub></i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2:1	47,0513	A
4:1	49,4589	B
1:1	56,4846	C

**Tabla IV.27.** Análisis de Varianza para Componente Real- Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:pH	1803,04	2	901,518	527,44	<b>0,0000</b>
B:Carragenina	12,4543	1	12,4543	7,29	<b>0,0090</b>
C:R <sub>CP:CG</sub>	964,735	2	482,368	282,22	<b>0,0000</b>
INTERACCIONES					
AB	194,414	2	97,207	56,87	<b>0,0000</b>
AC	577,671	4	144,418	84,49	<b>0,0000</b>
BC	443,114	2	221,557	129,62	<b>0,0000</b>
RESIDUOS	102,553	60	1,70922		
TOTAL (CORREGIDO)	4359,46	73			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

**Tabla IV.27.A** Pruebas de Múltiple Rangos para E' por pH

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2	44,4192	A
3	48,3348	B
4	56,4486	C

**Tabla IV.27.B** Pruebas de Múltiple Rangos para E' por Carragenina

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Carragenina</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
I-CG	49,3144	A
i-CG	50,154	B

**Tabla IV.27.C** Pruebas de Múltiple Rangos para E' por R<sub>CP:CG</sub>

Método: 95,0 porcentaje LSD		
R <sub>CP:CG</sub>	Media LS	Grupos Homogéneos
2:1	45,8796	A
4:1	48,2349	B
1:1	55,0881	C

**Tabla IV.28.** Análisis de Varianza para Componente Imaginario (E'') Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:pH	243,565	2	121,783	584,78	<b>0,0000</b>
B:Carragenina	10,4476	1	10,4476	50,17	<b>0,0000</b>
C:R <sub>CP:CG</sub>	46,2704	2	23,1352	111,09	<b>0,0000</b>
INTERACCIONES					
AB	97,7081	2	48,8541	234,59	<b>0,0000</b>
AC	42,2045	4	10,5511	50,66	<b>0,0000</b>
BC	39,4941	2	19,747	94,82	<b>0,0000</b>
RESIDUOS	12,4953	60	0,208255		
TOTAL	496,173	73			
(CORREGIDO)					

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

**Tabla IV.28.A** Pruebas de Múltiple Rangos para E'' por pH

Método: 95,0 porcentaje LSD		
pH	Media LS	Grupos Homogéneos
3	9,50117	A
2	9,84835	B
4	13,5231	C

**Tabla IV.28.B** Pruebas de Múltiple Rangos para E'' por Carragenina

Método: 95,0 porcentaje LSD		
Carragenina	Media LS	Grupos Homogéneos
i-CG	10,5731	A
I-CG	11,342	B

**Tabla IV.28.C** Pruebas de Múltiple Rangos para E'' por R<sub>CP:CG</sub>

Método: 95,0 porcentaje LSD		
R <sub>CP:CG</sub>	Media LS	Grupos Homogéneos
4:1	9,97149	A
2:1	10,9371	B
1:1	11,964	C

El pH y la  $R_{CP:CG}$  tuvieron efectos significativos sobre E. Mientras que el pH, el tipo de carragenina y la  $R_{CP:CG}$  fueron significativos sobre los parámetros reológicos E', E'' y  $\tan \delta$ . Los parámetros E, E', E'' y  $\tan \delta$  fueron afectados por la interacción del pH y tipo de carragenina, pH y  $R_{CP:CG}$ , así como también por el tipo de carragenina y la  $R_{CP:CG}$ .

Los mayores valores obtenidos para el parámetro reológico E fueron a mayor pH (4) y la mayor proporción de CG ( $R_{CP:CG}$  1:1).

Para los parámetros reológicos E' y E'', los mayores valores se obtuvieron a pH 4 y mayor proporción de CG ( $R_{CP:CG}$  de 1:1). Sin embargo, E' fue mayor para los sistemas con i-CG y E'' fue mayor para los sistemas con I-CG. Esto indicaría que a pH 4,  $R_{CP:CG}$  de 1:1 con i-CG se obtuvieron las películas más elásticas.

**Tabla IV.29.** Análisis de Varianza para  $\tan \delta$  - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:pH	0,0286111	2	0,0143056	130,41	<b>0,0000</b>
B:Carragenina	0,00888264	1	0,00888264	80,97	<b>0,0000</b>
C: $R_{CP:CG}$	0,0116238	2	0,00581189	52,98	<b>0,0000</b>
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0,0195564	2	0,00977822	89,14	<b>0,0000</b>
AC	0,00443266	4	0,00110816	10,10	<b>0,0000</b>
BC	0,00371091	2	0,00185545	16,91	<b>0,0000</b>
RESIDUOS	0,00658196	60	0,000109699		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0881351	73			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

**Tabla IV.29.A** Pruebas de Múltiple Rangos para  $\tan \delta$  por pH  
Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
3	0,191439	A
2	0,218521	B
4	0,23987	C

**Tabla IV.29.B** Pruebas de Múltiple Rangos para  $\tan \delta$  por tipo de Carragenina  
Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Carragenina</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
i-CG	0,205399	A
I-CG	0,227821	B

**Tabla IV.29.C** Pruebas de Múltiple Rangos para tan  $\delta$  por R<sub>CP:CG</sub>  
Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>R<sub>CP:CG</sub></i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
4:1	0,203223	A
1:1	0,213472	B
2:1	0,233135	C

Con respecto a tan  $\delta$ , el ANOVA multifactorial se muestra en la Tabla IV.29. Todos los valores fueron inferiores a 1, lo que indica la preponderancia del carácter elástico.

Los mayores valores de tan  $\delta$  se obtuvieron a pH 4 y con l-CG, pero con una R<sub>CP:CG</sub> de 2:1, mientras que los menores valores se obtuvieron a pH 3 (zona del pl), con i-CG y con R<sub>CP:CG</sub> de 4:1. En estas últimas condiciones se obtendrían las películas más estructuradas.

#### IV.3.4.2. Comparación de las propiedades espumantes de los sistemas mixtos CP:CG

A fin de observar la incidencia del tipo de CG, pH del medio acuoso y de la R<sub>CP:CG</sub> sobre las propiedades reológicas de ambos tipos de sistemas mixtos, se realizó un ANOVA multifactor. Dado que con una R<sub>CP:CG</sub> de 1:1 con i-CG no se formaron espumas en el equipo utilizado (método del burbujeo), se excluyó a esta relación de biopolímeros del ANOVA. Los resultados se muestran en las Tablas VI. 30 para Expansión, Tabla IV.31 para la vida media de la espuma ( $t_{1/2}$ ), Tabla IV.32 para la  $V_o$  drenado.

**Tabla IV.30.** Análisis de Varianza para Expansión - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:pH	63784,7	2	31892,3	27,11	<b>0,0000</b>
B:Carragenina	58968,0	1	58968,0	50,12	<b>0,0000</b>
C:R <sub>CP:CG</sub>	240,25	1	240,25	0,20	0,6551
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	31772,2	2	15886,1	13,50	<b>0,0001</b>
AC	16180,7	2	8090,33	6,88	<b>0,0040</b>
BC	870,25	1	870,25	0,74	0,3976

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

**Tabla IV.30.A** Pruebas de Múltiple Rangos para Expansión por pH  
Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
4	764,75	A
2	852,417	B
3	855,583	B

**Tabla IV.30.B** Pruebas de Múltiple Rangos para Expansión por Carragenina  
Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Carragenina</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
i-CG	783,778	A
l-CG	864,722	B

**Tabla IV.30.C** Pruebas de Múltiple Rangos para Expansión por R<sub>CP:CG</sub>  
Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>R<sub>CP:CG</sub></i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
4:1	821,667	A
2:1	826,833	A

El pH y el tipo de carragenina tuvieron efectos significativos en la expansión de la espuma. A su vez las interacciones pH y tipo de CG y pH y R<sub>CP:CG</sub> fueron significativas. Los mayores valores de ambas respuestas se obtuvieron a pH 2 y 3 con l-CG. La expansión mostro una correlación inversa con el tamaño hidrodinámico (R= -0,6085) cuando se incluyeron ambos sistemas mixtos y CP en el análisis, indicando que la capacidad de formar espumas fue favorecida por las partículas más pequeñas.

**Tabla IV.31.** Análisis de Varianza para  $t_{1/2}$  - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:pH	9016,44	2	4508,22	174,29	<b>0,0000</b>
B:Carragenina	255,148	1	255,148	9,86	<b>0,0051</b>
C:R <sub>CP:CG</sub>	20667,0	1	20667,0	798,98	<b>0,0000</b>
INTERACCIONES					
AB	5200,44	2	2600,22	100,52	<b>0,0000</b>
AC	537,333	2	268,667	10,39	<b>0,0008</b>
BC	14145,3	1	14145,3	546,86	<b>0,0000</b>
RESIDUOS	517,333	20	25,8667		
TOTAL	85190,7	29			
(CORREGIDO)					

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

**Tabla IV.31.A** Pruebas de Múltiple Rangos para  $t_{1/2}$  por pH

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
4	97,3333	A
2	139,667	B
3	148,667	C

**Tabla IV.31.B** Pruebas de Múltiple Rangos para  $t_{1/2}$  por Carragenina

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Carragenina</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
I-CG	123,944	A
i-CG	133,167	B

**Tabla IV.31.C** Pruebas de Múltiple Rangos para  $t_{1/2}$  por  $R_{CP:CG}$ 

Método: 95,0 porcentaje LSD

$R_{CP:CG}$	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
4:1	87,0556	A
2:1	170,056	B

**Tabla IV.32.** Análisis de Varianza para  $V_0$  drenado - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:pH	0,382513	2	0,191257	148,18	<b>0,0000</b>
B:Carragenina	0,00823379	1	0,00823379	6,38	<b>0,0201</b>
C: $R_{CP:CG}$	0,263934	1	0,263934	204,49	<b>0,0000</b>
INTERACCIONES					
AB	0,0448774	2	0,0224387	17,38	<b>0,0000</b>
AC	0,0122151	2	0,00610756	4,73	<b>0,0208</b>
BC	0,242252	1	0,242252	187,69	<b>0,0000</b>
RESIDUOS	0,025814	20	0,0012907		

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

**Tabla IV.32.A** Pruebas de Múltiple Rangos para  $V_0$  drenado por pH

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
3	0,0770833	A
2	0,111083	A
4	0,401917	B

**Tabla IV.32.B** Pruebas de Múltiple Rangos para  $V_0$  drenado por Carragenina

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Carragenina</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
I-CG	0,1705	A
i-CG	0,222889	B

**Tabla IV.32.C** Pruebas de Múltiple Rangos para  $V_0$  drenado por  $R_{CP:CG}$   
Método: 95,0 porcentaje LSD

$R_{CP:CG}$	Media LS	Grupos Homogéneos
2:1	0,0483889	A
4:1	0,345	B

El pH, el tipo de carragenina y la  $R_{CP:CG}$  tuvieron efectos significativos en el  $t_{1/2}$  y en la  $V_0$  de la espuma. A su vez todas las interacciones fueron significativas.

Las espumas de mayor vida media se obtuvieron a pH 3 con i-CG y  $R_{CP:CG}$  de 2:1, mientras que las menores velocidades de drenado de líquido se consiguieron a pH 2 y 3 con l-CG y  $R_{CP:CG}$  de 2:1.

Cabe destacar que los sistemas  $R_{CP:CG}$  2:1 con CP:i-CG no drenaron líquido en el tiempo del ensayo. Sin embargo, para los sistemas en los que hubo drenado de líquido, a las diferentes  $R_{CP:CG}$  se observó que a pH 4 las espumas tuvieron menor estabilidad.

A  $R_{CP:CG}$  de 2:1 las espumas con i-CG fueron más estables y a  $R_{CP:CG}$  de 4:1, las espumas con l-CG mostraron un mayor tiempo de vida.

Ambos sistemas mostraron una correlación directa del  $t_{1/2}$  con el tamaño (R: 0,7043), lo que podría explicar el menor drenaje líquido y colapso de la espuma a pHs 2 y 3, lo que significa que la estabilidad de la espuma fue mayor cuando los complejos fueron más grandes, lo que podría implicar una película más gruesa y cohesiva. El grosor y la resistencia de las películas dependen de la estructura terciaria de la proteína y de las interacciones proteína-proteína (Le Meste y col., 1990).

Estos resultados ponen en evidencia la existencia de condiciones óptimas para la formación y estabilidad de espumas elaboradas con proteínas de HM y carrageninas, las cuales tienen lugar en el entorno del pl de estas proteínas, a una dada  $R_{CP:CG}$  y naturaleza química de la CG.

#### IV.3.5. Conclusiones parciales

- Las propiedades espumantes de las proteínas de HM fueron pobres en comparación con otras proteínas alimentarias que se usan habitualmente como agentes espumantes. Aun así, la abundancia y el bajo costo de la HM hacen que se pueda considerar la obtención de proteínas y su aplicación en alimentos. Sin embargo, estas proteínas pueden complejarse con carrageninas y el sistema mixto puede actuar como espumante, dependiendo del pH y de la relación de la mezcla de biopolímeros. Por esto, se investigaron los efectos del pH y de la concentración relativa de biopolímeros sobre la interacción entre las proteínas de HM y dos tipos de CG (i-CG y l-CG) en medio acuoso y en la interfase aire-agua.
- En medio acuoso, en el rango de pH de 2,0 a 6,0, se formaron complejos proteína-polisacárido solubles y coloidalmente estables por la existencia de interacciones atractivas entre cargas positivas de la proteína y negativas de las carrageninas. Tales interacciones resultaron en la estabilidad coloidal, atribuida al tamaño submicrónico (nm) y a la elevada repulsión electrostática entre cargas eléctricas negativas aportadas fundamentalmente por las carrageninas. Los menores tamaños fueron observados para los complejos formados por la proteína y l-CG a la mayor relación proteína: polisacárido ( $R_{CP:CG}$  4:1). Esto indicaría que una elevada  $R_{CP:CG}$  es requisito para un ensamblaje compacto entre los biopolímeros para la generación de complejos electrostáticos. Estos sistemas manifestaron una mayor hidrofobicidad superficial a pH más ácidos, aunque dicha hidrofobicidad superficial fue inferior a la de la proteína.
- Los sistemas CP:i-CG formaron una película interfasial con valores altos de módulo elástico en condiciones de pH que incluyeron el punto isoeléctrico. Las espumas presentaron burbujas más densas y mostraron una notable estabilidad.
- En general, la presencia de CG incrementó la componente elástica ( $E'$ ) de las películas inclusive a las menores  $R_{CP:CG}$  ensayadas.
- La gran estabilidad coloidal de los complejos CP:CG los convierte en sistemas interesantes para la elaboración de espumas y emulsiones alimentarias.

**IV.4.CAPÍTULO**  
**PROTEÍNAS DE HEZ DE MALTA**  
**COMO AGENTE DE**  
**ENCAPSULACIÓN DEL HIERRO**

#### **IV.4.0. Proteínas de HM como agente de encapsulación del hierro**

Se obtuvieron microcápsulas de hierro y ácido ascórbico por secado aerosol a partir de diferentes formulaciones conteniendo goma garrofín (GG) y distintos niveles de CP y maltodextrina (MD) como material de pared, de acuerdo con el diseño experimental planteado.

##### **IV.4.1. Respuestas de diseño experimental relacionadas con el proceso y características fisicoquímicas de las diferentes formulaciones de microcápsulas.**

Los valores de humedad de las microcápsulas estuvieron comprendidos entre 5,00 y 7,92 g 100g<sup>-1</sup>.

El rendimiento del proceso de encapsulación estuvo comprendido entre 19,5-34,7%. Valores similares (34,9-40,7%) fueron obtenidos por Akbarbaglu y col., (2019) para encapsulados de hidrolizados de proteínas de lino con maltodextrina. El rendimiento es muy variable porque depende del tipo de material y de las condiciones de secado (Abbasi & Azari, 2011). Las pérdidas y los bajos rendimientos pueden deberse a que las micropartículas y el material de encapsulación se adhieren a la pared del equipo debido a la carga eléctrica de las microcápsulas que se producen (Pratap-Singh y col., 2018). Otro factor que influye es la temperatura (Nadeem y col., 2011; Sarabandi y col., 2019).

En la Tabla IV.33 se muestran las respuestas del diseño experimental relacionadas con el proceso de encapsulación y las características de las microcápsulas obtenidas con las diferentes formulaciones.

La Tabla IV.34 muestra el grado de significancia (valores de p) correspondiente a cada término polinómico del modelo de regresión.

Los modelos de regresión pueden considerarse adecuados para describir los efectos de la relación concentrado proteico de hez de malta (CP): material de pared (MP) y ácido ascórbico (AA): sulfato ferroso (Fe), en cada respuesta, ya que la falta de ajuste no fue significativa ( $p > 0,05$ ), y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) fue aceptable para cada uno.

**Tabla IV.33.** Respuestas de diseño experimental relacionadas con el proceso y características fisicoquímicas de las diferentes formulaciones de microcápsulas.

Factor es	CP:MP	AA:Fe	Tam (µm)	EFe (%)	EAA (%)	Pot ζ (mV)	QFe (%)	Ho	ρ (g/mL)
-1	8,6	1,8	7,4	90,4	64,5	-6,3	24,7	58,2	0,1804
1	8,6	0,9	9,5	97,8	68,6	-6,7	22,6	43,1	0,1839
0/0	12,9	1,35	10,8	92	64,1	-10,7	31,5	80,9	0,1633
0/0	12,9	1,35	10,1	92,1	66,2	-10,5	29,8	72,4	0,2121
0/0	12,9	1,35	10,6	93,2	67	-8,6	36,8	79	0,1595
1/1*	17,2	1,8	10,4	89,4	78,9	-20,1	59,7	86	0,2127
1/-1	17,2	0,9	12,9	94,5	65,3	-19,6	50,8	79,2	0,1839

CP:MP: relación concentrado proteico: material de pared; AA:Fe relación molar ácido ascórbico: hierro; Tam: tamaño de partícula, EFe: eficiencia de encapsulación del hierro; EAA: eficiencia de encapsulación del ácido ascórbico; Pot ζ: potencial zeta; QFe: capacidad quelante de hierro; BFe: bioaccesibilidad del hierro; Ho: hidrofobicidad superficial; ρ: densidad.

**Tabla IV.34.** Resultados del Análisis de Varianza de los efectos generales de las dos variables independientes sobre las respuestas.

Fuente de variación	Valor-p						
	Tam. (µm)	EFe (%)	EAA (%)	Pot ζ (mV)	QFe (%)	Ho	ρ (g/mL)
CP: MP	<b>0,0127</b>	0,0840	0,0663	<b>0,0075</b>	<b>0,0131</b>	<b>0,0191</b>	<b>0,0016</b>
AA:Fe	<b>0,0234</b>	<b>0,0112</b>	0,0877	0,9695	0,2709	0,1316	0,5115
CP:MP×AA:Fe	0,6349	0,2263	<b>0,0283</b>	0,7353	0,4500	0,4598	0,3900
Falta de ajuste	0,2438	0,3647	0,0905	0,0671	0,1366	0,0860	0,1142
r <sup>2</sup>	0,9624	0,9377	0,8320	0,8960	0,9085	0,8265	0,9856

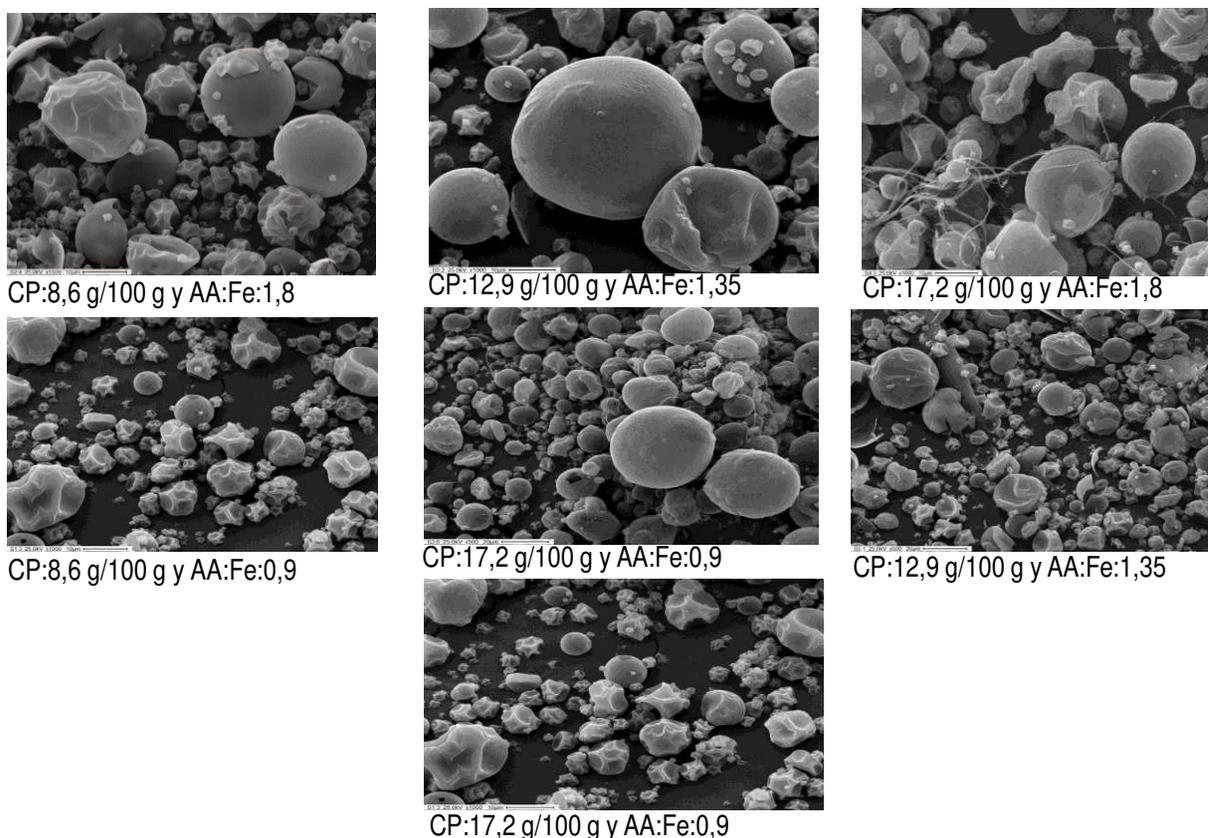
Los valores en negrita indican diferencias significativas (p < 0,05).

CP:MP: relación concentrado proteico: material de pared; AA:Fe relación molar ácido ascórbico: hierro; Tam: tamaño de partícula, EFe: eficiencia de encapsulación del hierro; EAA: eficiencia de encapsulación del ácido ascórbico; Pot ζ: potencial zeta; QFe: capacidad quelante de hierro; BFe: bioaccesibilidad del hierro; Ho: hidrofobicidad superficial; ρ: densidad.

#### IV.4.1.1. Morfología y tamaño de las microcápsulas

En la Figura IV.21 se muestran micrografías de la microscopía electrónica (SEM) de las microcápsulas obtenidas con las diferentes formulaciones.

Las microcápsulas presentaron superficies externas redondas y algunas concavidades, lo que se atribuye a la atomización mecánica, a fuerzas de contracción desiguales debido a la rápida evaporación de las gotas por la entrada de aire caliente y a la solidificación por enfriamiento involucrada en el secado por aspersión (Mohan y col., 2015; Norkaew y col., 2019; Xie y col., 2010).



**Figura IV.21.** Micrografía de SEM de las microcápsulas obtenidas con las distintas formulaciones (aumento 1000X).

El enfriamiento rápido genera abolladuras debido a la contracción del material de la pared, especialmente a altas velocidades de secado (Xie y col., 2010). Es importante señalar que no se observaron fisuras, grietas o interrupciones en la morfología de la superficie de las microcápsulas. Esto es fundamental para garantizar una menor permeabilidad de los gases, mayor protección y retención del núcleo (Oliveira y col., 2007). Molina-Ortiz y col., (2009) informaron que el uso de aislados de proteína de soja como material de pared para la microencapsulación de hidrolizados de caseína permitía obtener microcápsulas con estructuras más duras y, relacionaron la estructura observada sin fisuras ni roturas con las buenas propiedades filmogénicas de las proteínas de soja. Al respecto, en el capítulo IV.2 se demostraron las propiedades filmogénicas de las proteínas de HM y se desarrollaron películas activas con CP utilizando polietilenglicol como plastificante. Por otro lado, Xie y col., (2010) informaron que

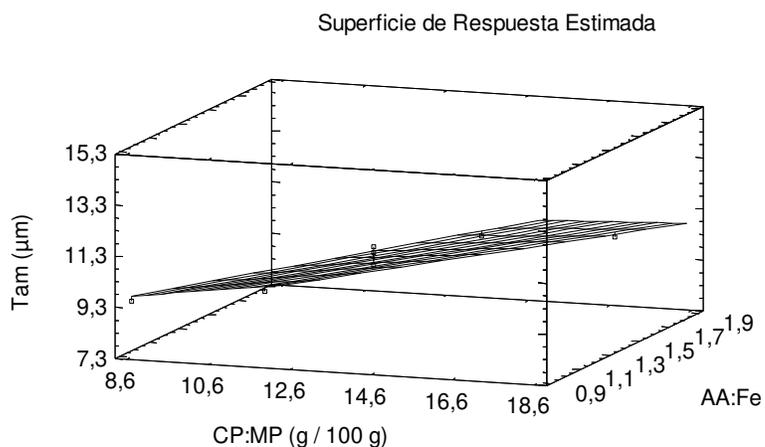
las proteínas mejoraron la suavidad y redujeron la indentación de la superficie de las microcápsulas a base de maltodextrina; señalando que las combinaciones de aislados de proteína de suero (WPI) con carbohidratos con alto contenido de glucosa limitaban la formación de abolladuras en la superficie de las microcápsulas.

El tamaño medio de las microcápsulas osciló entre 7,4 y 12,9  $\mu\text{m}$ . Estos valores estaban dentro del rango esperado para las microcápsulas producidas por secado spray (1 - 50  $\mu\text{m}$ ) (Nesterenko y col., 2013).

Los resultados de ANOVA mostraron que ambas variables independientes fueron significativas ( $p < 0,05$ ). La ecuación del modelo ajustado fue:

$$\text{Tam } (\mu\text{m}) = 7,99286 + 0,44186 * \text{CP:MP} - 1,88889 * \text{AA:Fe} - 0,0516796 * \text{CP:MP} * \text{AA:Fe}$$

En la Figura IV.22 se observa la superficie de respuesta correspondiente a los efectos de la relación CP:MP y la relación molar AA:Fe sobre el tamaño medio de las microcápsulas.



**Figura IV.22.** Superficie de respuesta correspondiente a los efectos de la relación concentrado proteico: material de pared (CP:MP) y la relación molar ácido ascórbico: hierro (AA:Fe) sobre el tamaño de las microcápsulas.

El tamaño de las microcápsulas se relacionó directamente con el contenido de proteínas del material de pared (CP:MP) e inversamente con la relación molar AA:Fe, por lo que un aumento en el contenido de hierro aumentó el tamaño de las microcápsulas. Churio y Valenzuela (2018) encontraron un efecto similar, y reportaron que un aumento del contenido de sulfato ferroso con respecto al material de encapsulación (de 1:10 a 1:2.5) incrementó el tamaño medio de las microcápsulas obtenidas por secado por pulverización.

#### **IV.4.1.2. Eficiencia de encapsulación del hierro**

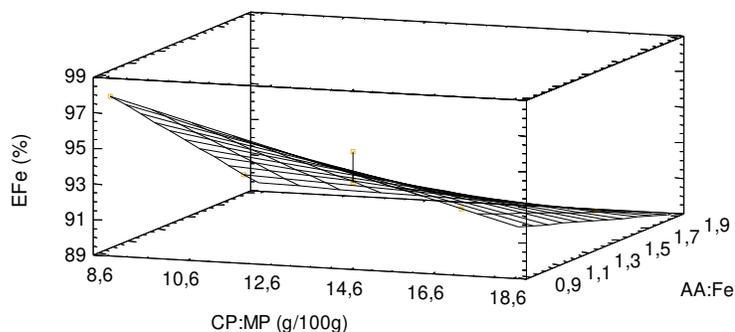
La eficiencia de encapsulación del hierro (EFe) estuvo comprendida entre 89,4-97,8%. Valores similares (91–97%) fueron observados por Singh y col., (2018) para encapsulados de sulfato ferroso con quitosano producidos por secado por atomización, mientras que De Azevedo Bittencourt y col., (2013) obtuvieron una eficiencia de encapsulación de hierro del 32% utilizando proteínas de arveja por el mismo método de secado.

La EFe no se vio afectada significativamente ( $p > 0.05$ ) por la proporción de CP:MP, sin embargo, presentó una relación inversa con la relación molar AA:Fe ( $r^2: 0.9180$ ). Los mayores valores de EFe correspondieron a las microcápsulas obtenidas con la relación molar 0.9 AA/Fe.

La ecuación del modelo ajustado fue:

$$EFe = 114,849 - 1,10814 * CP:MP - 13,0556 * AA:Fe + 0,554264 * CP:MP * AA:Fe.$$

En la Figura IV.23 se observa que al aumentar la relación AA:Fe en la fórmula, la incorporación de Fe en las microcápsulas disminuyó. Por otra parte, a baja relación AA:Fe, el mayor contenido de CP disminuyó la incorporación de Fe en las microcápsulas, mientras que a alta relación AA:Fe, el agregado de la proteína no tuvo efecto.



**Figura IV.23.** Superficie de respuesta correspondiente a los efectos de la relación concentrado proteico: material de pared (CP:MP) y la relación molar ácido ascórbico: hierro (AA:Fe) en la eficiencia de encapsulación de hierro (EFe%).

#### IV.4.1.3. Eficiencia de encapsulación del ácido ascórbico

La eficiencia de encapsulación del ácido ascórbico (EAA%) estuvo comprendida en el rango de 64,1-78,1%. Estos valores fueron calculados considerando el contenido final de ácido ascórbico en las microcápsulas, luego del proceso de secado.

Sólo la interacción entre CP:MP x AA:Fe fue significativa (Tabla IV.34).

La ecuación del modelo ajustado fue:

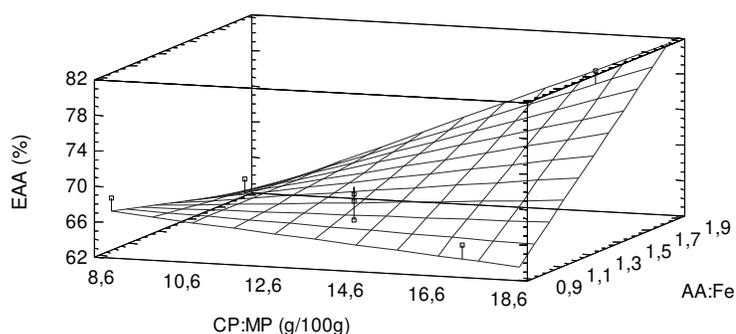
$$EAA = 91,8018 - 2,41395 * CP:MP - 23,9667 * AA:Fe + 2,26744 * CP:MP * AA:Fe$$

En la Figura IV.24 se observa que la EAA se incrementó al aumentar la relación molar AA:Fe al nivel más alto de CP:MP.

La máxima EAA fue observada para la formulación con el mayor contenido de proteínas de HM y la mayor relación molar AA:Fe.

Pierucci y col., (2006) observaron que la EAA para el ácido ascórbico encapsulado con una mezcla de concentrados proteicos de arveja y maltodextrina aumentó a medida que la proporción del concentrado proteico de arveja/material de pared se incrementó del 50 al 100%. El efecto positivo del concentrado proteico de arveja en la EAA fue atribuido a un aumento de las interacciones electrostáticas entre el material de pared y el núcleo. Además, la dilución de las proteínas de arveja por los sacáridos de bajo peso molecular proporcionados por la

maltodextrina (glucosa y maltosa) redujo las interacciones fisicoquímicas de las proteínas con el AA. Así, un aumento de la proporción de CP en el material de pared podría favorecer las interacciones electrostáticas con el ácido ascórbico, incrementando la EAA.



**Figura IV.24.** Superficie de respuesta correspondiente a los efectos de la relación concentrado proteico: material de pared (CP:MP) y la relación molar ácido ascórbico: hierro (AA:Fe) en la eficiencia de encapsulación del ácido ascórbico (EAA %).

En este sentido, un aumento de la proporción de CP:MP aumentó la carga negativa de las microcápsulas y por ende el potencial  $\zeta$  fue más negativo (Figura IV.26). Esto puede deberse a dos factores: el alto contenido de Glu + Asp en CP y la reducción del contenido de MD en la formulación, considerando que el potencial zeta de la MD es de +29,8 (Churio y Valenzuela 2018). Además, al aumentar el CP aumentó la carga negativa, lo que indicaría que las proteínas están, al menos en parte, en la superficie que rodea al complejo AA:Fe.

Este resultado es muy importante, ya que el CP protegería al AA de la oxidación durante el secado. Nótese que el AA es un promotor de la absorción del hierro que también puede sufrir oxidación, lo que afecta su solubilidad y, por lo tanto, su biodisponibilidad (Caetano-Silva y col., 2020).

Además, el ácido ascórbico actuaría como complejante y agente reductor, manteniendo el Fe en su estado ferroso. Así, los principales efectos de los polipéptidos de la HM y del ácido ascórbico serían mantener el hierro soluble a pH

neutro (ya que 6,5 es el pH a nivel del duodeno, el sitio de absorción del hierro) y en su estado reducido (como hierro ferroso).

#### IV.4.1.4. Potencial $\zeta$

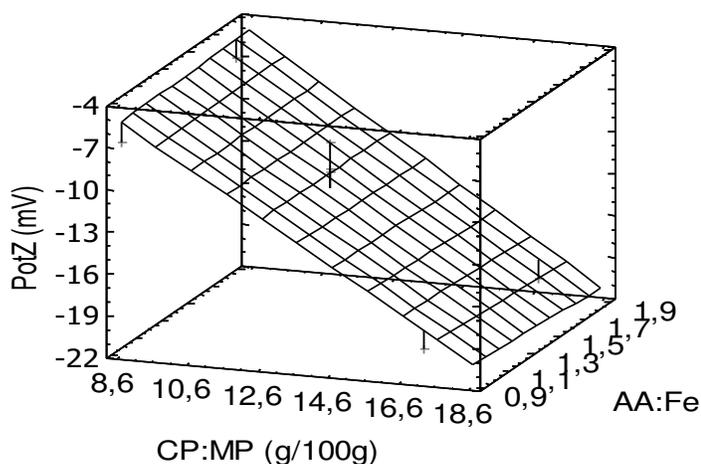
El potencial  $\zeta$  (PotZ) de las microcápsulas fue negativo y estuvo comprendido en el rango de -6,3 a -20,1 mV. Los valores obtenidos son en general mayores que los reportados para las microcápsulas de sulfato ferroso con maltodextrina, cuyo potencial zeta fue de -9,8 a -12,3 mV (Churio y Valenzuela 2018).

Respecto a las formulaciones evaluadas, el efecto de la proporción CP:MP fue significativo ( $p < 0,05$ ) (Tabla IV.34).

La ecuación del modelo ajustado fue:

$$\text{PotZ} = 6,28929 - 1,39535 * \text{CP:MP} + 1,44444 * \text{AA:Fe} - 0,116279 * \text{CP:MP} * \text{AA:Fe}$$

En la Figura IV.25 se muestra la superficie de respuesta para los efectos de la relación CP:MP y la relación molar AA:Fe en el potencial zeta.



**Figura IV.25.** Superficie de respuesta correspondiente a los efectos de la relación concentrado proteico: material de pared (CP:MP) y la relación molar ácido ascórbico: hierro (AA:Fe) en el potencial zeta (mV).

El potencial zeta de las microcápsulas fue más negativo con el aumento de la relación CP:MP. Como se discutió anteriormente, esto puede deberse en parte al alto contenido de Glu+Asp presente en CP.

Además, el hecho de que la carga negativa de las microcápsulas aumentó con el contenido de proteínas en el material de pared, indicaría que la proteína se encontraría mayoritariamente en la superficie de las microcápsulas, rodeando el complejo AA-Fe<sup>2+</sup>.

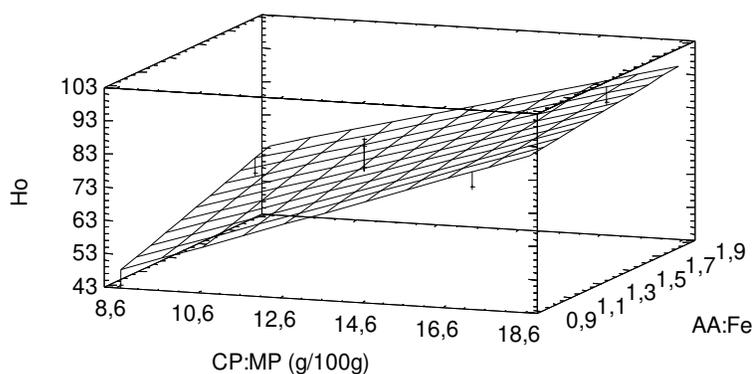
#### IV.4.1.5. Hidrofobicidad superficial de microcápsulas

La hidrofobicidad superficial estuvo comprendida en el rango de 43,1-86,0%.

Sólo el efecto de CP:MP fue significativo ( $p < 0,05$ ) en Ho. La ecuación del modelo ajustado fue:

$$Ho = -11,3464 + 5,11628 * CP:MP + 25,7778 * AA:Fe - 1,04651 * CP:PM * AA:Fe$$

En la Figura IV.26 se muestra la superficie de respuesta para los efectos de la relación CP:MP y la relación molar AA:Fe en la hidrofobicidad superficial de las microcápsulas.



**Figura IV.26.** Superficie de respuesta correspondiente a los efectos de la relación concentrado proteico: material de pared (CP:MP) y la relación molar ácido ascórbico: hierro (AA:Fe) en la hidrofobicidad superficial de las microcápsulas.

Al aumentar la concentración de proteínas en el material de pared aumentó la hidrofobicidad superficial, lo que posiblemente se deba a la formación de parches hidrofóbicos en la superficie de las microcápsulas debido a las proteínas de HM. Particularmente, éstas presentan una elevada proporción de aminoácidos hidrofóbicos (59,6 % del total de los aminoácidos, ver perfil de AA en la Tabla IV.7), lo que se atribuye a la extracción alcalina de fracciones de hordeínas (Bamdad y col., 2011;Vieira y col., 2014).

#### IV.4.1.6. Quelación del hierro

La capacidad quelante del hierro de las microcápsulas varió de 24,7 a 59,7%. Sólo el efecto de CP:MP fue significativo ( $p < 0,05$ ) (Tabla IV.34).

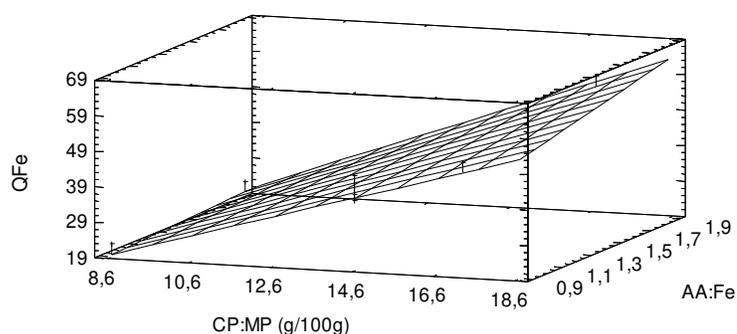
La ecuación del modelo ajustado fue:

$$Q_{Fe} = -3,79286 + 2,48837 * CP:MP - 5,22222 * AA:Fe + 0,878553 * CP:MP * AA:Fe$$

En la Figura IV.27 se muestra la superficie de respuesta para los efectos de la relación CP:MP y la relación molar AA:Fe en la capacidad quelante de hierro de las microcápsulas.

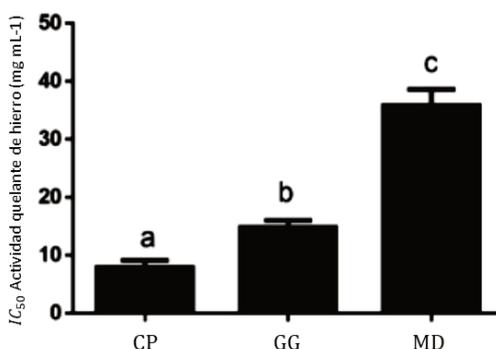
Se observa que el incremento del % QFe fue proporcional al incremento de la concentración de proteínas en el material de pared.

Este resultado fue confirmado al estudiar la capacidad quelante de los diferentes materiales de pared.



**Figura IV.27.** Superficie de respuesta correspondiente a los efectos de la relación concentrado proteico: material de pared (CP:MP) y la relación molar ácido ascórbico: hierro (AA:Fe) en la capacidad quelante de hierro.

En la Figura IV.28, se muestran los valores de la concentración de cada material que quela el 50% del hierro en solución en el ensayo ( $IC_{50}$ ).



**Figura IV.28.** Actividad quelante del hierro de las proteínas de HM (CP), de la goma garrofín (GG) y de maltodextrina (MD).

El CP mostró la mayor actividad quelante del hierro. Esto puede deberse a la alta proporción de polipéptidos de 2900 Da y residuos de aminoácidos quelantes (Glu, Asp e His), que mantendrían el hierro ligado.

Bamdad y Chen, (2013) informaron que las fracciones menores a 5000 Da obtenidas a partir de hidrolizados de hordeínas de cebada tenían mayor actividad quelante de hierro que las fracciones mayores a 5000 Da. Una hidrólisis limitada de hordeínas produce polipéptidos más anfotéricos y estructuralmente flexibles, capaces de atrapar iones (Bamdad y col., 2011). Por otro lado, Lv y col., (2009) reportaron que los oligopéptidos de los hidrolizados de la proteína de la soja que ligan hierro se unen a los minerales a través de los residuos ácidos de Glu + Asp.

La actividad quelante de hierro de CP puede deberse al tamaño del polipéptido (alta proporción de componentes 2900 Da) y al alto contenido de residuos Glu+ Asp. Miao y col., (2019) informaron que las fracciones con peso moleculares < 3000 Da obtenidas a partir de hidrolizados de caseína tenían una mayor actividad quelante de hierro que las fracciones con peso molecular > 3000 Da.

Cabe destacar que los ensayos de actividad quelante fueron realizados a un pH 4,5. Al respecto, los residuos carboxílicos de los aminoácidos ácidos tienen

carga negativa a  $\text{pH} > 4,25$ , por lo que los polipéptidos que los contienen adquieren una alta capacidad quelante de minerales (Caetano-Silva y col., 2020; Cian y col., 2016).

Adicionalmente, Torres-Fuentes y col., (2011) informaron que un alto contenido de His (alrededor del 20-30%) en la secuencia peptídica proporciona una alta capacidad de quelación a los péptidos. Al respecto, Bamdad y col., (2011b) mencionaron que los aminoácidos como la histidina con capacidad de unir metales presentan grupos cargados capaces de formar complejos con el hierro a través de interacciones electrostáticas.

Como se mencionó anteriormente, el segundo aminoácido más abundante en las proteínas de HM fue His (Tabla IV.7.), que podría estar involucrada en la capacidad quelante de los polipéptidos. La alta capacidad quelante y reductora de CP podrían mantener al hierro soluble, en su estado reducido y en una forma bioaccesible durante la digestión gastrointestinal.

La GG también exhibió actividad quelante de hierro, obteniendo un valor intermedio de  $\text{IC}_{50}$  (Figura IV.28). Similares resultados fueron reportados por Hamdani y Wani (2017) para extractos metanólicos de GG. Se ha encontrado que algunos polisacáridos naturales se unen a iones divalentes, formando puentes cruzados a través de sus grupos funcionales carbonilo (Wang y col., 2010). Además, Roman y col., (2015) informaron que los galactomananos pueden formar complejos con metales por dos grupos cis-hidroxilo de cada unidad monomérica.

Por su parte, la MD presentó baja actividad quelante. Este polímero fue utilizado principalmente como agente de relleno en el presente estudio, debido a sus excelentes propiedades encapsulantes.

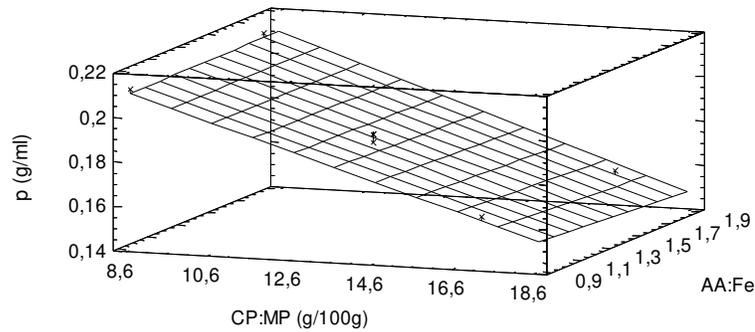
#### **IV.4.1.7. Densidad**

La densidad de las microcápsulas estuvo comprendida en el rango de 0,1595-0,2127. Sólo el efecto de la proporción CP:MP fue significativo ( $p < 0,05$ ) en la densidad de las microcápsulas.

La ecuación del modelo ajustado fue:

$$\rho = 0,254114 - 0,00516279 * CP:MP + 0,00555556 * AA:Fe - 0,0005684 * CP:MP * AA:Fe$$

En la Figura IV.29 se muestra la superficie de respuesta para los efectos de la relación CP:MP y la relación molar AA:Fe en la densidad de las microcápsulas.



**Figura IV.29.** Superficie de respuesta correspondiente a los efectos de la relación concentrado proteico: material de pared (CP:MP) y la relación molar ácido ascórbico: hierro (AA:Fe) en la densidad de las microcápsulas.

Se observó que el aumento del contenido de CP:MP disminuyó la densidad de las microcápsulas.

#### IV.4.1.8. Color de las microcápsulas

En la Figura IV.30, se presenta una fotografía de una muestra de las microcápsulas del hierro, donde puede observarse su color.



**Figura IV.30.** Microcápsulas del hierro.

Los valores de los parámetros de color se muestran en la Tabla IV.35.

**Tabla IV.35** Parámetros de color de las diferentes formulaciones de las microcápsulas

Fuente de variación		Respuestas					
CP/MP	AA/Fe	L*	a*	b*	$\Delta E^*$	C*	h*
8,6	1,8	56,47	2,25	6,61	41,43	6,98	251,24
8,6	0,9	48,31	2,73	5,21	49,44	5,88	242,35
12,9	1,35	38,65	3,02	4,96	59,07	5,81	238,62
12,9	1,35	44,44	2,64	5,83	53,34	6,40	245,59
12,9	1,35	52,61	3,30	6,52	45,32	7,31	243,13
17,2	1,8	42,85	2,85	6,80	55,02	7,38	247,32
17,2	0,9	44,02	1,82	5,89	53,73	6,17	252,89

Si bien la falta de ajuste no fue significativa, las variables independientes CP:MP y AA:Fe no tuvieron un efecto significativo sobre los parámetros de color. Puede observarse que tanto los valores de  $a^*$  y  $b^*$  fueron positivos, lo cual se corresponde con lo determinado para el color del CP.

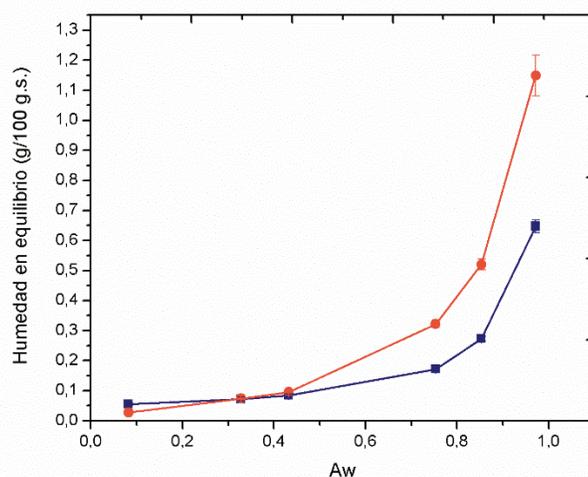
#### IV.4.2. Isotermas de adsorción de las microcápsulas del hierro

Las isotermas de sorción de humedad en los alimentos muestran la relación que existe entre el contenido de humedad de equilibrio del alimento y la actividad de agua ( $a_w$ ), a una temperatura y presión constantes (Alvarado 2012)

En la Figura IV.31, se muestran las isotermas de absorción, para la formulación del punto central de las microcápsulas de hierro y para las proteínas de hez de malta (CP).

En general, las isotermas de absorción mostraron bajas tasas de incremento en el contenido de humedad de equilibrio a bajas  $a_w$  (hasta 0,5-0,6) y luego se incrementaron con el aumento de la actividad del agua, lo que indica que el comportamiento de las curvas fue del tipo III. Este tipo de curva la presentan alimentos constituidos principalmente por componentes cristalinos, como los azúcares y la sal. La ganancia de humedad es muy lenta hasta un punto (conocido como punto delicuescente que corresponde), cuando los cristales empiezan a

disolverse en el agua absorbida en la superficie del cristal (Alvarado 2012). Se observaron isothermas similares para formulaciones de microcápsulas de proteínas de carne de pollo, con maltodextrina-goma arábica (Silva y col., 2012).



**Figura IV.31.** Isothermas de adsorción de agua de (●) microcápsulas de hierro y (■) proteínas de hez de malta CP.

Para una misma  $a_w$  y a partir de 0,6, las humedades de equilibrio de las microcápsulas (que contienen en su material de pared CP, maltodextrina y goma garrofín) fueron significativamente mayores que las del CP.

Para describir las isothermas de absorción de agua se utilizaron las ecuaciones de BET y GAB. Los valores de los parámetros obtenidos por el análisis de regresión no lineal para ambos modelos se muestran en la Tabla IV.36.

El valor de la monocapa ( $w_0$ ) es la humedad en la cual todos los sitios de adsorción primarios del producto están recubiertos por una capa de molécula de agua. Se corresponde con la condición de máxima estabilidad del producto y es una guía razonable de la estabilidad del producto con relación a la humedad (Alvarado 2012). Los valores de  $w_0$  fueron de 0,051 y 0,163 g 100 g<sup>-1</sup> sólido, para las muestras de microcápsulas y CP, respectivamente. Kurozawa y col., (2009) reportaron valores de  $w_0$  de 0,039 g 100 g<sup>-1</sup> bs., para hidrolizados de proteínas de pollo con maltodextrina /goma. Las diferencias entre los valores de las

microcápsulas y CP se deben a la presencia de maltodextrina y gomas que probablemente modifiquen el equilibrio de los sitios hidrófilo/hidrófobo de las proteínas, aumentando el agua adsorbida. Kurozawa y col., (2009). Sumado a esto, el efecto de la encapsulación disminuye la superficie expuesta de las moléculas de agua.

**Tabla IV.36.** Parámetros de los modelos (BET y GAB) para las isothermas de absorción de agua de las microcápsulas y del concentrado proteico de HM (CP)

<b>Modelo Parámetros</b>	<b>Modelo Mod. BET</b>	<b>Modelo GAB</b>
<i>Microcápsulas</i>		
W <sub>0</sub>	0,0645	0,051
C	39,51	1,010
k		0,953
R <sup>2</sup>	<b>0,986</b>	<b>0,9811</b>
<i>CP</i>		
W <sub>0</sub>	0,0998	0,163
C	4,06	0,705
k		0,991
R <sup>2</sup>	<b>0,9834</b>	<b>0,9316</b>

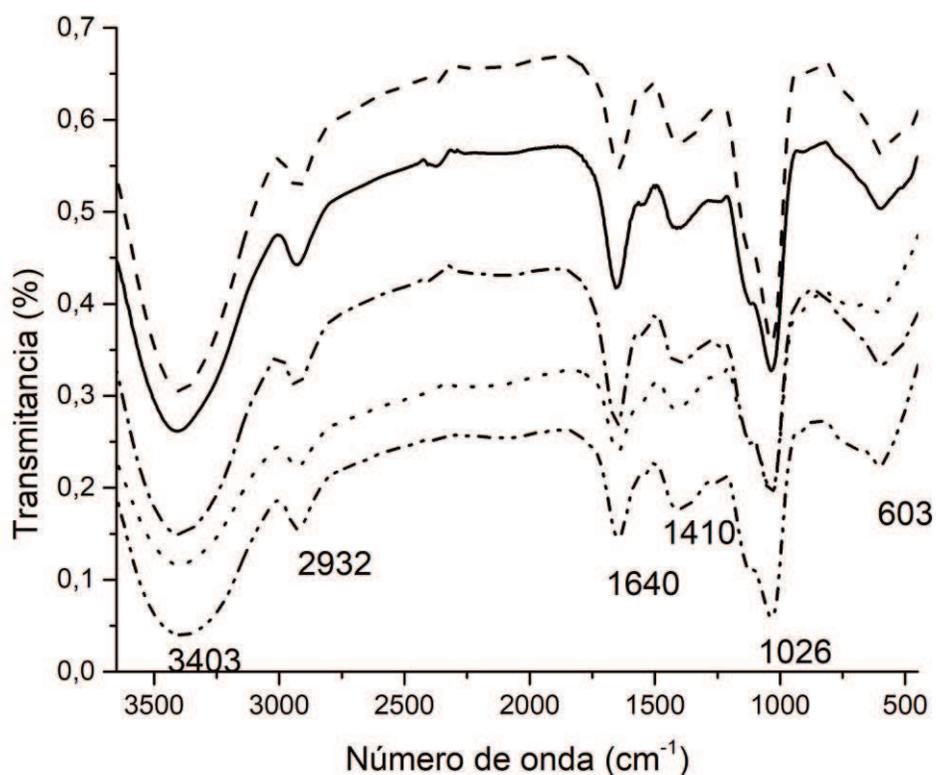
Las isothermas de GAB tienen una tercera constante k, que mide la diferencia del potencial químico interacción con el adsorbente, en el intervalo de energía de las moléculas de monocapa, y las del agua líquida (Escobar 2016). Los valores de k fueron de 0,953 para las microcápsulas de hierro y de 0,991 para CP. Un valor de k igual a 1 indica que las multicapas del adsorbente tienen propiedades del agua en estado líquido (Escobar 2016).

#### **IV.4.3. Espectro infrarrojo (FTIR) de las microcápsulas de hierro**

En la Figura IV.32 se muestran los espectros FTIR de las diferentes formulaciones de microcápsulas de hierro.

Los picos a aproximadamente 603 cm<sup>-1</sup> corresponden al estiramiento de Fe-O (Asghari-Varzaneh y col., 2017; Gotić y Musić, 2007). El FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O tiene una banda ancha alrededor de 3403 cm<sup>-1</sup> que se puede asignar al modo de estiramiento de las moléculas de H<sub>2</sub>O superficiales o la envoltura de los grupos

OH unidos por los enlaces de hidrogeno en la superficie. Asghari-Varzaneh y col., (2017) realizaron un estudio de FTIR de cápsulas de hierro y goma tragacanto y reportaron que el ancho de banda en el rango de  $3400-3500\text{ cm}^{-1}$  de las microcápsulas de hierro aumentó en comparación con los espectros de la goma, lo que indica un aumento en la extensión del enlace de hidrógeno debido a la entrada de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en las microcápsulas.



**Figura IV.32.** FTIR de las diferentes formulaciones de microcápsulas de hierro. Símbolos: (—) 1 (8,6 CP:MP;0,9 AA:Fe), (- - -) -1 (8,6 CP:MP;1,8 AA:Fe), (. . .) 1/-1 (17,2 CP:MP;0,9 AA:Fe), (- - - -) 1/1\* (17,2 CP:MP;1,8 AA:Fe), (- - - - -) 0/0 (12,9 CP:MP;1,35 AA:Fe). Temperatura: 25°C.

Las vibraciones relacionadas con la flexión/ movimiento del  $-\text{CH}_2$  de la goma garrofín se encuentran en la frecuencia de  $2932\text{ cm}^{-1}$  (Maiti y col., 2010). La banda de  $1640\text{ cm}^{-1}$  se debe a las vibraciones del  $\text{H}_2\text{O}$  (Gotić & Musić, 2007). La banda de maltodextrina, ubicada en  $1026\text{ cm}^{-1}$  representa la vibración de

estiramiento del enlace C-O (Santiago-Adame y col., 2015), que también está asociada al ácido ascórbico (Mahieu y col., 2017).

Los encapsulados de hierro parecen conservar gran parte de la estructura de sus materiales constituyentes, incluso cuando se cambian las concentraciones relativas.

#### IV.4.4. Solubilidad del hierro y de las proteínas. Bioaccesibilidad del hierro de las microcápsulas

En la Tabla IV.37 se presentan las respuestas del diseño experimental para los efectos de la relación CP:MP y la relación molar AA:Fe en la bioaccesibilidad del hierro de las microcápsulas y en la solubilidad del hierro y de las proteínas por efecto del pH.

**Tabla IV.37.** Bioaccesibilidad del hierro y solubilidad del hierro y proteínas de las diferentes formulaciones de microcápsulas

CP:Material de pared	AA:Fe	BFe (%)	SFe pH2 (%)	SFe pH 6,5 (%)	SP pH 2 (%)	SP pH 2-6,5 (%)
12,9	1,35	29,3	98	80,6	76	85,6
12,9	1,35	15,5	95,9	74,9	69,4	85,3
17,2	0,9	28,2	96,1	82,4	59,9	72,8
8,6	0,9	25	100,9	94	100	98,1
17,2	1,8	26,9	84,3	39,4	59,8	61,8
8,6	1,8	29,7	95,9	75	96,8	88,6
12,9	1,35	30,7	97	78,5	69,8	89,4

En la Tabla IV.38 se muestra el resultado del ANOVA correspondiente. Para todos los casos la falta de ajuste no fue significativa y los coeficientes de correlación fueron altos, lo que indica que el modelo ajustó a los datos experimentales.

**Tabla IV.38.** Análisis de varianza para la bioaccesibilidad del hierro y solubilidad del hierro y proteínas de las diferentes formulaciones de microcápsulas

Fuente de variación	Valor-p†				
	BFe (%)	SFe pH 2 (%)	SFe pH 6,5 (%)	SP pH 2 (%)	SP pH 2-6,5 (%)
CP:MP (%)	<b>0,0398</b>	<b>0,0160</b>	<b>0,0146</b>	<b>0,0091</b>	<b>0,0069</b>
AA:Fe	0,0568	<b>0,0153</b>	<b>0,0085</b>	0,6993	0,0697
CP:MP × AA:Fe	<b>0,0433</b>	0,0836	0,0531	0,7160	0,6268
Falta de ajuste	0,7727	0,0798	0,1378	0,1204	0,0559
r <sup>2</sup>	0,9667	0,9121	0,9624	0,9249	0,8945

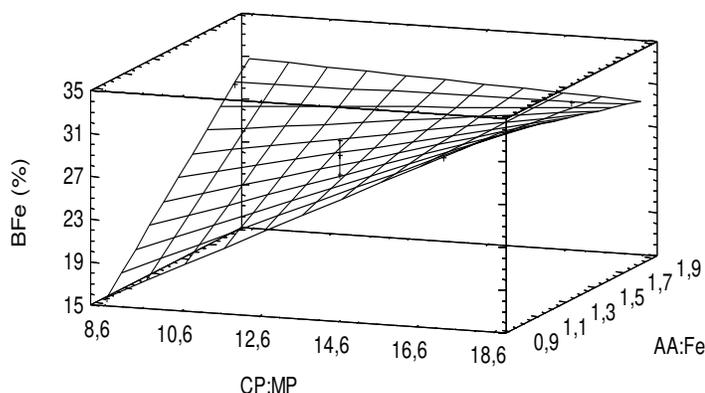
#### IV.4.4.1. Bioaccesibilidad del hierro

La bioaccesibilidad del hierro de las microcápsulas (BFe%) fue alta y estuvo comprendida en un rango de 15,45-30,70%.

La ecuación del modelo ajustado fue:

$$BFe = - 28,4268 + 3,50698 * CP:MP + 32,0 * AA:Fe - 1,92636 * CP:MP * AA:Fe$$

Los efectos CP:MP y la interacción CP:MP × AA:Fe fueron significativos ( $p < 0,05$ ). En la Figura IV.33 se muestra la superficie de respuesta para los efectos de la relación CP:MP y la relación molar AA:Fe en la bioaccesibilidad hierro de las microcápsulas.



**Figura IV.33.** Superficie de respuesta correspondiente a los efectos de la relación concentrado proteico: material de pared (CP:MP) y la relación molar ácido ascórbico: hierro (AA:Fe) en la bioaccesibilidad hierro de las microcápsulas.

Puede observarse que a una baja relación molar de AA:Fe, al aumentar la proporción de CP:MP, aumentó la BFe%. Sin embargo, a alta relación molar de AA:Fe, la proporción de CP:MP no tuvo efecto.

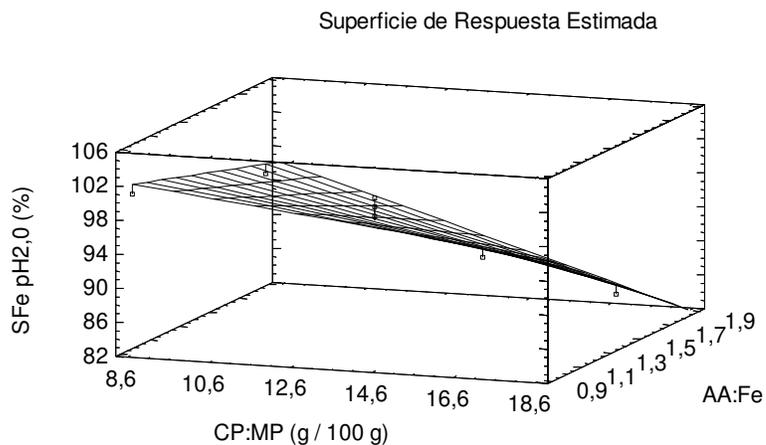
Asimismo, a bajos valores de CP:MP, la BFe aumentó con el incremento de la relación molar de AA:Fe. Sin embargo, a alta proporción de CP:MP, la relación molar de AA:Fe no tuvo efecto.

Como se mencionó anteriormente, el AA mantiene el hierro en su estado ferroso y también actúa como agente quelante, favoreciendo la solubilidad y la absorción del hierro *in vivo* (Hurrell & Egli, 2010; Kontoghiorghes y col., 2020). Por lo tanto, a bajos niveles de CP, el AA promueve la bioaccesibilidad del hierro, de manera de dosis-respuesta. Sin embargo, cuando la proporción CP es alta, la proteína actúa como agente quelante solubilizando al Fe, lo que permite una mayor BFe en todo el rango de relaciones molares AA:Fe. En el pH intestinal el hierro férrico es insoluble, mientras que el hierro ferroso sigue siendo soluble (Bryszewska y col., 2019). Por lo tanto, la alta capacidad quelante y reductora de CP podría mantener el hierro soluble y en su estado reducido. En este sentido, Cian y col., (2016) informaron que los péptidos quelantes obtenidos de hidrolizados de algas rojas *Pyropia columbina* mantuvieron el hierro en una forma soluble y bioaccesible tras la digestión gastrointestinal. También Cian y col., (2010) observaron que los péptidos producidos durante la proteólisis de la hemoglobina con las proteasas comerciales incrementaron la dializabilidad del hierro hemo. Este aumento se atribuyó a péptidos quelantes que son capaces de formar un complejo de hierro soluble.

#### **IV.4.4.2. Solubilidad del hierro a pH 2 y pH 6,5**

Se evaluó el efecto del pH de la digestión gastrointestinal (pH2 y secuencial pH 2- 6,5) en la liberación del hierro. En la Tabla IV.38, se muestra el ANOVA. Ambas variables independientes resultaron significativas.

En la Figura IV.34 se muestra la superficie de respuesta para los efectos de la relación CP:MP y la relación molar AA:Fe en la solubilidad de hierro de las microcápsulas a pH 2



**Figura IV.34.** Superficie de respuesta correspondiente a los efectos de la relación concentrado proteico: material de pared (CP:MP) y la relación molar ácido ascórbico: hierro (AA:Fe) en la solubilidad de hierro de las microcápsulas a pH 2.

Las ecuaciones de los modelos ajustados para solubilidad de hierro a pH 2 y secuencial 2- 6,5 fueron:

$$S_{Fe\text{pH}2,0} (\%) = 105,043 + 0,232558 * CP:MP + 2,0 * AA:Fe - 0,878553 * CP:MP * AA:Fe$$

La solubilidad del hierro (SFe) a pH 2 de las microcápsulas estuvo en el rango de 84,3 a 100%, y correlacionó inversamente con la proporción CP:MP a baja y alta relación molar AA:Fe. Como se mencionó anteriormente en el capítulo IV.1 las proteínas de HM tienen baja solubilidad a pH ácidos. La menor solubilidad de las proteínas a este pH podría disminuir la solubilidad del hierro ligado a la proteína, efecto que sería mayor al aumentar la concentración proteica. Respecto a la relación AA:Fe, se observa que, al menor nivel de CP, no hay efecto de dicha relación en la solubilidad del hierro; pero que, al mayor nivel de CP, una mayor proporción molar AA:Fe disminuye la solubilidad del hierro. Si bien esto es difícil de explicar, se podría suponer una interacción más fuerte del hierro con la proteína, lo que disminuiría su solubilización a partir de las cápsulas.

La SFe a pH secuencial 2-6,5 de las microcápsulas estuvo en el rango de 39,4 a 94,0%, siendo los valores inferiores que a pH 2. En principio, la solubilidad del hierro es menor a pH neutro que ácido. In vivo, al pH del duodeno (alrededor de 6,5), el hierro férrico es insoluble, mientras que el hierro ferroso sigue siendo soluble (Bryszewska y col., 2019).

A su vez, a pH neutro podría reforzarse la interacción del hierro con las proteínas, de modo que su solubilidad disminuye al aumentar CP, en mayor medida que a pH 2. Como se mencionó anteriormente, el AA promueve la solubilidad del hierro, por lo que es difícil de explicar el efecto de la disminución de la solubilidad, al incrementarse la relación molar AA:Fe. Evidentemente, se refuerzan las interacciones del hierro en las microcápsulas impidiendo su liberación.

#### **IV.4.4.3. Solubilidad proteica a pH 2 y secuencial 2-6,5.**

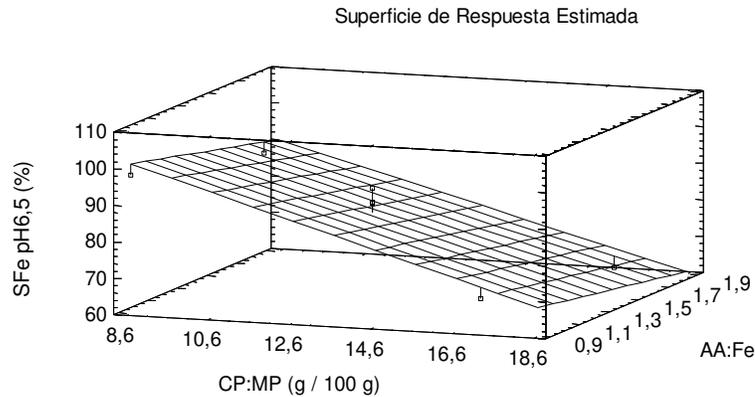
Se evaluó el efecto del pH de la digestión gastrointestinal (pH2 y secuencial pH 2- 6,5) en la liberación de proteínas de las microcápsulas. En la Tabla IV.38 se muestra el ANOVA.

Las ecuaciones de los modelos ajustados para solubilidad de las proteínas a pH 2 y secuencial 2- 6,5 fueron:

$$SP_{pH\ 2} (\%) = 143,232 - 5,02326 * CP:MP - 7,0*AA:Fe + 0,400517 * CP:MP * AA:Fe$$

$$SP_{pH\ 2-6,5} (\%) = 141,829 - 3,62791 * CP:MP - 13,4444 * AA:Fe - 0,335917 * CP:MP * AA:Fe$$

En la Figura IV.35, se muestra la superficie de respuesta para los efectos de la relación CP:MP y la relación molar AA:Fe en la solubilidad de las proteínas de las microcápsulas a pH 2 y secuencial 2-6,5.



**Figura IV.35.** Superficie de respuesta correspondiente a los efectos de la relación concentrado proteico: material de pared (CP:MP) y la relación molar ácido ascórbico: hierro (AA:Fe) en la solubilidad proteica de las microcápsulas a pH secuencial 2-6,5.

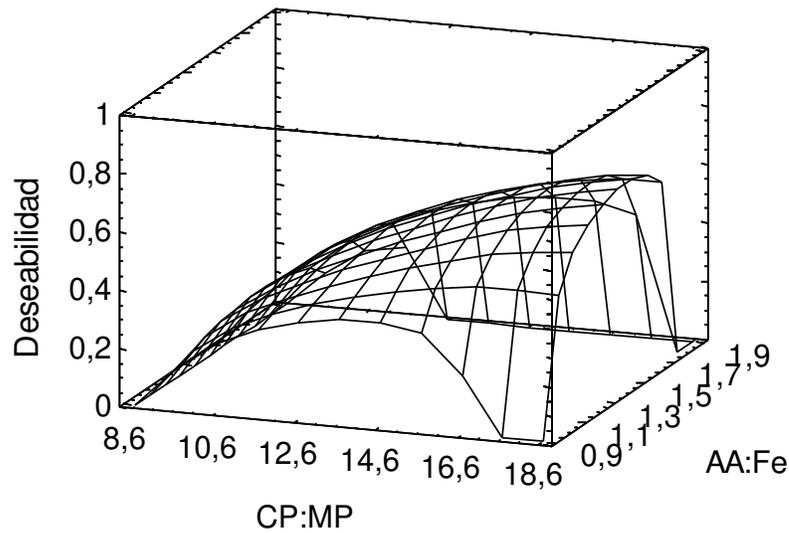
La solubilidad proteica (SP) a pH 2 estuvo en el rango de 59,8 a 96,8%. Sólo el efecto de la proporción CP:MP fue significativa. La solubilidad de las proteínas disminuyó al aumentar la concentración de CP en el material de pared.

La SP a pH secuencial 2-6,5 estuvo en el rango de 61,8-98,0%, siendo mayor que a pH 2. Sólo el efecto de la proporción CP:MP fue significativa

Estos resultados evidencian que a pH 2, habría una alta solubilización del Fe y de proteínas; pero al cambiar el pH a 6,5, (simulando lo que ocurre en el sitio de absorción del hierro), la SFe% disminuiría respecto de pH 2, mientras que la SP% aumentaría. Cabe destacar que los valores de SFe%, obtenidos a pH neutro, fueron altos, lo que indicaría una interacción con la proteína, ya que el AA ejerce su efecto complejante y reductor a pH ácido (Hurrell y Egli 2010).

#### **IV.4.5. Optimización y validación del modelo.**

Se realizó una optimización de respuesta múltiple de EFe, BFe, EAA y QFe, utilizando la función de deseabilidad de Derringer (Figura IV.36). El valor de la función de deseabilidad global fue 0,7447 y las condiciones óptimas obtenidas fueron 17,2 g de proteína / 100 g de material de encapsulación y una relación molar de AA: Fe de 1,5.



**Figura IV.36.** Optimización de superficie de respuesta correspondiente a los efectos de la relación concentrado proteico: material de pared (CP:MP) y la relación molar ácido ascórbico: hierro (AA:Fe) en las microcápsulas del hierro

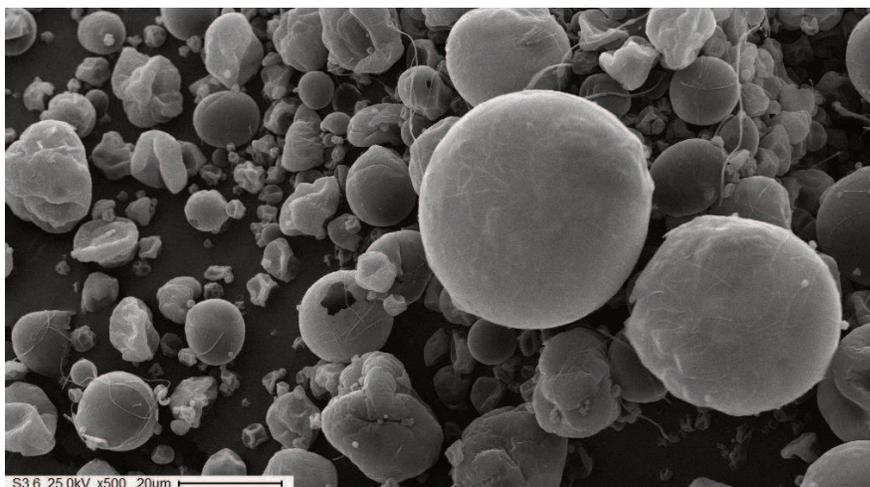
La idoneidad del modelo matemático generado para predecir el máximo EFe, BFe, EAA y QFe se validó experimentalmente, utilizando las condiciones determinadas en la optimización. Los valores experimentales, así como los pronosticados por el modelo matemático generado, mostraron una concordancia adecuada ( $p > 0,05$ ) (Tabla IV.39).

**Tabla IV.39.** Valores previstos y experimentales de las microcápsulas, obtenidos en condiciones óptimas

<b>Modelo de validación</b>	<b>EFe (%)</b>	<b>EAA (%)</b>	<b>QFe (%)</b>	<b>BFe (%)</b>
<i>Valores previstos</i>	90,96	72,50	53,62	30,2
<i>Valores experimentales</i>	91,6±2,7	71,3±1,5	52,1±2,3	28,9±2,2

La Figura IV.37 muestra la morfología de las microcápsulas obtenidas en condiciones óptimas.

Las microcápsulas tuvieron un tamaño medio de  $10,4 \pm 0,5 \mu\text{m}$  y presentaron superficies externas redondas con algunas concavidades, típicas de productos atomizados (Mohan y col., 2015).



**Figura IV.37.** Micrografía de SEM de las microcápsulas obtenidas con la formulación óptima.

#### **IV.5. Conclusiones parciales**

- Se formularon diferentes microcápsulas, usando un diseño experimental considerando los efectos de las proteínas del concentrado proteico de HM como material de pared y el ácido ascórbico como potenciador de la biodisponibilidad del hierro.
- Las proteínas y polipéptidos del concentrado proteico de HM desempeñaron un papel importante como material de pared, no sólo como componente estructural, sino también por su capacidad quelante y antioxidante, previniendo la oxidación del ácido ascórbico durante el proceso de secado por aspersion y manteniendo el hierro en una forma soluble bajo condiciones ambientales del tracto gastrointestinal.
- El procedimiento de optimización permitió obtener un fortificante con mayor bioaccesibilidad y contenido de hierro.

- Teniendo en cuenta que los principales materiales de pared están hechos de componentes solubles (maltodextrina, goma garrofín, proteínas), y que esto puede afectar la estabilidad de las microcápsulas durante el almacenamiento, la aplicación potencial de este producto es para fortificar alimentos en polvo, como sopas secas, polvos para preparar bebidas de chocolate, etc.

## **V. CONCLUSIONES**

- Se obtuvo un concentrado proteico a partir de la hez de malta húmeda producida localmente (ciudad de Santa Fe), a fin de valorizar el principal subproducto de la industria cervecera.
- Las proteínas extraídas presentaron capacidad filmogénica y espumante, aunque necesitaron de un plastificante y un hidrocoloide, respectivamente, para mejorar estas propiedades. Además, exhibieron propiedades gelificantes y demostraron tener aptitud para ser utilizados como material encapsulante con características bioactivas antioxidantes.
- El uso de proteínas de fuentes consideradas desechos podría contribuir no sólo a darles un alto valor agregado, sino también a la sostenibilidad de los sistemas alimentarios reduciendo los impactos ambientales y económicos del desperdicio de alimentos.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, S., & Azari, S. (2011). Efficiency of novel iron microencapsulation techniques: Fortification of milk. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(9), 1927–1933. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02703.x>
- Abbou, A., Kadri, N., Dahmoune, F., Chergui, A., Remini, H., Berkani, F., Adel, K., Boukhalfa, F., & Madani, K. (2020). Optimising functional properties and chemical composition of *Pinus halepensis* Mill. Seeds protein concentrates. *Food Hydrocolloids*, 100, 105416. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105416>
- Akbarbaglu, Z., Mahdi Jafari, S., Sarabandi, K., Mohammadi, M., Khakbaz Heshmati, M., & Pezeshki, A. (2019). Influence of spray drying encapsulation on the retention of antioxidant properties and microstructure of flaxseed protein hydrolysates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 178(January), 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.038>
- Alaiz, M., Navarro, J. L., Girón, J., & Vioque, E. (1992). Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography A*, 591(1), 181–186.
- Ali, S. S., Elsamahy, T., Koutra, E., Kornaros, M., El-Sheekh, M., Abdelkarim, E. A., D., Z., & Sun, J. (2021). Degradation of conventional plastic wastes in the environment: A review on current status of knowledge and future perspectives of disposal. *The Science of the Total Environment*, 1, 771:144719. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144719>
- Ali, Sameh S, Elsamahy, T., Abdelkarim, E. A., Al-Tohamy, R., Kornaros, M., Ruiz, H. A., Zhao, T., Li, F., & Sun, J. (2022). Biowastes for biodegradable bioplastics production and end-of-life scenarios in circular bioeconomy and biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 363, 127869. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127869>
- Alvarado, J. de D. (2012). *Propiedades Termodinámicas relacionadas con el agua constitutiva de Alimentos* (P. Alvarado (ed.); I).
- AOAC. (2000). *Official methods of analysis of AOAC Intl.*

- Arauzo, P. J., Du, L., Olszewski, M. P., Meza Zavala, M. F., Alhnidi, M. J., & Kruse, A. (2019). Effect of protein during hydrothermal carbonization of brewer's spent grain. *Bioresource Technology*, 293(July). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122117>
- Arendt, E. K., & Zannini, E. (2013). Cereal Grains for the Food and Beverage Industries. In *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries*. <https://doi.org/10.1533/9780857098924>
- Asghari-Varzaneh, E., Shahedi, M., & Shekarchizadeh, H. (2017). Iron microencapsulation in gum tragacanth using solvent evaporation method. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 640–647. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.047>
- Ayala-Soto, F. E., Serna-Saldívar, S. O., & Welti-Chanes, J. (2016). Effect of processing time, temperature and alkali concentration on yield extraction, structure and gelling properties of corn fiber arabinoxylans. *Food Hydrocolloids*, 60, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.014>
- Baeza, R., Pilosof, A. M. R., Sanchez, C. C., & Rodríguez Patino, J. M. (2006). Adsorption and Rheological properties of Biopolymers at the Air-Water Interface. *American Institute of Chemical Engineers*, 52(7), 2627–2638. <https://doi.org/10.1002/aic>
- Bamdad, F., & Chen, L. (2013). Antioxidant capacities of fractionated barley hordein hydrolysates in relation to peptide structures. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57, 493–503.
- Bamdad, Fatemeh, Wu, J., & Chen, L. (2011). Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein. *Journal of Cereal Science*, 54(1), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.01.006>
- Bandeira Da Cruz, D., Da Silva, W. S. V., Dos Santos, I. P., Zavareze, E. D. R., & Elias, M. C. (2015). Structural and technological characteristics of starch isolated from sorghum as a function of drying temperature and storage time. *Carbohydrate Polymers*, 133, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.003>
- Barak, S., & Mudgil, D. (2014). Locust bean gum: Processing, properties and food

- applications-A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *66*, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.017>
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1767*(9), 1073–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>
- Behrouzain, F., Razavi, S. M. A., & Joyner, H. (2020). Mechanisms of whey protein isolate interaction with basil seed gum: Influence of pH and protein-polysaccharide ratio. *Carbohydrate Polymers*, *232*, 115775. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115775>
- Benkovská, D., Flodrová, D., Psota, V., & Bobáľová, J. (2011). Vliv pivovarského procesu na profil proteinů ječmene. *Kvasny Prum*, *2011*(57 (7-8)), 260–265. <https://doi.org/10.18832/kp2011029>
- Bolontrade, A. J., Scilingo, A. A., & Añón, M. C. (2016). Amaranth proteins foaming properties: Film rheology and foam stability - Part 2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *141*, 643–650. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.10.061>
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, *3*(3), 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Bryszewska, M., Tomás-Cobos, L., Gallego, E., Villalba, M., Rivera, D., Taneyo Saa, D., & Gianotti, A. (2019). *In vitro* bioaccessibility and bioavailability of iron from breads fortified with microencapsulated iron. *LWT-Food Science and Technology*, *99*, 431–437. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.071>
- Caetano-Silva, M., Netto, F., Bertoldo-Pacheco, M., Alegría, A., & Cilla, A. (2020). Peptide-metal complexes: Obtention and role in increasing bioavailability and decreasing the pro-oxidant effect of minerals. *Critical. Reviews in Food Science and Nutrition*, *0*, 1–20. <https://doi.org/https://10.1080/10408398.2020.1761770>.
- Calva-Estrada, S. J., Jiménez-Fernández, M., & Lugo-Cervantes, E. (2019). Protein-based films: Advances in the development of biomaterials applicable to food packaging. *Food Engineering Reviews*, *11*(2), 78–92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12393-019-09189-w>

- Carvalho, F., Esteves, M. P., Parajó, J. C., Pereira, H., & Gírio, F. M. (2004). Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresource Technology*, *91*, 93–100.
- Celus, I., Brijs, K., & Delcour, J. (2007). Enzymatic Hydrolysis of Brewers' Spent Grain Proteins and Technofunctional Properties of the Resulting Hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 8703–8710.
- Celus, I., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2006). *The effects of malting and mashing on barley protein extractability*. *44*, 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.06.003>
- Celus, I., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2009). Fractionation and characterization of brewers' spent grain protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(12), 5563–5570. <https://doi.org/10.1021/jf900626j>
- Chetrariu, A., & Dabija, A. (2020). Brewer's Spent Grains: Possibilities of Valorization, a Review. *Applied Sciences*, *10*(16), 5619. <https://doi.org/10.3390/app10165619>
- Chin, Y. L., Chai, K. F., & Chen, W. N. (2022). Upcycling of brewers' spent grains via solid-state fermentation for the production of protein hydrolysates with antioxidant and techno-functional properties. *Food Chemistry: X*, *13*(September 2021), 100184. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100184>
- Choi, M. S., Choi, Y. S., Kim, H. W., Hwang, K. E., Song, D. H., Lee, S. Y., & Kim, C. J. (2014). Effects of replacing pork back fat with brewer's spent grain dietary fiber on quality characteristics of reduced-fat chicken sausages. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, *34*(2), 158–165. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2014.34.2.158>
- Churio, O., & Valenzuela, C. (2018). Development and characterization of maltodextrin microparticles to encapsulate heme and non-heme iron. *LWT - Food Science and Technology*, *96*, 568–575. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.072>
- Cian, R., Drago, S., De Greef, M., Torres, R., & Gonzáles, R. (2010). Iron and zinc availability and some physical characteristics from extruded products with added concentrate and hydrolysates from bovine hemoglobin. *International*

*Journal of Food Science & Nutrition*, 61, 573–582.

- Cian, R. E., Alaiz, M., Vioque, J., & Drago, S. R. (2013). Enzyme proteolysis enhanced extraction of ACE inhibitory and antioxidant compounds (peptides and polyphenols) from *Porphyra columbina* residual cake. *Journal of Applied Phycology*, 25, 1197–1206. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10811-012-9913-2>
- Cian, R. E., Garzón, A. G., Martínez-augustin, O., Botto, C. C., & Drago, S. R. (2018). Antithrombotic Activity of Brewers ' Spent Grain Peptides and their Effects on Blood Coagulation Pathways. *Plant Foods for Human Nutrition*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11130-018-0682-1>
- Cian, R. E., Martínez-Augustin, O., & Drago, S. R. (2012). Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*. *Food Research International*, 49(1), 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.003>
- Cian, R. E., Proaño, J. L., Salgado, P. R., Mauri, A. N., & Drago, S. R. (2020). High iron bioaccessibility from co-microencapsulated iron / ascorbic acid using chelating polypeptides from brewers' spent grain protein as wall material. *LWT-Food Science and Technology*, September. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110579>
- Cian, R. E., Salgado, P. R., Drago, S. R., González, R. J., & Mauri, A. N. (2014). Development of naturally activated edible films with antioxidant properties prepared from red seaweed *Porphyra columbina* biopolymers. *Food Chemistry*, 146, 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.133>
- Cian, R. E., Vioque, J., & Drago, S. R. (2015). Structure – mechanism relationship of antioxidant and ACE I inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate fractionated by pH. *Food Research International*, 69, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.036>
- Cian, R., Garzón, A., Betancur-Ancona, D., Chel-Guerrero, L., & Drago, S. (2016). Chelating properties of peptides from red seaweed *Pyropia columbina* and its effect on iron bio-accesibility. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(71), 96–101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11130-016-0533-x>

- Connolly, A., Cermeño, M., Crowley, D., O'Callaghan, Y., O'Brien, N. M., & FitzGerald, R. J. (2019). Characterisation of the *in vitro* bioactive properties of alkaline and enzyme extracted brewers' spent grain protein hydrolysates. *Food Research International*, 121(July 2018), 524–532. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.008>
- Connolly, A., Piggott, C. O., & Fitzgerald, R. J. (2013). Characterisation of protein-rich isolates and antioxidative phenolic extracts from pale and black brewers' spent grain. *International Journal of Food Science & Technology*, 48, 1670–1681. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12137>
- Connolly, A., Piggott, C. O., & Fitzgerald, R. J. (2014). Technofunctional properties of a brewers' spent grain protein-enriched isolate and its associated enzymatic hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 1061–1067. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.054>
- Croguennec, T., Renault, A., Beaufils, S., Dubois, J. J., & Pezenec, S. (2007). Interfacial properties of heat-treated ovalbumin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 315(2), 627–636. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.07.041>
- Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B., & López-Fandiño, R. (2004). Antioxidant Activity of Peptides Derived from Egg White Proteins by Enzymatic Hydrolysis. *Food Protection*, 67(9), 1939–1944. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.9.1939>
- de Azevedo Bittencourt, L. L., Pedrosa, C., de Sousa, V. P., Trindade Pierucci, A. P., & Citelli, M. (2013). Pea Protein Provides a Promising Matrix for Microencapsulating Iron. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(4), 333–339. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0383-8>
- del Río, J. C., Prinsen, P., & Gutiérrez, A. (2013). Chemical composition of lipids in brewer's spent grain: A promising source of valuable phytochemicals. *Journal of Cereal Science*, 58(2), 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.07.001>
- Derringer, G., & Suich, J. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, 12, 214–219. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>
- Dickinson, E. (2008). Interfacial structure and stability of food emulsions as

- affected by protein–polysaccharide interactions. *Soft Matter*, 4(6), 1147–1150. <https://doi.org/10.1039/b800106e>
- Dickinson, E. (2010). Food emulsions and foams: Stabilization by particles. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15(1–2), 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.001>
- Dickinson, E. (2020). Advances in food emulsions and foams: reflections on research in the neo-Pickering era. *Current Opinion in Food Science*, 33, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.12.009>
- Dionísio, M., & Grenha, A. (2012). Locust bean gum: Exploring its potential for biopharmaceutical applications. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4(3), 175–185. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.99013>
- Dombrowski, J., Johler, F., Warncke, M., & Kulozik, U. (2016). Correlation between bulk characteristics of aggregated  $\beta$ -lactoglobulin and its surface and foaming properties. *Food Hydrocolloids*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.027>
- Drago, S., Binaghi, M., & Valencia, M. (2005). Effect of gastric digestion pH on iron, zinc and calcium availability from preterm and term starting infant formulas. *Journal Food Science*, 70, 107–112.
- Drago, S. R., & González, R. J. (2000). Foaming properties of enzymatically hydrolysed wheat gluten. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1(4), 269–273. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(00\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00034-5)
- El-Shafey, E. I., Gameiro, M. L. F., Correia, P. F. M., & Carvalho, J. M. R. de. (2004). Dewatering of Brewer's Spent Grain Using a Membrane Filter Press: A Pilot Plant Study. *Separation Science and Technology*, 39(14), 3237–3261. <https://doi.org/10.1081/SS-200028775>
- Elkhalifa, A. E. O., & Bernhardt, R. (2010). Influence of grain germination on functional properties of sorghum flour. *Food Chemistry*, 121(2), 387–392. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.041>
- Elkhalifa, A. E. O., & Bernhardt, R. (2013). Some physicochemical properties of flour from germinated sorghum grain. *Journal of Food Science and Technology*, 50(1), 186–190. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0315-2>
- Escobar, D. (2016). *Análisis Termodinámico de Microcápsulas de jugo de*

*maracuyá (passiflora edulis f. flavicarpa) obtenidas mediante secado por aspersión para establecer condiciones de estabilidad durante su almacenamiento.* Universidad Autónoma del estado de México.

- Estevinho, B. N., Rocha, F., Santos, L., & Alves, A. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review. *Trends in Food Science and Technology*, 31(2), 138–155. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.04.001>
- Falke, S., & Betzel, C. (2019). *Dynamic Light Scattering (DLS)*. Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-28247-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-28247-9_6)
- Farcas, A. C., Socaci, S. A., Dulf, F. V., Tofana, M., Mudura, E., & Diaconeasa, Z. (2015). Volatile profile, fatty acids composition and total phenolics content of brewers' spent grain by-product with potential use in the development of new functional foods. *Journal of Cereal Science*, 64, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.04.003>
- Fărcaș, A. C., Socaci, S. A., Mudura, E., Dulf, F. V., Vodnar, D. C., Tofană, M., & Salanță, L. C. (2017). Exploitation of Brewing Industry Wastes to Produce Functional Ingredients. In M. Kanauchi (Ed.), *Brewing Technology* (pp. 137–156). Intech Open (2017). <https://doi.org/10.5772/intechopen.69231>
- Faulds, C., Collins, S., Robertson, J., Treimo, J., Eijnsink, V., Hinz, S., Schols, H. A., Buchert, J., & Waldron, K. W. (2009). Protease-induced solubilisation of carbohydrates from brewers' spent grain. *Journal of Cereal Science*, 50(3), 332–336. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.01.004>
- Felix, M., Bascon, C., Cermeño, M., FitzGerald, R. J., de la Fuente, J., & Carrera-Sánchez, C. (2020). Interfacial/foaming properties and antioxidant activity of a silkworm (*Bombyx mori*) pupae protein concentrate. *Food Hydrocolloids*, 103(January). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105645>
- Felix, M., Romero, A., Carrera-sanchez, C., & Guerrero, A. (2018). Modelling the non-linear interfacial shear rheology behaviour of chickpea protein adsorbed complex oil/water layers. *Applied Surface Science*. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.11.074>
- Felix, M., Romero, A., Carrera-Sanchez, C., & Guerrero, A. (2019). Assessment of

- interfacial viscoelastic properties of Faba bean (*Vicia faba*) protein-adsorbed O/W layers as a function of pH. *Food Hydrocolloids*, *90*(August 2018), 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.036>
- Felix, M., Romero, A., & Guerrero, A. (2017). Viscoelastic properties, microstructure and stability of high-oleic O / W emulsions stabilised by crayfish protein concentrate and xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, *64*, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.028>
- Ferrari, A., Vinderola, G., & Weil, R. (2020). Alimentos fermentados microbiología. In *Instituto Danone* (Vol. 1, Issue 1). [https://www.researchgate.net/publication/269107473\\_What\\_is\\_governance/link/548173090cf22525dcb61443/download%0Ahttp://www.econ.upf.edu/~reynal/Civil\\_wars\\_12December2010.pdf%0Ahttps://think-asia.org/handle/11540/8282%0Ahttps://www.jstor.org/stable/41857625](https://www.researchgate.net/publication/269107473_What_is_governance/link/548173090cf22525dcb61443/download%0Ahttp://www.econ.upf.edu/~reynal/Civil_wars_12December2010.pdf%0Ahttps://think-asia.org/handle/11540/8282%0Ahttps://www.jstor.org/stable/41857625)
- Fioramonti, S. A., Perez, A. A., Aringoli, E. E., Rubiolo, A. C., & Santiago, L. G. (2014). Design and characterization of soluble biopolymer complexes produced by electrostatic self-assembly of a whey protein isolate and sodium alginate. *Food Hydrocolloids*, *35*, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.05.001>
- Forsell, P., Treimo, J., Eijsink, V. G. H., Faulds, C. B., Collins, S., Schols, H. A., Hinz, S. W. A., Myllymäki, O., Tamminen, T., Zoldners, J., Viljanen, K., Waldron, K. W., & Buchert, J. (2011). Enzyme-aided fractionation of brewer's spent grains in pilot scale. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *69*(2), 91–99. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2011-0408-01>
- Forsell, Pirkko, Kontkanen, H., Schols, H. A., Hinz, S., Eijsink, V. G. H., Treimo, J., Robertson, J. A., Waldron, K. W., Faulds, C. B., & Buchert, J. (2008). Hydrolysis of brewers' spent grain by carbohydrate degrading enzymes. *Journal of the Institute of Brewing*, *114*(4), 306–314. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2008.tb00774.x>
- Galazka, V. B., Dickinson, E., & Ledward, D. A. (2000). Influence of high pressure on interactions of 11S globulin vicia faba with ι-carrageenan in bulk solution and at interfaces. *Food Hydrocolloids*, *14*(6), 551–560.

[https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(00\)00035-7](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(00)00035-7)

- Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., & Oromiehie, A. (2011). International Journal of Biological Macromolecules Rheological and structural characterisation of film-forming solutions and biodegradable edible film made from kefiran as affected by various plasticizer types. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(4), 814–821. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.07.018>
- Giraldo, P., Benavente, E., Manzano-Agugliaro, F., & Gimenez, E. (2019). Worldwide research trends on wheat and barley: A bibliometric comparative analysis. *Agronomy*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/agronomy9070352>
- Goswami, P., & O’Haire, T. (2016). 3 - Developments in the use of green (biodegradable), recycled and biopolymer materials in technical nonwovens,. *Advances in Technical Nonwovens*, 97–114. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100575-0.00003-6>.
- Gotić, M., & Musić, S. (2007). Mössbauer, FT-IR and FE SEM investigation of iron oxides precipitated from FeSO<sub>4</sub> solutions. *Journal of Molecular Structure*, 834–836(SPEC. ISS.), 445–453. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2006.10.059>
- Greenspan, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards – Physics and Chemistry*, 81(1), 89–96.
- Guerrero, P., & Caba, K. De. (2010). Thermal and mechanical properties of soy protein films processed at different pH by compression. *Journal of Food Engineering*, 100(2), 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.04.008>
- Hamdani, A., & Wani, I. (2017). Guar and Locust bean gum: Composition, total phenolic content, antioxidant and antinutritional characterization. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 11, 53–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2017.07.004>
- Haros, M., & Suarez, C. (2001). *Corn steeping : infuence of time and lactic acid on isolation and thermal properties of starch*. 48, 251–256.
- He, Y., Kuhn, D. D., Ogejo, J. A., O’Keefe, S. F., Fraguas, C. F., Wiersema, B. D.,

- Jin, Q., Yu, D., & Huang, H. (2019). Wet fractionation process to produce high protein and high fiber products from brewer's spent grain. *Food and Bioproducts Processing*, 117, 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.07.011>
- He, Z., Ma, T., Zhang, W., Su, E., Cao, F., Huang, M., & Wang, Y. (2021). Heat-induced gel formation by whey protein isolate-Lycium barbarum polysaccharides at varying pHs. *Food Hydrocolloids*, 115(November 2020), 106607. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106607>
- Hellebois, T., Gaiani, C., Planchon, S., Renaut, J., & Soukoulis, C. (2021). Impact of heat treatment on the acid induced gelation of brewers' spent grain protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 113(April 2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106531>
- Hough, J. S. (1991). *The biotechnology of malting and brewing* (I).
- Hurrell, R., & Egli, I. (2010). Iron bioavailability and dietary reference values. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5), 1461S–1467S. <https://doi.org/https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.28674F>
- Ibarruri, J., Cebrián, M., & Hernández, I. (2019). Solid State Fermentation of Brewer's Spent Grain Using *Rhizopus* sp. to Enhance Nutritional Value. *Waste and Biomass Valorization*, 10(12), 3687–3700. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00654-5>
- Ibbett, R., White, R., Tucker, G., & Foster, T. (2019). Hydro-mechanical processing of brewer ' s spent grain as a novel route for separation of protein products with differentiated techno-functional properties. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 56(May), 102184. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102184>
- Idrees, M., Adnan, A., & Qureshi, F. A. (2013). *Optimization of Sulfide / Sulfite Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Lactic Acid Production. 2013.*
- Ikram, S., Huang, L. Y., Zhang, H., Wang, J., & Yin, M. (2017). Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain. In *Journal of Food Science* (Vol. 82, Issue 10, pp. 2232–2242). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13794>

- Ishiwaki, N., Murayama, H., Awayama, H., Kanauchi, O., & Sato, T. (2000). Development of high value uses of spent grain by fractionation technology. *Technical Quarterly-Master Brewers Association of the Americas*, *37*(2), 261–265.
- Jaeger, A., Zannini, E., Sahin, A. W., & Arendt, E. K. (2021). Barley Protein Properties, Extraction and Applications, with a Focus on Brewers' Spent Grain Protein. *Foods*, *10*(6), 1389. <https://doi.org/10.3390/foods10061389>
- Jafarzadeh, S., Alias, A. K., Ariffin, F., & Mahmud, S. (2018). Physico-mechanical and microstructural properties of semolina flour films as influenced by different sorbitol / glycerol concentrations. *International Journal of Food Properties*, *21*(1), 983–995. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1474056>
- Jamshidi, A., Cao, H., Xiao, J., & Simal-Gandara, J. (2020). Advantages of techniques to fortify food products with the benefits of fish oil. *Food Research International*, *137*(May), 109353. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109353>
- Jarpa-Parra, M., Tian, Z., Temelli, F., Zeng, H., & Chen, L. (2016). Understanding the stability mechanisms of lentil legumin-like protein and polysaccharide foams. *Food Hydrocolloids*, *61*, 903–913. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.07.017>
- Jones, O. G., & McClements, D. J. (2011). Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein-polysaccharide complexes. *Advances in Colloid and Interface Science*, *167*(1–2), 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.10.006>
- Jonsson, L. J., & Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose:formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, *199*, 103–112.
- Joshi, M., Aldred, P., Panozzo, J. F., Kasapis, S., & Adhikari, B. (2014). Rheological and microstructural characteristics of lentil starch-lentil protein composite pastes and gels. *Food Hydrocolloids*, *35*, 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.05.016>
- Kaewprachu, B. P., Osako, K., Benjakul, S., Tongdeesoontorn, W., & Rawdkuen,

- S. (2016). Biodegradable Protein-based Films and Their Properties: A Comparative Study. *Packaging Technology and Science*, December 2015, 77–90. <https://doi.org/10.1002/pts.2183>
- Kasapis, S., Norton, I. T., & Ubbink, J. B. (2009). *Modern Biopolymer Science: Bridging the Divide between Fundamental Treatise and Industrial Application* (A. Press (ed.)). Elsevier Science. <https://books.google.com.ar/books?id=vHXw8vs7scYC>
- Kemppainen, K., Rommi, K., Holopainen, U., & Kruus, K. (2016). Kemppainen, K., et al. "Steam explosion of Brewer's spent grain improves enzymatic digestibility of carbohydrates and affects solubility and stability of proteins." *Applied biochemistry and biotechnology* 180.1 (2016): 94-108. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(1), 94–108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12010-016-2085-9>
- Khemakhem, M., Attia, H., & Ayadi, M. A. (2019). The effect of pH, sucrose, salt and hydrocolloid gums on the gelling properties and water holding capacity of egg white gel. *Food Hydrocolloids*, 87, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.041>
- Klassen, D. R., Elmer, C. M., & Nickerson, M. T. (2011). Associative phase separation involving canola protein isolate with both sulphated and carboxylated polysaccharides. *Food Chemistry*, 126(3), 1094–1101. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.138>
- Klinjapo, R., & Krasaekoopt, W. (2018). Microencapsulation of Color and Flavor in Confectionery Products. In *Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811518-3.00014-4>
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & 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 Chemistry*, 102(4), 1317–1327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.016>
- Kontoghiorghes, G. J., Kolnagou, A., Kontoghiorghes, C. N., Mourouzidis, L.,

- Timoshnikov, V. A., & Polyakov, N. E. (2020). Trying to Solve the Puzzle of the Interaction of Ascorbic Acid and Iron: Redox, Chelation and Therapeutic Implications. *Medicines*, 7(8), 45. <https://doi.org/10.3390/medicines7080045>
- Kowalczyk, D., & Baraniak, B. (2011). Effects of plasticizers , pH and heating of film-forming solution on the properties of pea protein isolate films. *Journal of Food Engineering*, 105(2), 295–305. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.037>
- Kurozawa, L. E., Park, K. J., & Hubinger, M. D. (2009). Effect of maltodextrin and gum arabic on water sorption and glass transition temperature of spray dried chicken meat hydrolysate protein. *Journal of Food Engineering*, 91(2), 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.09.006>
- Laemmli, U. k. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In *Nature* (pp. 227-680.).
- Laine, C., Kemppainen, K., Kuutti, L., Varhimo, A., Asikainen, S., Gronroos, A., Maattanen, M., Buchert, J., & Harlin, A. (2015). Extraction of xylan from wood pulp and brewer's spent grain. *Industrial Crops and Products*, 70, 231–237.
- Le Meste, M., Colas, B., Simatos, D., Closs, B., Courthaudon, J. L., & Lorient, D. (1990). Contribution of protein flexibility to the foaming properties of casein. *Food Science*, 55, 1445–1447.
- Lee, J.-H. J.-H., Lee, J.-H. J.-H., Yang, H., & Song, K. Bin. (2015). Preparation and characterization of brewer's spent grain protein-chitosan composite films. *Journal of Food Science and Technology*, 52(11), 7549–7555. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13197-015-1941-x>
- Leleco. (2019, August 2). Las cervecerías industriales de Argentina elaboran 20,4 millones de hectolitros anuales. *Pulso Cervecerero*. <https://pulsocervecerero.com/las-cervecerias-industriales-de-argentina-elaboran-204-millones-de-hectolitros-anuales/>
- Li, J., Li, X., Wang, C., Zhang, M., Xu, Y., Zhou, B., Su, Y., & Yang, Y. (2018). Characteristics of gelling and water holding properties of hen egg white/yolk gel with NaCl addition. *Food Hydrocolloids*, 77, 887–893. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.034>

- Li, R., Wu, Z., Wangb, Y., Ding, L., & Wang, Y. (2016). Role of pH-induced structural change in protein aggregation in foam fractionation of bovine serum albumin. *Biotechnology Reports*, 9, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.01.002>
- Li, W., Yang, H., Coldea, T. E., & Zhao, H. (2021). Modification of structural and functional characteristics of brewer's spent grain protein by ultrasound assisted extraction. *Lwt*, 139(September), 110582. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110582>
- Liu, K., Kong, X. L., Li, Q. M., Zhang, H. L., Zha, X. Q., & Luo, J. P. (2020). Stability and bioavailability of vitamin D3 encapsulated in composite gels of whey protein isolate and lotus root amylopectin. *Carbohydrate Polymers*, 227(September 2019), 115337. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115337>
- Lo, B., Kasapis, S., & Farahnaky, A. (2021). Lupin protein: Isolation and techno-functional properties, a review. *Food Hydrocolloids*, 112(June 2020), 106318. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106318>
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, L., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Lowry, R. R., & Tinsley, I. J. (1976). Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 53(7), 470-472.
- Lv, Y., Liu, Q., Bao, X., Tang, W., Yang, B., & Guo, S. (2009). Identification and Characteristics of Iron-Chelating Peptides from Soybean Protein Hydrolysates Using IMAC-Fe<sup>3+</sup>. *Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4593–4597. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf9000204>
- Lynch, K. M., Steffen, E. J., & Arendt, E. K. (2016). Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 553–568. <https://doi.org/10.1002/jib.363>
- MacGregor, A. W. (2003). Barley - Origin Adaptation, and Production. *Food Technology*, 379–382.
- Mahieu, A., Terrie, C., & Leblanc, N. (2017). Research Article. Role of ascorbic acid and iron in mechanical and oxygen absorption properties of starch and polycaprolactone multilayer film. *Packaging Research*, 2(1), 1–11.

<https://doi.org/10.1515/pacres-2017-0001>

- Maiti, S., Dey, P., Banik, A., Sa, B., Ray, S., & Kaity, S. (2010). Tailoring of locust bean gum and development of hydrogel beads for controlled oral delivery of glipizide. *Drug Delivery*, 17(5), 288–300.  
<https://doi.org/10.3109/10717541003706265>
- Malvern Instruments Ltd. (2014). *Dynamic Light Scattering Basic Theory & Practical Application*.
- Marín-Peñalver, D., Alemán, A., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2021). Entrapment of natural compounds in spray-dried and heat-dried iota-carrageenan matrices as functional ingredients in surimi gels. *Food & Function*, 12, 2137–2147.
- Martinez, K. D., Baeza, R. I., Millán, F., & Pilosof, A. M. R. (2005). Effect of limited hydrolysis of sunflower protein on the interactions with polysaccharides in foams. *Food Hydrocolloids*, 19(3), 361–369.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.10.002>
- Martínez, K. D., Sánchez, C. C., Ruíz-Henestrosa, V. P., Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2007). Effect of limited hydrolysis of soy protein on the interactions with polysaccharides at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 21(5–6), 813–822.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.09.008>
- Masum, A. K. M., Chandrapala, J., Adhikari, B., Huppertz, T., & Zisu, B. (2019). Effect of lactose-to-maltodextrin ratio on emulsion stability and physicochemical properties of spray-dried infant milk formula powders. *Journal of Food Engineering*, 254(December 2018), 34–41.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.02.023>
- Matalanis, A., Jones, O. G., & McClements, D. J. (2011). Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1865–1880.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.04.014>
- Mauri, A. N., & Añón, M. C. (2008). Mechanical and physical properties of soy protein films with pH-modified microstructures. *Food Science and Technology*

<https://doi.org/https://doi.org/10.1177/1082013208092130>

- Mauri, A. N., Salgado, P. R., Condés, M. C., & Añón, C. (2016). Edible Films and Coatings. In M. L.-C. G. B.-C. MP Montero, MC Gómez-Guillén (Ed.), *Films and coatings from vegetable protein* (pp. 67–87).
- McCarthy, A L O'Callaghan, Y. C., Neugart, S., Piggott, C. O., Connolly, A., Jansen, M. A. K., Krumbein, A., Schreiner, M., FitzGerald, R. J., & O'Brien, N. M. (2013). The hydroxycinnamic acid content of barley and brewers' spent grain (BSG) and the potential to incorporate phenolic extracts of BSG as antioxidants into fruit beverages. *Food Chemistry*, *141*, 2567–2574.
- MENAFN. (2022). *Consumers lean towards RTD beverages, prompting beer market growth*. <https://menafn.com/1104095848/consumers-lean-towards-rtd-beverages-prompting-beer-market-growth>
- Miao, J., Liao, W., Pan, Z., Wang, Q., Duan, S., Xiao, S., Yang, Z., & Cao, Y. (2019). Isolation and identification of iron-chelating peptides from casein hydrolysates. *Food and Function*, *10*(5), 2372–2381. <https://doi.org/10.1039/c8fo02414f>
- Mihalca, V., Kerezsi, A. D., Weber, A., Gruber-traub, C., Schmucker, J., Anca, F., Vodnar, D. C., Dulf, F. V., Ancut, S., Suharoschi, R., & Pop, O. L. (2021). Applications. *Polymers*, 1–23. [htt](http://)
- Miller, D., Schricker, B., Rasmussen, R., & Campen, D. Van. (1981). Un método *in vitro* para la estimación de la disponibilidad de hierro a partir de las comidas. *Americana de Nutrición Clínica*, *34*, 2248–2256.
- Mishyna, M., Keppler, J. K., & Chen, J. (2021). Techno-functional properties of edible insect proteins and effects of processing. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *56*, 101508. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2021.101508>
- Misra, G. (2019). Chapter 3. Fluorescence spectroscopy. In G Misra (Ed.), *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources* (pp. 31–38). Academic P. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816548-5.00003-4>
- Mohammadi, F., & Moeeni, M. (2015). Analysis of binding interaction of genistein and kaempferol with bovine  $\alpha$ -lactalbumin. *Journal of Functional Foods*, *12*,

- 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.012>
- Mohan, A., Rajendran, S., He, Q., Bazinet, L., & Udenigwe, C. (2015). Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. *RSC Advances*, *5*, 7927079278. <https://doi.org/10.1039/C5RA13419F>
- Mohanan, A., Nickerson, M. T., & Ghosh, S. (2020). Utilization of pulse protein-xanthan gum complexes for foam stabilization: The effect of protein concentrate and isolate at various pH. *Food Chemistry*, *316*, 126282. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126282>
- Molina-Ortiz, S., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E. S., Trindade, M. A., Santana, A. S., & Favaro-Trindade, C. S. (2009). Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. *Food Science and Technology*, *42*, 919–925. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.12.004>
- Montellano Duran, N., Spelzini, D., Wayllace, N., Boeris, V., & Barroso, F. L. (2018). A combined experimental and molecular simulation study of factors influencing interaction of quinoa proteins – carrageenan. *International Journal of Biological Macromolecules*, *107*, 949–956. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.076>
- Moonen, P., Mermod, J. J., Ernst, J. F., Hirschi, M., & DeLamar, J. F. (1987). Increased biological activity of deglycosylated recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor produced by yeast or animal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(13), 4428–4431.
- Murray, B. S. (2020). Recent developments in food foams. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *50*, 101394. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.101394>
- Mussatto, S. I. (2014). Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *Journal of Science of Food Agriculture*, *94*(7), 1264–1275. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6486>
- Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2006). Brewer's spent grain: generation, characteristic and potential applications. *Journal of Cereal Science*

- 43, 1-14. *Journal of Cereal Science*, 43, 1–14.
- Mussatto, S. I., & Fernandes, M. (2007). *Lignin recovery from brewer's spent grain black liquor*. 70, 218–223. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.03.021>
- Mussatto, S. I., & Roberto, I. C. (2006). Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81(3), 268–274. <https://doi.org/10.1002/jctb.1374>
- Nagy, M., Semeniuc, C. A., Socaci, S. A., Pop, C. R., Rotar, A. M., Sălăgean, C. D., & Tofană, M. (2017). Utilization of brewer's spent grain and mushrooms in fortification of smoked sausages. *Food Science and Technology (Brazil)*, 37(2), 315–320. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.23816>
- Naibaho, J., Małgorzata, K., Wojdy, A., Muchdatul, H., Foste, M., & Yang, B. (2022). Techno-functional properties of protein from protease-treated brewers' spent grain ( BSG ) and investigation of antioxidant activity of extracted proteins and BSG residues. *Journal of Cereal Science Journal*, 107(July), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2022.103524>
- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., & Durrieu, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: a review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42, 469–479. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.035>
- Nielsen, P., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal Food Science*, 66, 642–646.
- Niemi, P., Faulds, C. B., Sibakov, J., Holopainen, U., Poutanen, K., & Buchert, J. (2012). Effect of a milling pre-treatment on the enzymatic hydrolysis of carbohydrates in brewer's spent grain. *Bioresource Technology*, 116, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.043>
- Niemi, P., Martins, D., Buchert, J., & Faulds, C. B. (2013). Pre-hydrolysis with carbohydrases facilitates the release of protein from brewer's spent grain. *Bioresource Technology*, 136, 529–534. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.076>
- Noman, A., Xu, Y., AL-Bukhaiti, W. Q., Abed, S. M., Ali, A. H., Ramadhan, A. H., &

- Xia, W. (2018). Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. *Process Biochemistry*, 67(September 2017), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.009>
- Norkaew, O., Thitisut, P., Mahatheeranont, S., Pawin, B., Sookwong, P., Yodpitak, S., & Lungkaphin, A. (2019). Effect of wall materials on some physicochemical properties and release characteristics of encapsulated black rice anthocyanin microcapsules. *Food Chemistry*, 294(December 2018), 493–502. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.086>
- Nunes Gil, P. C., Gandra, J. R., Taran, F. M. P., Gonzaga, I. V. F., & Gobesso, A. A. O. (2012). Influence of high levels of maltodextrin in horse diets. *Livestock Science*, 147(1–3), 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.04.003>
- Okamoto, H., Sato, K., Yagi, N., Inoue, M., Amasaki, S., Ishida, S., & Shibata, J. (2002). Development of production process of charcoal bricks from spent grain. *Kagaki Kogaku Ronbunshu*, 28(2), 137–142. <https://doi.org/10.1252/kakoronbunshu.28.137>
- Oliveira, A. C., Moretti, T. S., Boschini, C., Baliero, J. C. C., Freitas, O., & Favaro-Trindade, C. S. (2007). Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 24(7), 685–693. <https://doi.org/10.1080/02652040701532908>
- Osborne, T. B. (1909). *The vegetable proteins*. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=The Vegetable Proteins&publication\\_year=1909&author=T.B. Osborne](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=TheVegetableProteins&publication_year=1909&author=T.B.Osborne)
- Özvural, E. B., Vural, H., Gökbulut, İ., & Özboy-Özbaş, Ö. (2009). Utilization of brewer's spent grain in the production of Frankfurters. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(1093:1099). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01921.x>
- Parekh, I., Khanvilkar, A., & Naik, A. (2017). Barley–wheat brewers' spent grain: A potential source of antioxidant rich lipids. *Journal of Food Processing and*

- Preservation*, 41(6), 1–8. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13244>
- Pedroche, J., Yust, M. M., Lqari, H., Megias, C., Girón-Calle, J., Alaiz, M., & Millán, F. (2007). Obtaining of *Brassica carinata* protein hydrolysates enriched in bioactive peptides using immobilized digestive proteases. *Food Research International*, 40(7), 931–938. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.04.001>
- Peng, Z., Ji, C., Zhou, Y., Zhao, T., & Leblanc, R. M. (2020). Polyethylene glycol (PEG) derived carbon dots: Preparation and applications. *Applied Materials Today*, 20, 100677. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100677>
- Perez, A. A., Andermatten, R. B., Rubiolo, A. C., & Santiago, L. G. (2014). B - Lactoglobulin heat-induced aggregates as carriers of polyunsaturated fatty acids. *Food Chemistry*, 158, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.073>
- Perez, A. A., Carrara, C. R., Sánchez, C. C., Rodríguez Patino, J. M., & Santiago, L. G. (2009). Interactions between milk whey protein and polysaccharide in solution. *Food Chemistry*, 116(1), 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.017>
- Perez, A. A., Sánchez, C. C., Patino, J. M. R., Rubiolo, A. C., & Santiago, L. G. (2010). Milk whey proteins and xanthan gum interactions in solution and at the air-water interface: A rheokinetic study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(1), 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.06.021>
- Perez, A. A., Sánchez, C. C., Rodríguez Patino, J. M., Rubiolo, A. C., & Santiago, L. G. (2012). Effect of enzymatic hydrolysis and polysaccharide addition on the  $\beta$ -lactoglobulin adsorption at the air-water interface. *Journal of Food Engineering*, 109(4), 712–720. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.11.017>
- Perez, A. A., Sponton, O. E., Andermatten, R. B., Rubiolo, A. C., & Santiago, L. G. (2015). Biopolymer nanoparticles designed for polyunsaturated fatty acid vehiculization: Protein-polysaccharide ratio study. *Food Chemistry*, 188, 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.043>
- Pierucci, A. P. T. R., Andrade, L. R., Baptista, E. B., Volpato, N. M., & Rocha-Leão, M. H. M. (2006). New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. *Journal of Microencapsulation*, 23(6),

654–662. <https://doi.org/10.1080/02652040600776523>

- Pilosof, A. M. R. (2000). *Solubilidad. Caracterización funcional y estructural de proteínas*. (Eudeba (ed.); Bartholoma). Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Proaño, J. L., Salgado, P. R., Cian, R. E., Mauri, A. N., & Drago, S. R. (2020). Physical, structural and antioxidant properties of brewer's spent grain protein films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10597>
- Qin, F., Johansen, A. Z., & Mussatto, S. I. (2018). Evaluation of different pretreatment strategies for protein extraction from brewer's spent grains. *Industrial Crops and Products*, *125*(June), 443–453. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.017>
- Rachwał, K., Waśko, A., Gustaw, K., & Polak-Berecka, M. (2020). Utilization of brewery wastes in food industry. *PeerJ*, *8*, 1–28. <https://doi.org/10.7717/peerj.9427>
- Rafe, A., Selahbarzin, S., Kulozik, U., & Hesarinejad, M. A. (2022). Dilatational rheology-property relationships of  $\beta$ -lactoglobulin /high methoxyl pectin mixtures in aqueous foams. *Food Hydrocolloids*, *130*(April), 107683. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107683>
- Reyes de Fuentes, D., & Fernández Da Silva, R. (2014). Actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto foliar de zabila (*Aloe vera* L.) en microorganismos de interés clínico. *Revista de La Facultad de Ciencias de La Salud. Universidad de Carabobo*, *18*, 3–8.
- Robertson, J. A., l'Anson, K. J. A., Treimo, J., Faulds, C. B., Brocklehurst, T. F., Eijsink, V. G. H., & Waldron, K. W. (2010). Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *LWT - Food Science and Technology*, *43*(6), 890–896. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.019>
- Rodriguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2011). Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, *25*(8), 1925–1937. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.023>

- Rojas, J. J., García, A. M., & López, A. J. (2005, March). Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *BLACPMA*, 32.
- Roman, M., Decker, E., & Goddard, J. (2015). Performance of nonmigratory iron chelating active packaging materials in viscous model food systems. *Food Science*, 80(9), 1965–1973. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12972>
- Romani, V. P., Olsen, B., Collares, M. P., Rodrigo, J., Oliveira, M., Olsen, B., Collares, M. P., Oliveira, R. M., & Martins, V. G. (2018). Improvement of Fish Protein Films Properties for Food Packaging through Glow Discharge Plasma Application. *Food Hydrocolloids*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.022>
- Rommi, K., Niemi, P., Kemppainen, K., & Kruus, K. (2018). Impact of thermochemical pre-treatment and carbohydrate and protein hydrolyzing enzyme treatment on fractionation of protein and lignin from brewer's spent grain. *Journal of Cereal Science*, 79, 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.10.005>
- Romo, I., Abugoch, L., & Tapia, C. (2020). Soluble complexes between chenopodins and alginate / chitosan: Intermolecular interactions and structural-physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 227, 115334. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115334>
- Rouilly, A. y Rigal, L. (2002). Agro-Materials: A Bibliographic. *Review. J Macromol Sci.*, 42, 441–479.
- Ruan, K., & Balny, C. (2002). High pressure static fluorescence to study macromolecular structure - function. *Biochimica et Biophysica*, 1595(1–2), 94–102. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00337-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00337-5)
- Ruíz-Henestrosa, V. P., Sánchez, C. C., Escobar, M. del M. Y., Jiménez, J. J. P., Rodríguez, F. M., & Patino, J. M. R. (2007). Interfacial and foaming characteristics of soy globulins as a function of pH and ionic strength. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 309(1–3), 202–215. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.01.030>
- Ruiz Ruiz, J. C., Segura Campos, M. R., Betancur Ancona, D. A., & Chel Guerrero,

- L. A. (2013). Encapsulation of Phaseolus lunatus Protein Hydrolysate with Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity . *ISRN Biotechnology*, 2013, 1–6. <https://doi.org/10.5402/2013/341974>
- Russ, W., Mortel, H., & Meyer-Pittroff, R. (2005). Application of spent grains to increase porosity in bricks. *Constuction and Building Materials*, 19, 117–126.
- Sadahira, M. S., Rodrigues, M. I., Akhtar, M., Murray, B. S., & Netto, F. M. (2018). Influence of pH on foaming and rheological properties of aerated high sugar system with egg white protein and hydroxypropylmethylcellulose. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.058>
- Saikia, S., Mahnot, N. K., & Mahanta, C. L. (2015). Optimisation of phenolic extraction from Averrhoa carambola pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. *Food Chemistry*, 171, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.064>
- Salem, M., Wen, C., Chi, C., Li, X., & Janaswamy, S. (2020). Effect of salt addition on iota-carrageenan solution properties. *Food Hydrocolloids*, May, 106491. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106491>
- Salgado, P. R., Molina Ortiz, S. E., Denavi, G. A., Bosch, M. A., Añón, M. C., & Mauri, A. N. (2017). *Influence of protein conformation on the properties of soybean protein edible films* (M. R. K. Vijay Kumar Thakur, Manju Kumari Thakur (ed.)). UK Publisher.
- Salgado P.R., Di Giorgio L., Musso Y.S., M. A. N. . (2021). Recent developments in smart food packaging focused on biobased and biodegradable polymers". *Frontiers in Sustainable* . 10.3389/fsufs.2021.630393
- Salgado, P.R., Molina Ortiz, S. E., Petruccelli, S., & Mauri, A. N. (2010). Biodegradable sunflower protein films naturally activated with antioxidant compounds". *Food Hydrocolloids*., 24, 525–533.
- Salgado, Pablo R, Fernández, G. B., Drago, S. R., & Mauri, A. N. (2011). Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sun flower protein-based films. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1433–1440. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.003>

- Salgado, Pablo R, Ortiz, C. M., Musso, Y. S., Giorgio, L. Di, & Mauri., A. N. (2015). "Edible films and coatings containing bioactives." *Current Opinion in Food Science*, 5, 86–92.
- Santala, O. K., Nordlund, E. A., & Poutanen, K. S. (2013). Treatments with Xylanase at High (90 %) and Low (40 %) Water Content Have Different Impacts on Physicochemical Properties of Wheat Bran. *Food and Bioprocess Technology*, 6(11), 3102–3112. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0967-6>
- Santiago-Adame, R., Medina-Torres, L., Gallegos-Infante, J. A., Calderas, F., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., Ochoa-Martínez, L. A., & Bernad-Bernad, M. J. (2015). Spray drying-microencapsulation of cinnamon infusions (*Cinnamomum zeylanicum*) with maltodextrin. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 571–577. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.020>
- Sarabandi, K., Jafari, S. M., Mahoonak, A. S., & Mohammadi, A. (2019). Application of gum Arabic and maltodextrin for encapsulation of eggplant peel extract as a natural antioxidant and color source. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.133>
- Schanderl, S. (1970). Tannins and related phenolics. In *Methods in food: analysis physical, chemical and instrumental methods of analysis* (Joslyn MA, pp. 701–725). New York: Academic.
- Schmitt, C., Palma Da Silva, T., Rami-Shojaei, C. B. S., Frossard, P., Kolodziejczyk, E., & Leser, M. E. (2005). Effect of time on the interfacial and foaming properties of  $\beta$ -lactoglobulin/acacia gum electrostatic complexes and coacervates at pH 4.2. *Langmuir*, 21(17), 7786–7795. <https://doi.org/10.1021/la0510984>
- Schwenzfeier, A., Lech, F., Wierenga, P. A., Eppink, M. H. M., & Gruppen, H. (2013). Foam properties of algae soluble protein isolate: Effect of pH and ionic strength. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.03.002>
- Seta, L., Baldino, N., Gabriele, D., Lupi, F. R., & Cindio, B. De. (2013). The influence of carrageenan on interfacial properties and short-term stability of

- milk whey proteins emulsions. *Food Hydrocolloids*, 32(2), 373–382.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.01.020>
- Sharma, L., & Singh, C. (2016). Sesame protein based edible films: Development and characterization. *Food Hydrocolloids*, 61, 139–147.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.007>
- Shewry, P. R. (1996). *Cereal grain proteins BT - Cereal Grain Quality* (R. J. Henry & P. S. Kettlewell (eds.); pp. 227–250). Springer Netherlands.  
[https://doi.org/10.1007/978-94-009-1513-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-94-009-1513-8_8)
- Shrestha, A. K., Howes, T., Adhikari, B. P., & Bhandari, B. R. (2007). Water sorption and glass transition properties of spray dried lactose hydrolysed skim milk powder. *LWT - Food Science and Technology*, 40(9), 1593–1600.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.11.003>
- Shrotri, G. K., & Saini, C. S. (2022). Development of edible films from protein of brewer's spent grain: Effect of pH and protein concentration on physical, mechanical and barrier properties of films. *Applied Food Research*, 2(1), 100043. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100043>
- Silva, V. M., Kurozawa, L. E., Park, K. J., & Hubinger, M. D. (2012). Water Sorption and Glass Transition Temperature of Spray-Dried Mussel Meat Protein Hydrolysate. *Drying Technology*, 30(2), 175–184.  
<https://doi.org/10.1080/07373937.2011.628766>
- Simões, L. S., Araújo, J. F., Vicente, A. A., & Ramos, O. L. (2020). Design of  $\beta$ -lactoglobulin micro- and nanostructures by controlling gelation through physical variables. *Food Hydrocolloids*, 100, 105357.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105357>
- Singh, A., Siddiqui, J., & Diosady, L. (2018). Characterizing the pH-dependent release kinetics of food-grade spray drying encapsulated iron microcapsules for food fortification. *Food Bioprocess Technol*, 11, 435–446.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11947-017-2022-0>
- Sisa. (2020). SISTEMA DE INFORMACIÓN SIMPLIFICADO AGRÍCOLA (SISA). *Sistema de Información Simplificado Agrícola (SISA)*, 011.  
[https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/informe\\_cebada2020.pdf%0Ain](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/informe_cebada2020.pdf%0Ain)

forme\_cebada2020.pdf (argentina.gob.ar)

- Skendi, A., Harasym, J., & Galanakis, C. M. (2018). Recovery of high added-value compounds from brewing and distillate processing by-products. In *Sustainable Recovery and Reutilization of Cereal Processing By-Products*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102162-0.00007-1>
- Smith, B. C. (2011). *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (CRC Press (ed.); Second edi).
- Song, F., Tang, D.-L., Wang, X.-L., & Wang, Y.-Z. (2011). Biodegradable soy protein isolate-based materials: a review. *Biomacromolecules*, *12*(10), 3369–3380. <https://doi.org/10.1021/bm200904x>
- Sonklin, Chanikan Laohakunjit, N., & Kerdchoechuen, Orapin Ratanakhanokchai, K. (2018). Volatile flavour compounds, sensory characteristics and antioxidant activities of mungbean meal protein hydrolysed by bromelain. *Food Science and Technology*, *55*(1), 265–277. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2935-7>
- Steiner, E., Gastl, M., & Becker, T. (2011). Protein changes during malting and brewing with focus on haze and foam formation: A review. *European Food Research and Technology*, *232*(2), 191–204. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1412-6>
- Steiner, J., Procopio, S., & Becker, T. (2015). Brewer's spent grain: source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. *European Food Research and Technology*, *241*(3), 303–315. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2461-7>
- Stone, A. K., Cheung, L., Chang, C., & Nickerson, M. T. (2013). Formation and functionality of soluble and insoluble electrostatic complexes within mixtures of canola protein isolate and (  $\kappa$  -,  $\iota$  - and  $\lambda$  -type ) carrageenan. *Food Research International*, *54*(1), 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.009>
- Stone, A. K., & Nickerson, M. T. (2012). Formation and functionality of whey protein isolate-(kappa-, iota-, and lambda-type) carrageenan electrostatic complexes. *Food Hydrocolloids*, *27*(2), 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.08.006>
- Su, J., Yuan, X., Huang, Z., Wang, X., Lu, X., Zhang, L., & Wang, S. (2012).

- Physicochemical properties of soy protein isolate/carboxymethyl cellulose blend films crosslinked by Maillard reactions: Color, transparency and heat-sealing ability. *Materials Science & Engineering C*, 32(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.09.009>
- Suderman, N., Isa, M. I. N., & Sarbon, N. M. (2018). The effect of plasticizers on the functional properties of biodegradable gelatin-based film: A review. *Food Bioscience*, 24(June), 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.06.006>
- Sui, X., Bi, S., Qi, B., Wang, Z., Zhang, M., Li, Y., & Jiang, L. (2016). Impact of ultrasonic treatment on an emulsion system stabilized with soybean protein isolate and lecithin: Its emulsifying property and emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.024>
- Tamm, F., & Drusch, S. (2017). Impact of enzymatic hydrolysis on the interfacial rheology of whey protein/pectin interfacial layers at the oil/water-interface. *Food Hydrocolloids*, 63, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.013>
- Tapal, A., & Tiku, P. K. (2019). Nutritional and Nutraceutical Improvement by Enzymatic Modification of Food Proteins. In *Enzymes in Food Biotechnology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813280-7.00027-x>
- Therkelsen, G. H. (1993). Carrageenan. In R. L. Whistler & J. N. Bemiller (Eds.), *Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives* (pp. 145–180). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092654-4.50011-5>
- Thiago, R. dos S. M., Pedro, P. M. de M., & Eliana, F. C. S. (2014). Solid wastes in brewing process: A review. *Journal of Brewing and Distilling*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.5897/jbd2014.0043>
- Thomas, K. R., & Rahman, P. K. S. M. (2006). Brewery wastes. Strategies for sustainability. A review. *Aspects of Applied Biology*, 80(Table 1), 147–153.
- Toppazzini, C. (2021, August 9). Cerveza argentina: cómo quedó el negocio después del pico de la pandemia. *A24.Com*. <https://www.a24.com/economia/cerveza-argentina-como-queda-el-negocio-despues-del-pico-la-pandemia-n852619>
- Torres-Fuentes, C., Alaiz, M., & Vioque, J. (2011). Affinity purification and characterization of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates.

- Food Chemistry*, 129, 485–490.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.103>
- Treimo, J., Aspino, S. I., Eijsink, V. G. H., & Horn, S. J. (2008). Enzymatic solubilization of proteins in Brewer's spent grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), 5359–5365. <https://doi.org/10.1021/jf073317s>
- Trinh, K. T., & Glasgow, S. (2012). On The Texture Profile Analysis Test. *Chemeca, October*, 749–760.
- Turgeon, S. L., Schmitt, C., & Sanchez, C. (2007). *Protein – polysaccharide complexes and coacervates*. 12, 166–178.  
<https://doi.org/10.1016/j.cocis.2007.07.007>
- Turhan, K. N., Sahnaz, F., & Guner, A. (2001). A Spectrophotometric Study of Hydrogen Bonding in Methylcellulose-based Edible Films Plasticized by Polyethylene Glycol. *Food Chemistry and Toxicology*, 66(1), 59–62.
- USDA. (2022). *Departamento de Agricultura de Estados Unidos*.  
<https://ipad.fas.usda.gov/countrysummary/Default.aspx?id=AR&crop=Barley>
- Van de Velde, F., Pirovani, M. E., Cámara, M. S., Güemes, D. R., & Bernardi, C. M. del H. (2012). Optimization and Validation of a UV–HPLC Method for Vitamin C Determination in Strawberries (*Fragaria ananassa* Duch.), Using Experimental Designs. *Food Analytical Methods*, 5(5), 1097–1104.  
<https://doi.org/10.1007/s12161-011-9347-5>
- van den Berg, M., Jara, F. L., & Pilosof, A. M. R. (2015). Performance of egg white and hydroxypropylmethylcellulose mixtures on gelation and foaming. *Food Hydrocolloids*, 48, 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.03.001>
- van der Hoeven, D., Kleiner, K., Joshi, V., & Bruggink, A. (2022). Bio based press. *Bio Based Press*. <https://www.biobasedpress.eu/%0A%0A%0A%0A%0A>
- Vieira, E., Rocha, M. A. M., Coelho, E., Pinho, O., Saraiva, J. A., Ferreira, I. M. P. L. V. O., & Coimbra, M. A. (2014). Valuation of brewer's spent grain using a fully recyclable integrated process for extraction of proteins and arabinoxylans. *Industrial Crops and Products*, 52, 136–143.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.012>
- Vieira, E., Teixeira, J., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2016). Valorization of brewers'

- spent grain and spent yeast through protein hydrolysates with antioxidant properties. *European Food Research and Technology*, 242(11), 1975–1984. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2696-y>
- Visentini, F. F., Sponton, O. E., Perez, A. A., & Santiago, L. G. (2017). Biopolymer nanoparticles for vehiculization and photochemical stability preservation of retinol. *Food Hydrocolloids*, 70, 363–370. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.020>
- Wahlström, R., Rommi, K., Willberg-Keyriläinen, P., Ercili-Cura, D., Holopainen-Mantila, U., Hiltunen, J., Mäkinen, O., Nygren, H., Mikkelsen, A., & Kuutti, L. (2017). High Yield Protein Extraction from Brewer's Spent Grain with Novel Carboxylate Salt - Urea Aqueous Deep Eutectic Solvents. *ChemistrySelect*, 2(29), 9355–9363. <https://doi.org/10.1002/slct.201701492>
- Wang, C, Chang, S., Inbaraj, B., & Chen, B. (2010). Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 120(1), 184–192. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.005>
- Wang, C, Tian, Z., Chen, L., Temelli, F., Liu, H., & Y, W. (2010). Functionality of Barley Proteins Extracted and Fractionated by Alkaline and Alcohol Methods. *Cereal Chemistry*, 6(87), 597–606. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/CCHEM-06-10-0097>
- Wang, Chen, Jiang, L., Wei, D., Li, Y., Sui, X., Wang, Z., & Li, D. (2011). Effect of secondary structure determined by FTIR spectra on surface hydrophobicity of soybean protein isolate. *Procedia Engineering*, 15, 4819–4827. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.08.900>
- Wang, Y., Zhao, J., Liu, C., & Li, W. (2019). Influence of  $\gamma$ -aminobutyric acid on gelling properties of heat-induced whey protein gels. *Food Hydrocolloids*, 94(January), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.031>
- Wang, Z., Zhang, S., & Vardhanabhuti, B. (2015). Foaming Properties of Whey Protein Isolate and  $\lambda$ -Carrageenan Mixed Systems. *Food of Science*, 80(8). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12940>
- Ward, A. F. H., & Tordai, L. (1946). Time dependence of boundary tensions of

- solutions I. *Journal of Chemical Physics*, *14*, 353–361.
- Warnakulasuriya, S. N., & Nickerson, M. T. (2018). Review on plant protein–polysaccharide complex coacervation, and the functionality and applicability of formed complexes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *98*(15), 5559–5571. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9228>
- Waters, D. M., Jacob, F., Titze, J., Arendt, E. K., & Zannini, E. (2012). Fibre, protein and mineral fortification of wheat bread through milled and fermented brewer's spent grain enrichment. *European Food Research and Technology*, *235*(5), 767–778. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1805-9>
- Wen, C., Zhang, J., Duan, Y., Zhang, H., & Ma, H. (2019). A Mini-Review on Brewer's Spent Grain Protein: Isolation, Physicochemical Properties, Application of Protein, and Functional Properties of Hydrolysates. *Journal of Food Science*, *84*(12), 3330–3340. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14906>
- Wijaya, W., Patel, A. R., Setiowati, A. D., & Van der Meeren, P. (2017). Functional colloids from proteins and polysaccharides for food applications. *Trends in Food Science and Technology*, *68*, 56–69. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.003>
- Wolters, N., Schabronath, C., Schembecker, G., & Merz, J. (2016). Efficient conversion of pretreated brewer's spent grain and wheat bran by submerged cultivation of *Hericium erinaceus*. *Bioresource Technology*, *222*, 123–129.
- Wouters, A. G. B., Fierens, E., Rombouts, I., Brijs, K., Joye, I. J., & Delcour, J. A. (2017). Exploring the Relationship between Structural and Air – Water Interfacial Properties of Wheat ( *Triticum aestivum* L .) Gluten Hydrolysates in a Food System Relevant pH Range. *Agricultural and Food Chemistry*, *65*, 1263–1271. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05062>
- Wouters, A. G. B., Schaefer, S., Joye, I. J., & Delcour, J. A. (2019). Relating the structural , air-water interfacial and foaming properties of wheat (*Triticum aestivum* L .) gliadin and maize ( *Zea mays* L .) zein based nanoparticle suspensions. *Colloids and Surfaces A*, *567*, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.01.071>
- Xie, H. G., Zheng, J. N., Li, X. X., Liu, X. D., Zhu, J., Wang, F., Xie, W. Y., & Ma, X.

- J. (2010). Effect of surface morphology and charge on the amount and conformation of fibrinogen adsorbed onto alginate/chitosan microcapsules. *Langmuir*, 26(8), 5587–5594. <https://doi.org/10.1021/la903874g>
- Xiong, W., Li, J., Li, B., & Wang, L. (2019). Physicochemical properties and interfacial dilatational rheological behavior at air-water interface of high intensity ultrasound modified ovalbumin: Effect of ionic strength. *Food Hydrocolloids*, 97(January), 105210. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105210>
- Xiros, C., & Christakopoulos, P. (2012). Biotechnological potential of brewers spent grain and its recent applications. *Waste and Biomass Valorization*, 3(2), 213–232. <https://doi.org/DOI 10.1007/s12649-012-9108-8>
- Xu, Y., Yang, N., Yang, J., Hu, J., Zhang, K., Nishinari, K., Phillips, G. O., & Fang, Y. (2020). Protein/polysaccharide intramolecular electrostatic complex as superior food-grade foaming agent. *Food Hydrocolloids*, 101. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105474>
- Yalcin, E., & Celik, S. (2007). Food Chemistry Solubility properties of barley flour, protein isolates and hydrolysates. *Food Chemistry*, 104, 1641–1647. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.029>
- Yang, L., & Paulson, A. T. (2000). Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films. *Food Research International*, 33, 563–570.
- Young, T. W. (2022). Types of Beer. In *Britannica Publishing Partner*. <https://www.britannica.com/topic/beer>
- Youse, M., & Mahdi, S. (2019). Recent advances in application of different hydrocolloids in dairy products to improve their techno-functional properties. *Trends in Food Science and Technology*, 88, 468–483. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.015>
- Yu, D., Sun, Y., Wang, W., O’Keefe, S. F., Neilson, A. P., Feng, H., Wang, Z., & Huang, H. (2020). Recovery of protein hydrolysates from brewer’s spent grain using enzyme and ultrasonication. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(1), 357–368. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14314>
- Yun, H., Kon, M., Won, H., Yun, J., Hwa, M., & Hoon, K. (2016). The role of

- glycerol and water in flexible silk sericin film. *International Journal of Biological Macromolecules*, *82*, 945–951.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.016>
- Yust, M., Pedroche, J., Girón-Calle, J., Vioque, J., Millán, F., & Alaiz, M. (2004). Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. *Food Chemistry*, *85*, 317–320.
- Zhan, F., Hu, J., He, C., Sun, J., Li, J., & Li, B. (2020). Complexation between sodium caseinate and gallic acid: Effects on foam properties and interfacial properties of foam. *Food Hydrocolloids*, *99*(April 2019), 105365.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105365>
- Zhang, H., & Mittal, G. (2010). Biodegradable protein based films from plant resources: A review. *Environmental Progress Sustainable Energy*, *29*, 203–220.
- Zhang, X. F., Xie, L., Liu, Y., Xiang, J. F., Li, L., & Tang, Y. L. (2008). Molecular interaction and energy transfer between human serum albumin and bioactive component Aloe dihydrocoumarin. *Journal of Molecular Structure*, *888*(1–3), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2007.11.051>
- Zhao, H., Zhou, F., Peng, W., Zheng, J., Dziugan, P., & Zhang, B. (2015). The effects of carrageenan on stability of arachin and the interactions between them. *Food Hydrocolloids*, *43*, 763–768.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.08.006>
- Zhou, B., Tobin, J. T., Drusch, S., & Hogan, S. A. (2020). Interfacial properties of milk proteins: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, *xxxx*, 102347. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102347>
- Zhu, X., Zhan, F., Zhao, Y., Han, Y., Chen, X., & Li, B. (2020). Improved foaming properties and interfacial observation of sodium caseinate-based complexes: Effect of carboxymethyl cellulose. *Food Hydrocolloids*, *105*(February), 105758.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105758>
- Zielke, C., Teixeira, C., Ding, H., Cui, S., Nyman, M., & Nilsson, L. (2017). Analysis of  $\beta$ -glucan molar mass from barley malt and brewer's spent grain with

asymmetric flow field-flow fractionation (AF4) and their association to proteins.  
*Carbohydrate Polymers*, 157, 541–549.  
<https://doi.org/doi:10.1016/j.carbpol.2016.10.045>

Zinoviadou, K. G., Scholten, E., Moschakis, T., & Biliaderis, C. G. (2012).  
Properties of emulsions stabilised by sodium caseinate-chitosan complexes.  
*International Dairy Journal*, 26(1), 94–101.  
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.01.007>.