

# **“OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEICOS A PARTIR DE CEBADA AGOTADA”**

**UNIVERSIDAD FASTA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**LICENCIATURA EN NUTRICIÓN**

**AUTORA: MARIELA IRENE BELAGARDI**

**TUTORA: LIC. IVONNE CORTI**

**CO-TUTORA: ING. CATALINA KOTLAR**

**DTO. DE METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

**AÑO 2011**



*"Nunca desistas de un sueño. Sólo trata de ver las señales que te lleven a él."*

**Paulo Coelho**

*A mis padres, Marta y Mario,  
mis hermanos, Silvina y Andrés, y  
mi novio, Diego.*

### **QUIERO AGRADECER A...**

- ✦ *Dios, por haberme dado la posibilidad de estudiar.*
- ✦ *Mi mamá, Marta, por haber luchado siempre para que tenga una vida digna y sea lo que hoy soy.*
- ✦ *Mi papá, Mario, que con su ejemplo me enseñó el valor de la perseverancia y el esfuerzo en el estudio, y que desde el cielo me acompaña día tras día.*
- ✦ *Mis hermanos, Silvina y Andrés, por haberme acompañado, apoyado y alentado durante todos estos años y a través de lo largo de mi vida.*
- ✦ *Mi novio, Diego, por compartir conmigo los momentos más difíciles de este camino, estando siempre junto a mí, brindándome su apoyo incondicional, su ayuda, su comprensión, su confianza, su aliento y su amor.*
- ✦ *Mis cuñados, Mercedes y Seba y, a mi suegro Juan, por alegrarse con cada uno de mis logros.*
- ✦ *Mis amigas de la facu, July, Julia, Na y Yesi, por todos los momentos compartidos y por alentarme siempre.*
- ✦ *Mis amigos de la vida, por brindarme su apoyo y haber sabido comprenderme en aquellos momentos en que por estudiar no pude estar con ellos.*
- ✦ *Mi amiga Pini, por haberme devuelto la confianza en mí, dándome cada día más ganas de seguir adelante.*
- ✦ *La abuela Beatriz, a Nilia, Bety y Zuly, por haberme dado fuerzas cuando las necesité.*
- ✦ *La Lic. Diana Cucurullo y al Dr. Raúl Tejón, por su excelente profesionalismo y, sobre todo, por su gran calidez.*
- ✦ *La Universidad FASTA, por formarme como profesional y haberme brindado ayuda cuando la necesité.*
- ✦ *Vivian Minnaard, del Dto. de Metodología de la Investigación, por haber aceptado el desafío de hacer un trabajo diferente acompañándome con todo su entusiasmo.*
- ✦ *La Dra. Giaccaglia, por brindarme su apoyo para la realización del trabajo de campo de la presente tesis.*
- ✦ *La Lic. Ivonne Corti, por aceptar gentilmente ser mi tutora.*
- ✦ *Mi co-tutora, Catalina Kotlar, Ing. en Alimentos, miembro del Grupo de Investigación de Ingeniería en Alimentos (GIIA) de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata, y a la Dra. Sara Roura, jefa del mismo grupo, por elegirme para llevar a cabo este trabajo, por haber confiado en mí, y por haberme motivado, guiado, ayudado y enseñado, dando todo de sí para que esta tesis sea lo que hoy es.*

✦ *Todo el GIAA por haberme recibido y tratado como si fuese un miembro más del mismo, brindándome su ayuda siempre que la necesité.*

✦ *Finalmente, a todas las personas que me apoyaron y de una u otra manera colaboraron a lo largo de todos estos años para que hoy cumpla el sueño de recibirme.*

*MUCHAS GRACIAS...*

*Mary*

## **ABSTRACT**

*Una forma importante de reutilizar los residuos agroindustriales y producir productos de valor agregado consiste en la producción de hidrolizados proteicos. En este trabajo se utilizó como sustrato grano agotado de cerveza, BSG por sus siglas en inglés Brewer's spent grain. Los objetivos principales fueron en una primera etapa, realizar una caracterización fisicoquímica y microbiológica de tres variedades de BSG con 78, 93 y 100% Pilsen e indagar acerca de la estabilidad microbiológica del mismo como materia prima fresca y seca durante su almacenamiento a diferentes temperaturas. En una segunda parte, se llevó a cabo la preparación preliminar y estandarización del BSG a través de una serie de pre-tratamientos con el fin de eliminar interferencias para su uso en la alimentación como los polifenoles. En la tercera parte, se definieron las condiciones óptimas para la actividad de la cepa proteolítica, Bacillus cereus, sobre el BSG y se llevó a cabo el proceso de hidrólisis. Finalmente, se realizó una caracterización parcial de los hidrolizados obtenidos a través del rango de peso molecular y caracterización térmica de los mismos. Entre los resultados más significativos se encontró que solo el contenido de agua, lípidos y cenizas difirieron significativamente. La microflora remanente al proceso de elaboración de la cerveza se constituyó predominantemente de bacterias aerobias termófilas siendo el secado la mejor alternativa para la conservación, por lo cual, en adelante el BSG se secó a 60° C durante 24-48 horas y se tamizó a través de un juego de tamices. El BSG retenido por encima de la malla A.S.T.M. N° 10 del tamiz fue molido. La preparación preliminar del residuo consistió en la extracción de los polifenoles con una solución alcohol: agua 30:70 durante 60 minutos en un agitador orbital a 50 rpm. Luego, el BSG libre de polifenoles se disolvió en un medio mínimo y se esterilizó en autoclave durante 10 minutos a 120° C. La cepa proteolítica Bacillus cereus demostró alta capacidad para hidrolizar diferentes fracciones de BSG. La evaluación de posibles efectos sinérgicos indicó un efecto notorio cuando se inoculó B. cereus con Pseudomonas. La caracterización térmica demostró que después de la hidrólisis hay un aprovechamiento energético en la acción de proteasas de B. cereus. Dentro de los hidrolizados obtenidos, la fracción mayoritaria tiene un peso molecular entre 3,5 y 12-14 KDa y un grado de hidrólisis menor al 10%. Se concluye que la producción de hidrolizados podría agregar valor al BSG, un subproducto de la producción de cerveza de bajo valor.*

**Palabras claves:** Residuo agroindustrial, Grano agotado de cerveza (BSG), Estandarización, Bacillus cereus

## **ÍNDICE**

<i>INTRODUCCIÓN</i> -----	1
<i>CAPÍTULO 1: Cebada Agotada.</i>	
<i>Un residuo Agroindustrial para no desechar</i> -----	6
<i>CAPÍTULO 2: Sustancias Antinutritivas.</i>	
<i>Compuestos indeseables en un residuo aprovechable</i> -----	20
<i>CAPÍTULO 3: Proteínas Alimentarias.</i>	
<i>Constituyentes de gran importancia Nutricional y Funcional</i> -----	32
<i>CAPÍTULO 4: Hidrolizados Proteicos.</i>	
<i>Un solo producto con varios usos para la alimentación</i> -----	47
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i> -----	57
<i>RESULTADOS Y DISCUSIONES</i> -----	75
<i>CONCLUSIONES</i> -----	101
<i>BIBLIOGRAFÍA</i> -----	103

# ***INTRODUCCIÓN***



*Es un hecho ampliamente reconocido que la deficiencia proteica, o más específicamente, la falta de cantidades y proporciones adecuadas de los aminoácidos esenciales constituye el principal problema de nutrición, especialmente entre los niños, en gran parte de las regiones poco desarrolladas del mundo<sup>1</sup>.*

*Una gran cantidad de residuos agroindustriales, ricos en proteínas, son generados regionalmente. Actualmente éstos se subaprovechan en forma de pienso o se descartan en forma de residuos generando inconvenientes desde el punto de vista medioambiental. El interés en el aprovechamiento de estas proteínas en pos de limitar el problema de malnutrición proteica, ha estimulado los procesos de obtención y mejora de hidrolizados proteicos. La disponibilidad de distintas clases de hidrolizados, en cantidades suficientes y a precios razonables, sería de gran importancia y utilidad para la elaboración de dietas de tipo especial, las cuales actualmente resultan muy caras y por ello frecuentemente no se utilizan, aunque desde el punto de vista clínico sean aconsejables<sup>2</sup>. Actualmente el mercado demanda hidrolizados de composición y características bien definidas, siendo esto deseable tanto para la industria de alimentos como para la médico-farmacéutica. Así por ejemplo, los hidrolizados enriquecidos en aminoácidos ramificados (AAR), bien con mezclas de aminoácidos libres o con péptidos ricos en AAR, se han utilizado con éxito en tratamientos de diversas patologías hepáticas, como las encefalopatías hepáticas<sup>3</sup>.*

*Una de las líneas de investigación del Grupo de Investigación en Ingeniería en Alimentos (GIIA) de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata se basa en el aprovechamiento de residuos agroindustriales regionales de bajo valor agregado para la obtención de hidrolizados proteicos de alto valor agregado. Cabe resaltar que la Provincia de Buenos Aires es netamente agrícola ganadera con elevada generación de residuos agroindustriales ricos en proteínas, los que son subutilizados en forma de productos de bajo valor agregado. Para ello, la cebada agotada, como subproducto de la industria cervecera, será aprovechada para la extracción de las proteínas presentes en ésta, las cuales en la forma de aislados proteicos, constituyen de por sí un producto de mayor valor añadido y podrán ser utilizadas para la obtención de hidrolizados proteicos que pueden ser usados en alimentación humana.*

---

<sup>1</sup> SCRIMSHAW, N., SQUIBB, R., BRESSANI, R., BEHÁR, M., VITERI, F. y ARROYAVE, G., Mezclas de proteínas vegetales para la alimentación de niños lactantes y preescolares, en: <http://bvssan.incap.int/cgi-bin/wxis.exe/iah/>

<sup>2</sup> MILLAN RODRIGUEZ, Francisco, BAUTISTA PALOMAS, Juan, OLIAS JIMENEZ, José Manuel. Procedimiento de obtención de peptonas vegetales de alto grado de hidrólisis y sus aplicaciones. España, Patentscope, 023170. 04.06.1998.

<sup>3</sup> *ibid*

*Es importante mencionar que la presencia de compuestos indeseables o antinutricionales junto con las proteínas en dichos subproductos, hacen que este tipo de residuo no se aproveche de forma adecuada<sup>4</sup>.*

*Las proteínas hidrolizadas en forma de dipéptidos, tripéptidos o aminoácidos tienen la ventaja de ser más fácilmente o directamente absorbidas en el torrente sanguíneo. Además, debido a su alta solubilidad, pueden ser utilizadas como suplemento proteico, o también como hidrolizados hipoalergénicos o para el tratamiento de síndromes específicos. Dentro de los mismos, existe una aplicación que por su interés, novedad y potencialidad requiere una especial mención, son aquellos enriquecidos en péptidos bioactivos, secuencias de aminoácidos de pequeño tamaño inactivas dentro de la proteína intacta pero que pueden ser liberados bien durante la digestión del alimento o por un procesado previo del mismo, y que presentan funciones hipocolesterolémicas, antioxidantes o hipotensoras<sup>5</sup>.*

*Las tendencias en la investigación de estos productos están determinadas por factores como el desarrollo de la biotecnología; el aprovechamiento de residuos y la revalorización de subproductos; el desarrollo de nuevos alimentos y alimentos más sanos. Esto conlleva al gran impulso que están recibiendo en los últimos años los estudios sobre los mismos debido a la demanda de alimentos muy específicos y más saludables y además por el aprovechamiento de fuentes proteicas alternativas. Este impulso va en paralelo con el desarrollo biotecnológico de estos procesos<sup>6</sup>.*

*Partiendo de las fuentes de enzimas de origen bacteriano aisladas y estudiadas, en el GIIA se ha avanzado en la aplicación en sustratos, encontrándose la cebada agotada (CA) como una materia prima de interés para esta aplicación, entre otras. Ésta es uno de los mayores subproductos de la industria cervecera la cual genera volúmenes muy elevados de la misma, y su desecho llega a ocasionar problemas ambientales cuando no es tratado adecuadamente. Hoy en día la misma, como muchos otros subproductos agroindustriales, se destina principalmente como pienso. Tradicionalmente ha recibido poca atención para su comercialización. Sin embargo, es una fuente potencial de proteínas y fibras con posible utilización en alimentos procesados. La CA contiene cáscara de salvado y residuos de embrión de la cebada*

---

<sup>4</sup> N. GONÇALVESS, J. VIOQUE, A. CLEMENTE, R. SÁNCHEZ-VIOQUE, J. BAUTISTA y F. MILLÁN, Obtención y caracterización de aislados proteicos de colza en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/21867/1/813.pdf>

<sup>5</sup> VIOQUE Javier y MILLÁN Francisco, Los hidrolizados proteicos en alimentación: suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional, en: [http://digital.csic.es/bitstream/10261/5750/1/IG\\_AGROCSIC\\_2.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/5750/1/IG_AGROCSIC_2.pdf)

<sup>6</sup>MILLAN RODRIGUEZ, Francisco, BAUTISTA PALOMAS, Juan, OLIAS JIMENEZ, José Manuel, ob.cit.,p.

malteada, además de otras fracciones provenientes del adjunto que se incorpore como por ejemplo, el residuo de salvado de maíz<sup>7</sup>.

Aunque la CA está agotada respecto al contenido de almidón y azúcares, su contenido en proteínas, grasas y fibras es dos veces más alto en comparación a los niveles encontrados en los granos de cebada malteada. La producción continua de este desecho agroindustrial hace del mismo un atractivo subproducto para el consumo humano<sup>8</sup>.

Por lo tanto, en la presente tesis de grado se propone hacer uso de microorganismos con demostrada capacidad proteolítica, previamente aislados de diversas fuentes, caracterizados y optimizados. Estas cepas serán agregadas a la cebada agotada pre-acondicionada. Se propone optimizar el proceso de fermentación y caracterizar los productos obtenidos de manera de poder obtener nuevos productos “a medida”, con mayor valor agregado. Se evaluarán sobre éstos las propiedades funcionales y nutricionales de manera de poder establecer su uso potencial en la industria agroalimenticia como en la industria médico-farmacéutica, entre otras.

Ante lo expuesto, surge el siguiente problema de investigación:

¿Qué hidrolizados proteicos se obtienen a partir de distintas variedades de Cebada Agotada, la cual constituye un residuo agroindustrial de bajo valor agregado y alto impacto ambiental, con aplicación de procesos tecnológicos dirigidos a la remoción parcial o total de los factores antinutricionales que impiden el empleo directo para la alimentación humana?

Y el objetivo general planteado es:

Indagar que hidrolizados proteicos se obtienen a partir de distintas variedades de Cebada Agotada, la cual constituye un residuo agroindustrial de bajo valor agregado y alto impacto ambiental, con aplicación de procesos tecnológicos dirigidos a la remoción parcial o total de los factores antinutricionales que impiden el empleo directo para la alimentación humana.

---

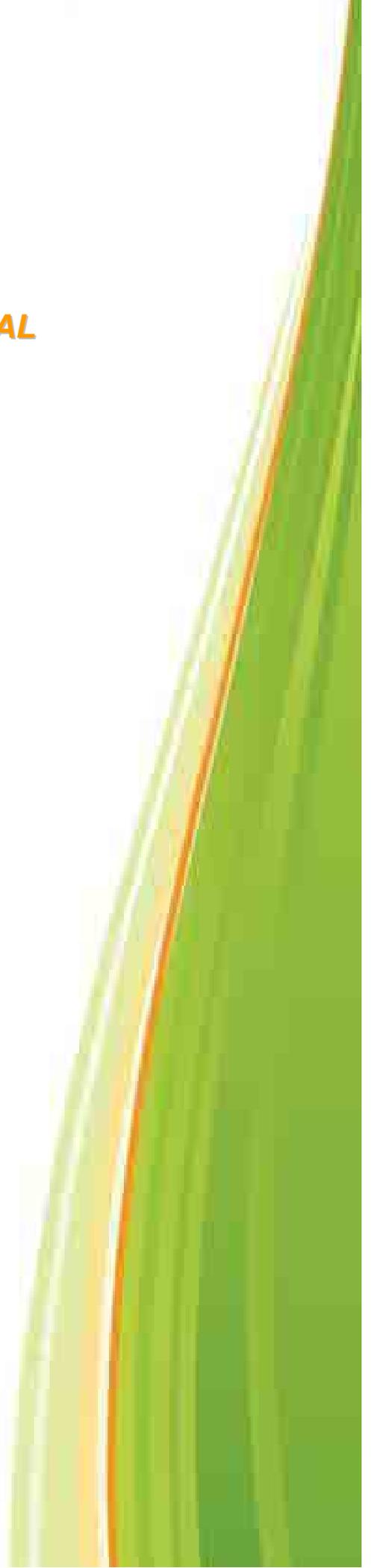
<sup>7</sup> GONZALEZ ARGUELLO, José Saul, Utilización del grano agotado de cervecería y harinas de maíz en la elaboración de extruídos, en: <http://148.206.53.231/tesiuami/UAM%20LOTE%205/chapingo0058.pdf>

<sup>8</sup> GONZALEZ ARGUELLO, José Saul, ob.cit.,p.

*Frente al mismo, los objetivos específicos son:*

- *Caracterizar la composición proximal de la cebada agotada, es decir del residuo agroindustrial de partida, considerando carbohidratos, proteínas, lípidos, polifenoles totales, fibra bruta, contenido de agua y de cenizas.*
- *Estandarizar la materia prima de partida utilizada para obtener el hidrolizado enzimático y caracterizar los productos obtenidos.*
- *Establecer un protocolo tendiente a la obtención de un sustrato libre de sustancias antinutritivas a través del uso de estrategias bioquímicas y/o fisicoquímicas. Su eliminación es requerida además, debido a la inhibición que presentan sobre la actividad enzimática de las proteasas.*
- *Optimizar los procesos de hidrólisis a través del uso de bacterias proteolíticas y/o sus productos enzimáticos sobre los sustratos libres de componentes antinutritivos.*
- *Determinar sobre el hidrolizado final el contenido de proteínas solubles, el peso molecular aproximado y la temperatura y energía de desnaturalización medida por calorimetría diferencial de barrido, y comparar estos resultados con los obtenidos de la materia prima de partida.*
- *Establecer las potenciales formulaciones para la adición de los hidrolizados obtenidos.*

***CEBADA AGOTADA***  
***UN RESIDUO AGROINDUSTRIAL***  
***PARA NO DESECHAR***



Los residuos agroindustriales proceden del tratamiento industrial de productos agrícolas tales como semillas de oleaginosas, cítricos, caña de azúcar, granos de cereales, aceitunas, etc., o bien de las industrias cárnica y pesquera. Su localización geográfica preferente se asocia a las áreas industriales específicas. Su composición, extraordinariamente variada, condiciona su uso potencial como componentes de raciones para la alimentación animal o humana<sup>1</sup>, en general, esto supone una infrutilización del potencial valor de estos materiales que pueden ser aprovechados de un modo más eficiente<sup>2</sup>.

Uno de los residuos agroindustriales que ha recibido poca atención, y que sin embargo ocasiona un gran problema medioambiental como desecho, es la cebada agotada (CA), principal subproducto de la industria cervecera, en donde la misma se obtiene a partir de una mezcla preparada a base de agua, dicho cereal malteado y usualmente carbohidratos de materiales adjuntos como maíz o arroz. Esta mezcla es calentada para favorecer la hidrólisis enzimática de los carbohidratos. Cuando la hidrólisis está completa, el líquido o mosto es usado para la elaboración de la cerveza. El residuo sólido que permanece después de la filtración es el subproducto mencionado, también llamado, "Grano Agotado de Cervecería".

Este desecho constituye una fuente potencial de proteína y fibra para ser usada en alimentos procesados. Contiene cáscara de salvado, residuos de embrión de la variedad maltera y de los adjuntos empleados. Aunque la CA está agotada respecto al contenido de almidón y azúcares, es dos veces más alta en proteínas, grasa y fibra en comparación a los niveles encontrados en los granos. La producción continua de este subproducto, su costo relativamente bajo, así como su valor nutricional, lo hacen atractivo para el consumo humano<sup>3</sup>.

La cebada es una planta perteneciente a la familia de las gramíneas. La misma se puede dividir en dos grupos: el tipo mediterráneo, originario de los países asiáticos y el tipo costero, originario de la región del Mediterráneo en el norte de África.

---

<sup>1</sup> AGUILERA, J. F, Aprovechamiento de subproductos agroindustriales en la alimentación de rumiantes, en: [http://www.infogranjas.com.ar/index.php/alimentos/38-general/1467-  
aprovechamiento-de-subproductos-agroindustriales-en-la-alimentacion-de-rumiantes-.html](http://www.infogranjas.com.ar/index.php/alimentos/38-general/1467-aprovechamiento-de-subproductos-agroindustriales-en-la-alimentacion-de-rumiantes-.html)

<sup>2</sup> Centro Tecnológico AINIA, Congreso Europeo sobre Aprovechamiento de Residuos Agroalimentarios, en: <http://www.ainia.es/html/envios/creatividad/GRUBUP.htm>

<sup>3</sup> GONZALEZ ARGUELLO, José Saul, Utilización del grano agotado de cervecería y harinas de maíz en la elaboración de extruidos, en: <http://148.206.53.231/tesiunami/UAM%20LOTE%205/chapingo0058.pdf>

A su vez, pertenece al género *Hordeum*. Dentro de éste, se encuentran las especies: *Hordeum vulgare*, L., que incluye a las variedades con espigas de seis hileras, y *Hordeum distichum*, L., que incluye a las variedades de espigas de dos hileras<sup>4</sup>.

**Imagen N° 1. Especies de cebada**

***Hordeum distichum*, L**



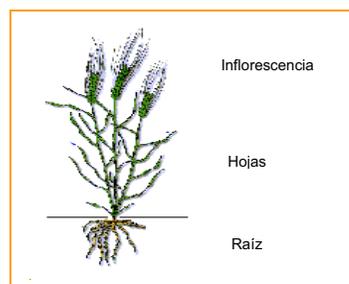
***Hordeum vulgare*, L**



Fuente: <http://www.liberherbarum.com/pn1389.htm> y <http://www.uniprot.org/taxonomy/4513>

Las espigas, se componen de un eje llamado raquis, formado por nudos en “zigzag”, en cada uno de los cuales se encuentran tres flores hermafroditas que presentan tres estambres y un ovario con estigma doble; estas estructuras se hallan protegidas por la corola, la cual está constituida por la lema y la palea. El cáliz de la flor lo componen dos plumas situadas en el lado donde se localiza la lema, o sea en el lado externo de la flor respecto a su posición en el nudo. Las especies *Hordeum vulgare*, L., poseen tres flores fértiles en cada nudo del raquis en lados alternos, y las *Hordeum distichum*, L., sólo una, debido a que las flores laterales son abortivas<sup>5</sup>.

**Imagen N° 2. Fenología de la cebada**



Fuente: CALLEJO GONZALEZ, Ma de Jesús<sup>6</sup>

<sup>4</sup> CALLEJO GONZALEZ, Ma. de Jesús, *Industrias de cereales y derivados*; Madrid España, Mundi Prensa editorial, 2002, p. 35-42

<sup>5</sup> GONZALEZ ARGUELLO, ob.cit.,p.

<sup>6</sup> CALLEJO GONZALEZ, Ma. de Jesús, ob.cit.,p.

Para el estudio de las características diferenciales del grano, éste se divide en varias regiones o zonas. Longitudinalmente se tienen dos partes: el lado dorsal que comprende la lema, y el ventral constituido por la palea y transversalmente se divide en tres regiones: la basal, también llamada germinal, la media y la distal.

Por su posición en el nudo del raquis el grano puede ser simétrico, grano central, o asimétrico, granos laterales, y su forma puede ser alargada delgada, alargada ovoidal, rómbica, etc.

En la cebada de seis hileras, también llamada hexística, dos de los tres granos que constituyen la espiguilla son asimétricos y se desarrollan a los costados del grano central, el cual tiene forma simétrica; y en la cebada de dos hileras, es decir dística, se desarrollan sólo granos anchos y simétricos.

El tamaño del grano depende de la influencia del ambiente y sus dimensiones varían como sigue: si la barba alcanza una longitud máxima de 9.5 mm y una mínima de 6.0 mm; de ancho mide entre 1.5 y 4.0 mm y su densidad es de aproximadamente 60.50 kg/Hl en cebadas de seis hileras y de 66.40 kg/Hl en las dísticas. El peso de mil granos varía de 30 a 60 g, con un promedio de 45 g, dependiendo de las condiciones ambientales y del manejo en que se haya desarrollado el cultivo. En general, de acuerdo con las características de tamaño, el grano de cebada se clasifica arbitrariamente en: grande, mediano y pequeño<sup>7</sup>.

**Cuadro N° 1. Composición promedio de un grano de cebada perteneciente a la especie *Hordeum distichon* L.**

<b>Componentes</b>	<b>Porcentajes (%)</b>
Humedad	12,0 - 13,0
Carbohidratos	65,0 - 72,0
Proteínas	10,0 - 11,0
Grasas	1,5 - 2,5
Fibras	2,5 - 4,5
Cenizas	2,0 - 3,0

Fuente: CALLEJO GONZALEZ, Ma. de Jesús<sup>8</sup>

<sup>7</sup> GONZALEZ ARGUELLO, ob.cit.,p.

<sup>8</sup> CALLEJO GONZALEZ, Ma. de Jesús, ob.cit.,p.

*La cebada es la principal materia prima de la industria maltera - cervecera y tiene una demanda en constante aumento. Es uno de los cultivos más antiguos de la humanidad en donde era muy utilizada para el consumo humano, tanto que el hombre escogía las variedades que le eran más favorables en aquellos momentos, y que caracterizan a las de la actualidad.*

*Hoy en día, la mayor parte que es cultivada por el hombre es destinada para la elaboración de cerveza, pero en algunas partes del mundo aun se utiliza como alimento para humanos, como es el caso de algunos países de Europa y de América del sur, quienes la consumen en forma de sopas o de pan<sup>9</sup>.*

*No se conoce una fecha exacta de los comienzos de este cultivo en la Argentina, pero en 1875 se la cita por primera vez en la estadística de exportación con 2 toneladas. En aquella época se las mencionaba como cebadas, es decir, sin especificar si eran forrajeras o cerveceras. Hace relativamente pocos años que en las estadísticas de producción se comienzan a especificar los dos tipos por separado como exigencia de los compradores y por fijarse precio diferencial entre ellas.*

*En todos los países se conoce como especies de tipo cervecero a aquellas aptas para la elaboración de malta de buena calidad. En la Argentina, las clasificadas como cerveceras son las de 2 hileras, aunque han sido introducidas de EE.UU. algunas de 6 hileras, pero sin difusión masiva.*

*Con respecto a la superficie sembrada y producción, los primeros datos estadísticos oficiales comenzaron a publicarse en 1909, arrojando una superficie de 60.000 ha suponiendo que en su mayor parte eran forrajeras.*

*Hasta 1985 el cultivo de la variedad cervecera de este cereal, decayó en forma considerable, pero con la firma del tratado de complementación económica entre la Argentina y Brasil, que luego sería el MERCOSUR, vuelve a tomar importancia y comienza a crecer la superficie sembrada. Esto generó la instalación de nuevas y modernas industrias malteras y la ampliación de las existentes, mayor demanda de materia prima y una exportación creciente. Entre 1985 y 2002 la superficie sembrada creció de 60.000 ha a más de 330.000 ha, es decir, alrededor de un 530%.*

*En el mismo lapso, la producción de grano de cebada aumentó de 100.000 toneladas a más de 800.000 t, lo cual equivale a un 800%. Una de las principales causas de este incremento, además de la superficie sembrada, fue el notable aumento de los rendimientos por hectárea<sup>10</sup>.*

---

<sup>9</sup> CALLEJO GONZALEZ, Ma. de Jesús, ob.cit.,p.

<sup>10</sup>TOMASO, Juan Carlos, Cebada cervecera en la Argentina, en: <http://www.inta.gov.ar/ediciones/ídia/cereales/cebada02.pdf>

*Un pequeño porcentaje del total de granos producidos, entre el 1 y 2%, no son aptos para ser industrializados por lo que se destina al mercado forrajero, constituyendo alrededor de 10.000 a 12.000 t anuales.*

*La instalación de nuevas plantas procesadoras y el aumento de la capacidad de industrialización de algunas ya existentes, llevaron a que la capacidad potencial creciera considerablemente, pasando de un volumen de 100.000 t anuales, en los años 1985 y 1986, a más de 490.000 t de cebada en la actualidad.*

*En cuanto al área de producción, en el país existen cuatro zonas principales, las tres más importantes están ubicadas en la provincia de Buenos Aires, donde se produce más del 90% del total. El sudeste bonaerense es el más importante con alrededor del 40% de la producción, lo cual representa 300.000 t; el sudoeste bonaerense y La Pampa producen alrededor del 25%, cercano a 190.000 t; el área central de Buenos Aires produce aproximadamente un 30%, lo cual constituye más de 225.000 t; por último, la zona ubicada en el este de Santa Fe y oeste de Córdoba produce alrededor de un 5%, es decir, cerca de 40.000 t, destinando gran parte para la alimentación de cerdos. Tanto en el centro de Buenos Aires como en Santa Fe y Córdoba se utiliza el cultivo de cebada cervecera principalmente porque permite cosechar casi 15 días antes que el trigo y sembrar soja de segunda más temprano.*

*Hasta hace algunos años se aconsejaba evitar sembrar la cebada sobre suelos de alta fertilidad para no elevar el nivel de proteína del grano. Un alto porcentaje de proteína en el grano es indeseable para la industria cervecera porque incide negativamente sobre la calidad del producto final y llevaba a que muchos lotes de cebada fueran rechazados por la industria. Ahora el problema es la falta de fertilidad de los suelos por transformarse en un factor limitante de mayores rendimientos y además, porque un porcentaje cada vez más elevado de partidas de cebada muestra valores de proteínas sumamente bajos, que se traducen en un problema de difícil resolución para el sector industrial cervecero.*

*En la mayoría de las áreas o zonas de producción se utiliza en buena proporción la práctica de fertilización química con fosfato diamónico a la siembra y de urea en macollaje, que permite elevar los rendimientos considerablemente.*

*El control de malezas es una práctica generalizada y no presenta mayores inconvenientes, salvo en aquellos lotes muy infectados con avena fatua debido a la escasez de herbicidas selectivos y altamente eficaces.*

En nuestro país, la siembra y comercialización de cebada cervecera se hacen a través de cooperativas y acopiadores y aún por las mismas malterías<sup>11</sup>.

**Cuadro N° 2. Oferta y Demanda Argentina de Cebada**

<b>Cosecha</b>	<b>Área sembrada has.</b>	<b>Área cosechada has.</b>	<b>Rendimiento tn. por hectárea</b>	<b>Compras a productores en tn.</b>
2006/07	372.828	370.100	3,33	1.231.000
2005/06	267.260	267.260	3,20	855.057
2004/05	284.000	284.000	3,49	992.000
2003/04	390.000	362.137	2,71	982.516
2002/03	325.028	296.158	2,12	627.634
2001/02	304.700	266.568	2,13	566.724
2000/01	296.792	294.587	2,80	824.010

Fuente: CAMARA DE LA INDUSTRIA CERVECERA EN LA ARGENTINA<sup>12</sup>

Los antecedentes de la industria maltero cervecera en nuestro país se remontan a principios de siglo cuando una famosa empresa de la actualidad comienza a desarrollar sus actividades.

En el quinquenio 1980-84 la industria de producción de malta utilizó un volumen anual promedio de 72.000 t de grano de cebada, aumentando a 228.000 t en el quinquenio de 1989-93 y llegando en la actualidad a industrializar alrededor de 490.000 t, lo cual representa más de 680% de crecimiento.

La producción de malta, de acuerdo con la integración económica MERCOSUR, creció en forma considerable. La producción anual media en el quinquenio 1980-84 osciló en 50.000 t, casi totalmente utilizada para consumo interno, creciendo hasta alrededor de 170-180 mil t a mediados de los 90 y actualmente alcanzando las 380.000 t anuales. De este tonelaje de malta producido, alrededor de 130.000 t, lo cual constituye un 30%, se dedican al mercado de la industria cervecera dentro del país y el resto a exportación.

---

<sup>11</sup>TOMASO, Juan Carlos, ob.cit.,p.

<sup>12</sup>CAMARA DE LA INDUSTRIA CERVECERA EN LA ARGENTINA, Cebada cervecera, en: <http://www.camaracervecera.com.ar/cebada-cervecera.php>

*Las malterías distribuyen las semillas de los cultivares que desea producir en cada zona y la compra se realiza bajo exigentes condiciones de calidad del grano establecidas en un contrato. De allí que el productor se ha ido especializando y cuida de obtener un producto dentro de esos parámetros.*

*El consumo interno de cerveza en nuestro país aumentó en forma consistente. Su evolución fue de 2.174.000 hectolitros, en 1981, a 10.824.000 hlt en 1993 y alrededor de 12.000.000 de hlt en la actualidad, lo cual corresponde a casi un aumento del 550%. Esto llevó a que el consumo percapita pasara en ese período de 7,7l/hab año a 37 l/hab/año. Estas cifras son bajas, si se las compara con otros países como Alemania (132 l/hab/año), EE.UU. (84 l/hab/año), Venezuela (74l/hab/año), Brasil (51 l/hab/año) o México (48 l/hab/año)<sup>13</sup>.*

**Imagen N° 3. Industria maltero cervecera**



*Fuente: <http://www.camaracervecera.com.ar/proceso-de-fabricacion-de-la-cerveza.php>*

---

<sup>13</sup> TOMASO, Juan Carlos, ob.cit.,p.

En la República Argentina hay 5 plantas malteras<sup>14</sup>, en las cuales su capacidad productiva y de almacenamiento se mencionan en el siguiente cuadro:

**Cuadro N° 3. Capacidad productiva y de almacenamiento en tn.**

<b>Empresa</b>	<b>Localidad</b>	<b>Capacidad Productiva</b>	<b>Capacidad de almacenamiento</b>
N° 1	TRES ARROYOS	200.000	55.000
N° 2	PUAN	180.000	144.000
N° 3	BAHIA BLANCA	90.000	115.000
N° 4	ROSARIO	135.000	170.000
N° 5	LLAVALLOL	24.000	5.000
	<b>TOTAL</b>	<b>629.000</b>	<b>489.000</b>

Fuente: CAMARA DE LA INDUSTRIA CERVECERA EN LA ARGENTINA<sup>15</sup>

Según la Cámara de la Industria Cervecera en la Argentina, la capacidad anual de producción de cerveza es la siguiente:

**Cuadro N° 4. Capacidad anual de producción de cerveza en hls.**

<b>Empresa</b>	<b>Electrolitos</b>
N° 1	15.300.000
N° 2	2.860.000
N° 3	1.500.000
<b>TOTAL</b>	<b>19.660.000</b>

Fuente: CAMARA DE LA INDUSTRIA CERVECERA EN LA ARGENTINA<sup>16</sup>

---

<sup>14</sup>CAMARA DE LA INDUSTRIA CERVECERA EN LA ARGENTINA, Malta, en: <http://www.camaracervecera.com.ar/malta.php>

<sup>15</sup>ibid

<sup>16</sup>CAMARA DE LA INDUSTRIA CERVECERA EN LA ARGENTINA, Capacidad anual de producción de cerveza, en: <http://www.camaracervecera.com.ar/capacidad-anual-de-produccion-de-cerveza.php>

*La cervecería tiene dos sectores bien definidos para elaborar cerveza: uno en el cual la producción de malta, que es la materia prima fundamental para elaborar cerveza, se produce a partir de la cebada cervecera de primera calidad; y otro que corresponde a la producción de cerveza<sup>17</sup>.*

*En cuanto al malteo, el mismo es un proceso físico-químico controlado, durante el cual los granos desarrollan y activan sus sistemas enzimáticos y modifican suficientemente sus reservas alimenticias. Su finalidad es la obtención de malta, lo que se puede conseguir a partir de cualquier grano que se someta a una germinación controlada, la cual se suspende en una etapa adecuada de secado. La cebada es la única gramínea para la elaboración de malta debido a la presencia de varias capas aleurónicas que desarrollan una gran cantidad de enzimas, al alto contenido de almidón, a los bajos niveles de proteína y aceite, y a que la cáscara ofrece protección a la plúmula durante todo el proceso de malteo, evita su rompimiento y facilita la manipulación del grano.*

*Para obtener la malta, el grano de cebada se somete a tres operaciones que son: remojo, germinación y secado; en las que se controla humedad, temperatura y aireación.*

*En el remojo, el objetivo es aumentar el contenido inicial de humedad de la cebada, que es de aproximadamente entre 10 y 13.5%, hasta un 45%, con el propósito de disolver por efecto del agua las sustancias solubles que se encuentran en el grano y promover así el desarrollo del embrión. En este proceso las sustancias nutritivas son transportadas por ósmosis al embrión, el cual disgrega las hormonas que activan sistemas enzimáticos destinados a hidrolizar sustancias insolubles y convertirlas en solubles y asimilables. Durante el mismo es llevada a cabo la respiración, la cual se inicia poco después de la operación y es facilitada por la enzima oxidasa, la cual actuando sobre las grasas y carbohidratos, produce dióxido de carbono. Concentraciones elevadas de éste o por la acumulación de ácido carbónico, etanol, ácido láctico y otras sustancias que se producen a partir de la respiración anaeróbica inhiben las funciones de la nueva planta.*

*La germinación es un proceso bioquímico en el cual el grano comienza a acelerar sus actividades biológicas cuando se reúnen condiciones apropiadas de humedad, temperatura y oxigenación. Durante la germinación ocurre un proceso bioquímico en el interior del grano. Al penetrar el agua se activan las enzimas, como la alfa-amilasa y la beta-amilasa. Estas proteínas transforman los almidones, las*

---

<sup>17</sup> CAMARA DE LA INDUSTRIA CERVECERA EN LA ARGENTINA, Proceso de fabricación de la cerveza, en: <http://www.camaracervecera.com.ar/proceso-de-fabricacion-de-la-cerveza.php>

*proteínas y los minerales contenidos en el endospermo del grano, haciendo accesibles los alimentos que necesita el embrión para desarrollarse. Una de las características de la calidad del grano de la cebada lo indica el poder diastásico, que es la capacidad que tiene el grano para solubilizar los almidones del endospermo. Para que se produzca malta satisfactoriamente es fundamental que la germinación sea vigorosa, rápida y uniforme. Si algunos granos germinan con mayor rapidez, es imposible detener su germinación o acelerar la germinación de los otros. Por eso, la capacidad del grano, principalmente su poder de germinación, es esencial para un buen malteo.*

*El secado es el manejo apropiado de la temperatura y del flujo de aire a fin de remover cierta cantidad de agua y producir un tipo específico de malta. Para conservar la actividad enzimática y evitar un mayor crecimiento de las raíces que ocasionaría un bajo rendimiento de la malta, se interrumpe la germinación mediante el secado. En la primera etapa de este proceso se baja la humedad del grano de 42 a 5 ó 4%, secándolo durante 24 horas aproximadamente. Sin embargo, como el calor destruye las enzimas, el secado se efectúa a una temperatura de 55 a 60 grados centígrados. De esta manera se elimina agua hasta que el grano tenga el 12% de humedad. La segunda etapa se efectúa a 65 y 70 y, hasta 75 y 80 grados centígrados, hasta reducir la temperatura a 5 ó 4% y darle un tratamiento final a la malta<sup>18</sup>.*

*En resumen, la malta es el producto resultante de un proceso natural, durante el cual la cebada sufre cambios en su estructura, aprovechando para ello la excitación natural de las fuentes de energía que posee. Finalmente, de las cualidades y tipos de cerveza que se quieren elaborar, depende la forma de conducción de este proceso de malteado manejando tiempos y temperaturas, de forma tal que acentúen o atenúen efectos que modifican la estructura química y caracterizarán la malta resultante<sup>19</sup>.*

**Imagen N° 4. Proceso maltero**



Fuente:

<http://www.camaracervecera.com.ar>

*La cerveza es una bebida de bajo contenido alcohólico y, por lo tanto, es denominada "bebida de moderación". En su proceso de elaboración, se utilizan materias primas naturales, todas de origen vegetal y, por lo tanto, productos del agro y totalmente ecológicos.*

---

<sup>18</sup> GONZALEZ ARGUELLO, ob.cit.,p.

<sup>19</sup> CAMARA DE LA INDUSTRIA CERVECERA EN LA ARGENTINA, ob.cit.,p.

El Código Alimentario Argentino establece la siguiente definición genérica de cerveza:

*"Con la denominación cerveza se entiende a la bebida que se obtiene por la fermentación alcohólica de un mosto elaborado con cebada germinada sola o en mezcla con otros cereales (malteados o no), sustancias amiláceas o transformadas, lúpulo, levadura y agua potable"<sup>20</sup>.*

Aunque ninguna cerveza es igual a otra, los principios bioquímicos y técnicos para elaborar la cerveza son los mismos.

En primer lugar se realiza la maceración, la cual consiste en mezclar las proporciones apropiadas de malta y de adjuntos en agua caliente, para transformar los almidones en azúcares fermentables. Las sustancias que se solubilizan en el agua se llaman extracto y, la solución de extracto en agua se conoce como mosto. Para ello, la malta triturada se mezcla con agua, calentándola gradualmente por tiempos definidos para que las enzimas actúen a su temperatura óptima. En el macerador, la malta y los adjuntos se mantienen hasta que se obtiene una completa conversión de los almidones en azúcares.

Luego se continúa con la filtración del mosto, la cual es generalmente llevada a cabo por medio de una capa de cascarilla de malta de cebada y partículas formadas al precipitarse el material en el macerador. Al empezar la misma, el mosto turbio es regresado hasta que presenta características de limpieza y brillantez. El residuo o capa de filtración que permanece después de extraer el mosto es el llamado "Grano Agotado de Cervecería" ó "Cebada Agotada".

Posteriormente se realiza el hervido del mosto en el cual el mismo ingresa a las ollas de cocción o de cocimiento, en las que hierve



Fuente: idem

de 1 a 2 horas dependiendo del tipo de cerveza. La ebullición coagula las proteínas, las cuales se separan por sedimentación, de lo contrario enturbian el mosto. La ebullición esteriliza el mosto, inactiva enzimas y desarrolla colores y aromas. En esta etapa se agrega el lúpulo para extraer de él, taninos, aceites esenciales, ácidos amargos y resinas. Los aceites esenciales aportan el aroma. Los taninos intervienen en la formación de espuma y en el característico sabor amargo y aroma de la cerveza.

---

<sup>20</sup> CAMARA DE LA INDUSTRIA CERVECERA EN LA ARGENTINA, ob.cit.,p.

El hervido es seguido por el ajuste de densidad en el cual, después de enfriado el mosto a 20° C, se determina la cantidad de azúcar en °P, lo cual equivale a grados plato: g de azúcar/100 ml de mosto, para ajustar la cantidad de alcohol que se desee en la cerveza.

Continúa este proceso, la fermentación. En esta etapa se añade la levadura al mosto para fermentar los azúcares y transformarlos en alcohol. La misma se lleva a cabo durante 7 días a 12° C en condiciones anaeróbicas<sup>21</sup>.

Los pasos descritos anteriormente se pueden resumir en el siguiente cuadro:

Cuadro N° 5. Proceso maltero-cervecerero



Fuente: <http://www.camaracervecera.com.ar/proceso-de-fabricacion-de-la-cerveza.php>

<sup>21</sup> GONZALEZ ARGUELLO, ob.cit.,p.

Posteriormente se produce la filtración y/o decantación en la cual la levadura se asienta en el fermentador (cerveza lager) y es removida por dichos procesos.

Luego se continúa con el añejamiento en el cual, la cerveza es llevada a tanques de maduración en donde permanece en reposo absoluto y en condiciones anaeróbicas de dos a tres semanas a 4° C. Durante este proceso las sustancias nitrogenadas coaguladas, como las resinas, los fosfatos insolubles y las células de levadura, se sedimentan y los compuestos como diacetilos se transforman en alcoholes, adquiriendo así la cerveza su peculiar transparencia y sabor.

Este paso se continúa con la filtración o pulido; aunque de los tanques de reposo se obtiene una cerveza clarificada naturalmente, se le añaden sustancias como Policlar-AT, Nylon 66 o papaína para que actúen en la estructura proteína-tanino y así aumentar la calidad y vida de anaquel de la cerveza, luego, la cerveza es carbonatada usando CO<sub>2</sub> y presión de 28 psi, o libra-fuerza por pulgada cuadrada.

Imagen N° 6. Proceso cervecero



Después, es transferida directamente a envases esterilizados y preenfriados a contrapresión. Durante esta operación se evita la formación de espuma y pérdidas de dióxido de carbono. Sin embargo, al final de la etapa de llenado, el envase es agitado para aumentar la espuma y eliminar oxígeno, inmediatamente antes del sellado.

Fuente: idem

Posteriormente se lleva a cabo la pasteurización del producto envasado sometiendo éste a 60° C por 15 minutos, es decir, 15 unidades de pasteurización. Con ello, se inactivan algunas enzimas provenientes de la levadura, como la invertasa, y bacterias que pudieran haber contaminado durante el proceso. Finalmente, los envases llenos se enfrían para ser etiquetados y empacados<sup>22</sup>.

Es conveniente agregar que, por un lado, todos los productos remanentes del proceso de elaboración, es decir, los denominados “desechos agroindustriales”, son totalmente orgánicos y ecológicamente degradables, y por otro lado, que los mismos son aprovechables para la industria de alimentos balanceados ó abonos, como hez de malta, levadura, barridos de la limpieza de malta, entre otros<sup>23</sup>, ó para la industria fármaco alimenticia<sup>24</sup>.

<sup>22</sup> GONZALEZ ARGUELLO, ob.cit.,p.

<sup>23</sup> CAMARA DE LA INDUSTRIA CERVECERA EN LA ARGENTINA, ob.cit.,p.

<sup>24</sup> VIOQUE Javier y MILLÁN Francisco, Los hidrolizados proteicos en alimentación: suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional, en: [http://digital.csic.es/bitstream/10261/5750/1/IG\\_AGROCSIC\\_2.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/5750/1/IG_AGROCSIC_2.pdf)

***SUSTANCIAS ANTINUTRITIVAS  
COMPONENTES INDESEABLES  
EN UN DESECHO APROVECHABLE***



En la cebada existen componentes llamados “sustancias antinutritivas” o “factores antinutricionales”<sup>1</sup>.

En términos generales, éstos consisten en diversas sustancias naturales de distinta índole que inhiben, de una u otra forma, la utilización digestiva o metabólica de los nutrientes, mientras que otras tienen la propiedad de degradar o destruir los nutrientes por vía química o enzimática<sup>2</sup>. Entonces, los mismos pueden clasificarse en dos tipos: aquellos que destruyen los nutrientes, como es el caso de los productos de la oxidación lipídica, los sulfitos y las tiaminasas; y los inhibidores de la eficacia nutricional, dentro de los cuales se encuentran las antiproteasas y antiamilasas, la avidina, los ácidos fítico y oxálico, y los taninos o compuestos polifenólicos<sup>3</sup>.

Dentro del primer grupo, los productos de la oxidación lipídica se consideran, y lo son, sustancias con propiedades antinutricionales, porque son responsables de una destrucción selectiva de los ácidos grasos poliinsaturados<sup>4</sup>, en particular de los clasificados como esenciales<sup>5</sup>, dentro de los cuales se encuentran los ácidos linoleico, linolénico y araquidónico. Paralelamente, provocan una fuerte destrucción de las vitaminas liposolubles<sup>6</sup> A y E, que son oxidables y que desempeñan el papel de antioxidantes; por esta razón, la determinación de las moléculas resultantes de la oxidación, como son el hiperóxido, peróxido, malondialdehído, hexanal y pentanal, la acroleína, el epóxido, entre otros, presenta un doble interés en los alimentos. Por un lado, indican una alteración de la fase grasa y una pérdida nutricional, y por el otro, algunas de ellas presentan un carácter tóxico como lo son la acroleína y el epóxido.

---

<sup>1</sup> TACON, Albert G.J., *Ictiopatología nutricional. Signos morfológicos de la carencia y toxicidad de los nutrientes en los peces cultivados*, en: <http://www.fao.org/DOCREP/003/T0700s/T0700S06.htm#ch6>

<sup>2</sup> CHEFTEL, Jean-Claude, CHEFTEL, Henri y BESANÇON, Pierre, *Introducción a la Bioquímica y la Tecnología de los Alimentos*; España, Acirbia editorial, 1992, 2ª edición, p. 209-217.

<sup>3</sup> *ibid*

<sup>4</sup> Los ácidos grasos poliinsaturados son ácidos grasos que poseen más de un doble enlace entre sus carbonos. Dentro de este grupo encontramos el ácido linolénico (omega 3) y el linoleico (omega 6) que son esenciales para el ser humano.

<sup>5</sup> Los ácidos grasos esenciales son aquellos que el organismo no puede sintetizar, por lo que deben obtenerse por medio de la dieta. Se trata de ácidos grasos poliinsaturados con todos los dobles enlaces en posición *cis*.

<sup>6</sup> Las vitaminas liposolubles son las que se disuelven en disolventes orgánicos, grasas y aceites. En este grupo entran las vitaminas A, D, E y K.

En el caso de los sulfitos, éstos son agentes blanqueantes ampliamente utilizados en tecnología agrícola y alimentaria para prevenir el pardeamiento enzimático<sup>7</sup> de los productos vegetales, como las legumbres de cuarta gama, frutas y derivados, los jugos y mostos de uva blanca, entre otros. Los sulfitos provocan, como acción secundaria, la escisión de la vitamina B<sub>1</sub><sup>8</sup> en sus constituyentes, tiazol y metilpirimidina sulfito.

Las tiaminasas degradan la vitamina B<sub>1</sub> y se han detectado tanto en las vísceras de los peces marinos como en los de agua dulce, en los moluscos, en algunas bacterias de la flora intestinal y también en vegetales superiores. Estas enzimas poseen un poder hidrolítico que se manifiesta por una simple escisión de la vitamina B<sub>1</sub> en tiazol y pirimidina, o bien sustituyendo una hipotaurina en el anillo tiazol de la molécula; en ambos casos la tiamina pierde su valor nutritivo.

En cuanto a los factores inhibidores de la eficacia nutricional, hay una gran variedad de sustancias naturales que obstaculizan la misma sin destruir los nutrientes. Productos del mundo vegetal, como granos de leguminosas y de cereales, y también del animal, por ejemplo el calostro, contienen inhibidores enzimáticos, principalmente antiproteasas y, secundariamente, antiamilasas. Otras moléculas se asocian con el nutriente impidiendo así su absorción en la pared intestinal como los ácidos oxálico y fítico, la avidina y los taninos o compuestos polifenólicos. Finalmente, existe en la naturaleza al menos una antivitamina que actúa por competición; es el dicumarol que se manifiesta como antivitamina K. Igualmente, la misma tiene importancia en la alimentación del ganado, ya que solo se detecta en los forrajes enmohecidos<sup>9</sup>.

---

<sup>7</sup> El pardeamiento enzimático, es producido por unas enzimas presentes en el vegetal denominadas polifenoloxidasas, que en un ambiente húmedo producen la oxidación de los polifenoles incoloros, en una primera etapa a compuestos coloreados amarillos denominados teaflavinas, para concluir en tearrubiginas de colores marrones y rojos. También se lo llama "Reacción de Maillard".

<sup>8</sup> La vitamina B<sub>1</sub>, también conocida como tiamina, es una molécula que consta de 2 estructuras cíclicas orgánicas interconectadas: un anillo pirimidina con un grupo amino y un anillo tiazol azufrado unido a la pirimidina por un puente metileno. Es soluble en agua e insoluble en alcohol. Su absorción ocurre en el intestino delgado (yeyuno, ileon) como tiamina libre y como difosfato de tiamina (TDP), la cual es favorecida por la presencia de vitamina C y ácido fólico pero inhibida por la presencia de etanol (alcohol).

<sup>9</sup> CHEFTEL, Jean-Claude, CHEFTEL, Henri y BESANÇON, Pierre, ob.cit.,p.

En el caso particular de la cebada, en ella se encuentran las siguientes sustancias antinutritivas:

**Cuadro N° 6. Diversidad de factores antinutricionales (ANF) en la cebada**

Cereal	Inhibidores de Tripsina	Lecitinas	Compuestos Polifenólicos (Taninos)	Otros ANF
Cebada	- /+	-	+ /++ /+++	-

En donde: - Muy bajo nivel de detección; + bajo nivel; ++ Nivel medio; +++ Alto nivel.

Fuente: AMANDUS ALVARADO GILIS, Chistian<sup>10</sup>

En relación a los inhibidores de tripsina, los mismos forman parte de las mencionadas antiproteasas, las cuales son fracciones proteicas presentes en concentraciones elevadas en la soja y clara de huevo, el calostro y, en dosis mucho menores, en la mayoría de los granos de leguminosas y de cereales. Casi todas son termolábiles, es decir, resultan desnaturalizadas durante la cocción; por lo tanto, su impacto en la alimentación humana y la presencia en la cebada agotada, resultan mínimos, por lo cual, no se considera relevante la determinación experimental de las mismas en dicho cereal, pero tienen importancia en zootecnia<sup>11</sup>. Actúan gracias a una afinidad muy selectiva por una o dos proteínas enzimáticas, frecuentemente la tripsina y, bastante a menudo, la quimiotripsina, la papaína, las peptidasas, entre otras. El complejo que forman con la enzima obstaculiza su funcionamiento reduciendo la utilización digestiva de las proteínas<sup>12</sup>.

Dentro del grupo de las lecitinas, las que se pueden encontrar en la cebada son las denominadas "Fitohemaglutininas"<sup>13</sup>. La Fitohemaglutinina, conocida como PHA por la abreviación de Phytohaemagglutinin, es una lecitina ampliamente distribuida

---

<sup>10</sup>AMANDUS ALVARADO GILIS, Chistian, *Micotoxinas en Nutrición Animal*, en: <http://www.monografias.com/trabajos16/micotoxinas/micotoxinas.shtml>

<sup>11</sup> La zootecnia es la técnica que se ocupa del estudio de la producción de animales domésticos y silvestres, así como de sus derivados (carne, huevo, leche, piel, etc.), teniendo en cuenta el bienestar animal; fijándose como objetivo la obtención del óptimo rendimiento de las explotaciones pecuarias bajo criterios de sostenibilidad.

<sup>12</sup> CHEFTEL, Jean-Claude, CHEFTEL, Henri y BESANÇON, Pierre, *ob.cit.*,p.

<sup>13</sup> TACON, Albert G.J., *ob.cit.*,p.

entre las legumbres y en algunas oleaginosas incluida la soja *Glycine max*<sup>14</sup>, pero se presenta en bajos niveles en la cebada, de allí que no se considere relevante su determinación en el laboratorio, al igual que los inhibidores de tripsina<sup>15</sup>. Las lecitinas son proteínas que reconocen carbohidratos y se caracterizan por su habilidad para combinarse con receptores de membrana de los mismos. La PHA fue reconocida por su capacidad para aglutinar eritrocitos y leucocitos, además, estimula inespecíficamente la proliferación de células T. Bulisani, entre otros (1973),<sup>16</sup> han realizado estudios con ratas alimentadas con lecitinas purificadas aisladas de semilla de frijol rojo *Phaseolus vulgaris* los cuales han mostrado uniones directas de lecitina a la mucosa intestinal interaccionando directamente con los enterocitos e interfiriendo en la absorción y transporte de nutrientes, en particular los carbohidratos, durante la digestión y causando lesiones epiteliales en el intestino<sup>17</sup>.

Cuando se hace mención de otros factores antinutricionales (ANF), en el caso de la cebada, se hace referencia al ácido fítico<sup>18</sup>. Éste, denominado también, ácido inosito-hexafosfórico, representa la reserva de fósforo de numerosas semillas que forman parte de la alimentación, como la de los cereales, leguminosas y frutos secos diversos<sup>19</sup>. Las funciones fosfóricas de esta molécula se unen con los cationes divalentes<sup>20</sup> como el calcio, cobre, hierro y zinc, para formar complejos insolubles que causan un efecto detrimental en la biodisponibilidad de algunos de estos minerales. No obstante la misma depende de varios factores como la cantidad de ácido fítico, la concentración de minerales, el tamaño y la valencia<sup>21</sup>, la asociación del ácido fítico con la proteína, el tratamiento térmico del alimento, el pH y la presencia de iones metálicos. El malteo de la cebada elimina los fitatos por la acción de la enzima fitasa que es desarrollada durante la germinación, por lo que el grano agotado de cervecería está prácticamente libre del ácido fítico, por tal motivo, tampoco se considera relevante su determinación experimental<sup>22</sup>.

---

<sup>14</sup> WIKIPEDIA, Fitohemaglutinina, en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Fitohemaglutinina>

<sup>15</sup> AMANDUS ALVARADO GILIS, Chistian, ob.cit.,p.

<sup>16</sup> BULISANI, Eduardo Antônio; MIYASAKA, Shiro and ALMEIDA, Luiz D'Artagnan *Observações sobre a adubação foliar em feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) - II. Bragantia [online]. 1973, vol.32, n.unico ISSN 0006-8705.*

<sup>17</sup> WIKIPEDIA, ob.cit.,p.

<sup>18</sup> AMANDUS ALVARADO GILIS, Chistian, ob.cit.,p.

<sup>19</sup> CHEFTEL, Jean-Claude, CHEFTEL, Henri y BESANÇON, Pierre, ob.cit.,p.

<sup>20</sup> Un catión divalente es un elemento o compuesto que ha perdido dos electrones y por lo tanto tiene dos protones más que el número total de electrones y una carga de +2, que simboliza el exceso de los mencionados protones.

<sup>21</sup> En química, la valencia, también conocida como número de valencia, es una medida de la cantidad de enlaces químicos formados por los átomos de un elemento químico.

<sup>22</sup> GONZALEZ ARGUELLO, José Saul, ob.cit.,p.

En referencia a los taninos, tal como se ha mencionado en el cuadro 1, éstos representan los mayores niveles de sustancias antinutritivas presentes en la cebada<sup>23</sup>, y dado que el malteo de la misma no los elimina, es de fundamental importancia su extracción en la variedad agotada<sup>24</sup>.

El término tanino fue originalmente utilizado para describir ciertas sustancias orgánicas que servían para convertir a las pieles crudas de animales en cuero, proceso conocido en inglés como tanning ("curtido" en español). Las mismas se utilizan en el curtido porque reaccionan con las proteínas de colágeno presentes en las pieles de los animales, uniéndolas entre sí y de esta forma, aumenta la resistencia de la piel al calor, a la putrefacción por agua, y al ataque por microbios<sup>25</sup>.

Estos compuestos antinutricionales son sustancias amorfas que con el agua forman coloides<sup>26</sup> de reacción ácida. Se definen como polímeros fenólicos o polifenoles<sup>27</sup> de estructura química variada, que se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo vegetal. Son de alto peso molecular (500-3000 Daltons<sup>28</sup>) y se localizan en vacuolas<sup>29</sup> combinados con alcaloides<sup>30</sup> y proteínas, desempeñando una función defensiva frente a insectos y hongos<sup>31</sup>.

Los mismos tienen un ligero olor característico, sabor amargo y astringente<sup>32</sup>, y su color va desde el amarillo hasta el castaño oscuro<sup>33</sup>. Según su concentración en un

---

<sup>23</sup> AMANDUS ALVARADO GILIS, Chistian, ob.cit.,p.

<sup>24</sup> GONZALEZ ARGUELLO, José Saul, ob.cit.,p.

<sup>25</sup> ISAZA M. José Hipólito, Taninos o polifenoles vegetales, en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/849/84903303.pdf>

<sup>26</sup> En química un coloide, suspensión coloidal o dispersión coloidal es un sistema físico-químico formado por dos o más fases, principalmente éstas son: una continua, normalmente fluida, y otra dispersa en forma de partículas; por lo general sólidas.

<sup>27</sup> Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas encontradas en plantas caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula, el cual es aquel que posee un anillo bencénico con al menos un grupo hidroxilo.

<sup>28</sup> La unidad de masa atómica unificada (símbolo u) o dalton (símbolo Da) es una unidad de masa empleada en física de partículas y bioquímica, especialmente en la medida de masas atómicas y moleculares. Equivale a la doceava (1/12) parte de la masa de un átomo de carbono-12. En el Sistema Internacional de Magnitudes (ISO 80000-1), se da como único nombre el de dalton y desaconseja el de unidad de masa atómica unificada.

<sup>29</sup> Las vacuolas son estructuras celulares, muy abundantes en las células vegetales, contenidas en el citoplasma de la célula, de forma más o menos esféricas u ovoideas, generadas por la propia célula al crear una membrana cerrada que aísla un cierto volumen celular del resto del citoplasma. Su contenido es fluido, almacenan productos de nutrición o de desecho, pueden contener enzimas lisosómicas.

<sup>30</sup> Se llaman alcaloides (de álcali, carbonatos de alcalinos, y -oide, parecido a, en forma de) a aquellos metabolitos secundarios de las plantas sintetizados, generalmente, a partir de aminoácidos. Los verdaderos derivan de un aminoácido y son por lo tanto, nitrogenados.

<sup>31</sup> PEDRAZA OLIVERA, Redimio M., MARTÍNEZ SÁEZ, Silvio J., HERNÁNDEZ, Jorge E. y FRANCO GUERRA, Francisco J., Los taninos en los forrajes y su papel en la nutrición de los rumiantes, en: <http://www.reduc.edu.cu/147/05/1/14705105.pdf>

<sup>32</sup> El sabor astringente es el que se produce en la boca y que es una sensación entre la sequedad intensa y el amargor.

<sup>33</sup> ISAZA M. José Hipólito, ob.cit.,p.

producto alimentario, desarrollan una nota organoléptica<sup>34</sup> positiva, como es el caso del vino o la cerveza, o negativa, cuando su astringencia y su sabor amargo son excesivos<sup>35</sup>.

Químicamente son metabolitos secundarios de las plantas, fenólicos, no nitrogenados, solubles en agua y no en alcohol ni solventes orgánicos.

Hay dos categorías de estas sustancias, clasificadas en base a su vía de biosíntesis<sup>36</sup> y sus propiedades químicas: los hidrolizables o hidrosolubles y los condensados o no hidrosolubles.

Los primeros, también denominados gálicos o pirogálicos, desde el punto de vista químico son heterósidos<sup>37</sup>, y están constituidos generalmente por una molécula de un monosacárido, el cual es glucosa en la mayoría de los casos, a la cual se unen varias unidades de ácidos polifenólicos.

El ácido polifenólico más simple es el ácido gálico<sup>38</sup>, un trifenol que contiene además un grupo carboxilo. La unión de dos moléculas de ácido gálico origina el ácido digálico, formándose una unión éster entre el grupo ácido de una molécula y un hidroxilo fenólico de otra. Si mediante otra unión éster se acopla una tercera molécula de ácido gálico, se forma el ácido trigálico.

En estos taninos, el grupo carboxilo libre de cualquiera de estos ácidos se combina mediante uniones ésteres con los hidroxilos alcohólicos o el hidroxilo hemiacetalico del monosacárido. Debe tenerse en cuenta que no siempre la totalidad de los hidroxilos<sup>39</sup> del monosacárido están esterificados, por lo que el número de restos de los ácidos puede variar de uno a cinco.

Dentro de estas sustancias hidrolizables, puede establecerse una nueva división en relación con los productos que aparecen luego de la hidrólisis<sup>40</sup>. Los taninos gálicos, los que por hidrólisis originan el monosacárido y varias unidades de ácido

---

<sup>34</sup> Las propiedades organolépticas son el conjunto de descripciones de las características físicas que tiene la materia en general, como por ejemplo su sabor, textura, olor, color. Todas estas sensaciones producen al comer una sensación agradable o desagradable.

<sup>35</sup> CHEFTEL, Jean-Claude, CHEFTEL, Henri y BESANÇON, Pierre, ob.cit.,p.

<sup>36</sup> El anabolismo o biosíntesis es una de las dos partes del metabolismo, encargada de la síntesis o bioformación de moléculas orgánicas o biomoléculas más complejas a partir de otras más sencillas o de los nutrientes, con requerimiento de energía, constituyendo reacciones endergónicas, al contrario que el catabolismo.

<sup>37</sup> Los heterósidos son el resultado de la condensación de una o varias osas, es decir azúcares simples, con una estructura no glucídica llamada genina o aglicona.

<sup>38</sup> El ácido gálico es un ácido orgánico también conocido como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, que se encuentra en las agallas, en las hojas de té, en la corteza de roble y otras plantas. La fórmula química es  $C_6H_2(OH)_3COOH$ . El ácido gálico se encuentra tanto en su forma libre como formando parte de taninos.

<sup>39</sup> El grupo hidroxilo (también llamado oxhidrilo) -OH es un grupo funcional compuesto de 1 átomo de oxígeno y 1 de hidrógeno, característico de los alcoholes.

<sup>40</sup> La hidrólisis (del griego: ὑδῶρ (hudōr), agua; y λύσις (lisis), pérdida o disociación) es una reacción química entre agua y otra sustancia, como sales.

gálico, que en la molécula del tanino se hallan como tales, o que provienen de la hidrólisis de los ácidos digálico y/o trigálico. Y los elágicos, en los cuales como productos de la hidrólisis aparece ácido elágico<sup>41</sup>, además del monosacárido y ácido gálico. En la molécula del tanino éste no existe como tal, sino en forma abierta, como el ácido hexahidroxidifénico, el cual se forma por acoplamiento oxidativo de dos moléculas de ácido gálico y donde sus grupos carboxilo están esterificando los hidroxilos del monosacárido; como resultado de la hidrólisis, el ácido hexahidroxidifénico forma ésteres<sup>42</sup> internos, llamados lactonas, y da origen al ácido elágico. Los taninos hidrosolubles son más pequeños que los condensados y son hidrolizados con más facilidad, tanto por ácidos, tal es así que sólo basta ácido diluido para lograrlo, y álcalis como por vía enzimática. La mayoría tiene una masa molecular entre 600 y 3.000<sup>43</sup>.

**Imagen N° 7. Estructura Química de un Tanino Hidrolizable**



Fuente: <http://es.wikipedia.org/wiki/Polifenol>

En cuanto a los segundos, a veces también llamados proantocianidinas, son polímeros de un flavonoide<sup>44</sup> llamado antocianidina. Estos compuestos no son heterósidos, sino que resultarían de la condensación o polimerización de unidades de flavanoles, tales como la catequina y la leucocianidina, quienes cumplirían el papel de precursores, y no contienen azúcares en su estructura.

---

<sup>41</sup> El ácido elágico es un polifenol, que protege a muchas plantas contra la luz ultravioleta, virus, bacterias y parásitos. Está presente en las plantas como elagitanino, lo que se activa bajo estrés a ácido elágico. Tiene la fórmula sintética C<sub>14</sub>H<sub>6</sub>O<sub>8</sub>.

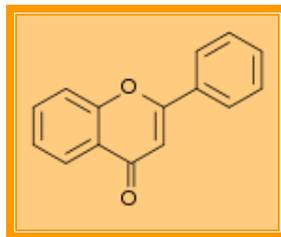
<sup>42</sup> En la química, los ésteres son compuestos orgánicos en los cuales un grupo orgánico reemplaza a un átomo de hidrógeno (o más de uno) en un ácido oxigenado.

<sup>43</sup> ISAZA M. José Hipólito, ob.cit.,p.

<sup>44</sup> Flavonoide (del latín flavus, "amarillo") es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas.

Por tratamiento con reactivos hidrolíticos, los taninos condensados no liberan sus unidades estructurales, sino que por el contrario tienden a polimerizarse aún más, especialmente en solución ácida, originando productos rojos, amorfos e insolubles, conocidos como flobafenos o rojos de tanino<sup>45</sup>.

**Imagen N° 8. Estructura Química de un Tanino Condensado**



Fuente: <http://es.wikipedia.org/wiki/Polifenol>

Las propiedades más interesantes de estos compuestos polifenólicos se deben a su capacidad de combinarse con diversas sustancias formando complejos. El empleo más antiguo conocido de estas sustancias, como ya se ha mencionado, es en la industria de los curtidos. Aunque en la actualidad se utilizan otros compuestos para curtir, todavía en algunos sitios y para curtidos especiales se sigue recurriendo a su uso. Durante este proceso se establecen enlaces entre las fibras de colágeno de la piel; los taninos y las macromoléculas se combinan gracias a los grupos fenólicos de los primeros formando puentes de hidrógeno, a la vez se establecen enlaces covalentes<sup>46</sup> que son los que aseguran que la unión perdure a lo largo del tiempo. Esto requiere que el tanino posea una masa molecular entre límites bien definidos, no demasiado elevada para que pueda intercalarse entre los espacios interfibrilares, ni muy pequeña, pues en ese caso no formaría suficiente número de enlaces como para asegurar la estabilidad de la unión en el tiempo.

De las actividades farmacológicas, se destacan sus propiedades astringentes, tanto por vía interna como tópica. Por la primera, se emplean como antidiarreicos, favoreciéndose esta actividad por cierto efecto antiséptico, ya que precipitan las enzimas extracelulares secretadas por los microorganismos causantes de las

---

<sup>45</sup> ISAZA M. José Hipólito, ob.cit.,p.

<sup>46</sup> Un enlace covalente se produce por compartición de electrones entre dos átomos. Este tipo de enlace se produce cuando existe electronegatividad polar pero la diferencia de electronegatividades entre los átomos no es suficientemente grande como para que se efectúe transferencia de electrones. De esta forma, los dos átomos comparten uno o más pares electrónicos en un nuevo tipo de orbital, denominado orbital molecular.

*infecciones, lo que hace que sean de utilidad en diarreas infecciosas. Poseen también propiedades vasoconstrictoras por lo que se utilizan tanto interna como tópicamente en el tratamiento de afecciones vasculares como varices o hemorroides y en pequeñas heridas. El uso tópico está indicado en diversos problemas de la piel, empleándose en ciertas dermatosis así como en cosmética como tónicos astringentes.*

*Presentan también propiedades antioxidantes comportándose como captadores de radicales libres<sup>47</sup>.*

*Actúan como inhibidores enzimáticos al precipitar la fracción proteica de los enzimas; esto permite en ocasiones la buena conservación de otros principios activos en las drogas, como por ejemplo algunos heterósidos, ya que impiden su hidrólisis enzimática.*

*También se han utilizado como antidotos en diversos envenenamientos, por ejemplo con alcaloides tóxicos debido a su propiedad de formar complejos con los mismos.*

*Además de su aplicación en terapéutica, presentan interés en la industria de curtidos, como ya ha sido comentado, pinturas, adhesivos, entre otras<sup>48</sup>.*

*Desde el punto de vista nutritivo, tienden a inhibir la digestión enzimática por su afinidad por las proteínas; los efectos son especialmente acusados en el caso de la digestión nitrogenada, ya que los taninos insolubilizan tanto el sustrato como los reactivos hidrolíticos, es decir, las proteasas<sup>49</sup>.*

*Las especies hidrolizables son las más reactivas por su bajo peso molecular. Su extracción puede realizarse por distintas técnicas, después de adicionar un reductor como puede ser el ácido ascórbico o la hidroquinona<sup>50</sup>: con agua en ebullición o en frío con soluciones metanólicas, etanólicas, butanólicas frecuentemente acidificadas por ácido clorhídrico o acético.*

---

<sup>47</sup> Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón (e-) desapareado en capacidad de aparearse, por lo que son muy reactivos.

<sup>48</sup> ISAZA M. José Hipólito, ob.cit.,p.

<sup>49</sup> Las peptidasas o proteasas son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas. Usan una molécula de agua para hacerlo y por lo tanto se clasifican como hidrolasas.

<sup>50</sup> Producto químico que se presenta en forma de prismas hexagonales incoloros, solubles en alcohol, éter y agua caliente. Se usa como antiséptico, antipirético y como revelador de la fotografía.

*En la mayoría de los métodos, el extracto bruto se somete a una etapa de purificación pasando por un cartucho del tipo Sep-Pak, por una columna Sephadex<sup>51</sup> o por reextracción con un solvente apropiado, como el acetato de etilo. El tipo de purificación depende del método analítico elegido.*

*Existen muchas técnicas espectrofotométricas ampliamente utilizadas en el campo alimentario, pero estas miden generalmente el conjunto de moléculas polifenólicas<sup>52</sup>. La espectrofotometría es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones químicas y biológicas. El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia<sup>53</sup>.*

*En cambio, los métodos cromatográficos basados en la cromatografía en capa fina y en la HPLC, permiten la separación e identificación de las diversas familias de taninos, pero requieren de una preparación particularmente delicada consistente en una fase de precipitación y otra de recuperación antes de inyectar en el sistema cromatográfico<sup>54</sup>. La cromatografía es un método físico de separación para la caracterización de mezclas complejas, la cual tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia y la física. Es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes. Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido que puede ser gas, líquido o un fluido supercrítico<sup>55</sup>, que arrastra a la muestra a través de una fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido. En el caso de la cromatografía en capa fina, ésta se basa en la preparación de una capa, uniforme, de un absorbente mantenido sobre una placa, la cual puede ser de vidrio, aluminio u otro soporte. La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), del inglés High Performance Liquid Chromatography, es la técnica*

---

<sup>51</sup> Sephadex es una marca registrada de gel dextrano que se usa en laboratorio para la técnica de filtración en gel y cromatografía. Las moléculas de dextrano están unidas entre sí con enlaces cruzados. Variando estos enlaces, se ven alteradas las propiedades del gel.

<sup>52</sup> CHEFTEL, Jean-Claude, CHEFTEL, Henri y BESANÇON, Pierre, ob.cit.,p.

<sup>53</sup> WIKIPEDIA, Espectrofotometría, en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Espectrofotometr%C3%ADa>

<sup>54</sup> CHEFTEL, Jean-Claude, CHEFTEL, Henri y BESANÇON, Pierre, ob.cit.,p.

<sup>55</sup> Un fluido supercrítico (FSC) es cualquier sustancia que se encuentre en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico. Posee unas propiedades típicas, lo que habitualmente se denomina como "un híbrido entre un líquido y un gas", es decir, puede difundir como un gas, y disolver materiales como un líquido. Los FSC se caracterizan por el amplio rango de densidades que pueden adoptar. Por encima de las condiciones críticas, pequeños cambios en la presión y la temperatura producen grandes cambios en la densidad.

*cromatográfica más empleada en la actualidad. Es utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica en la cual, se utiliza un tubo cilíndrico, en cuyo interior se coloca la fase estacionaria y a su través se hace pasar la fase móvil. El flujo de la fase móvil, que puede ser líquido o gas, a través de la estacionaria se consigue por presión, por capilaridad o por gravedad<sup>56</sup>*

---

<sup>56</sup> WIKIPEDIA, Cromatografía, en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatograf%C3%ADa>

***PROTEÍNAS ALIMENTARIAS***

***CONSTITUYENTES DE GRAN IMPORTANCIA***

***NUTRICIONAL Y FUNCIONAL***



*El grano de cebada contiene, como se ha mencionado, entre un 10,0 y 11,0% de proteínas en promedio<sup>1</sup>.*

*Las mismas son macromoléculas complejas que pueden constituir el 50% o más del peso seco de las células vivas y tienen un papel fundamental en su estructura y función<sup>2</sup>. Durante todos los procesos de crecimiento y desarrollo, crean, reparan y mantienen los tejidos corporales; desempeñan funciones metabólicas, por ejemplo, actúan como enzimas, hormonas y anticuerpos; y reguladoras a saber: asimilación de nutrientes, transporte de oxígeno y de grasas en la sangre, eliminación de materiales tóxicos, regulación de vitaminas liposolubles y minerales; y además, forman parte de la estructura básica de tejidos como músculos, tendones, piel, uñas; entre otras<sup>3</sup>. Las proteínas son consideradas como el grupo de compuestos que mayor cantidad de funciones desempeñan en los seres vivos<sup>4</sup>. Prácticamente todos los procesos biológicos dependen de la presencia y/o actividad de este tipo de nutriente.*

*Se trata de polímeros<sup>5</sup> compuestos por un gran número de unidades estructurales fundamentales, relativamente simples, que son los llamados aminoácidos. Cientos o miles de estos constituyentes pueden participar en la formación de las proteínas las cuales todas contienen carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno y casi todas poseen también azufre. Si bien hay ligeras variaciones entre las diferentes proteínas, el contenido de nitrógeno representa en término medio, el 16% de la masa total de la molécula; es decir, 6,25 g de proteína contienen 1 g de nitrógeno<sup>6</sup>.*

*Los aminoácidos son entonces, los monómeros de las moléculas proteicas. Generalmente en las proteínas están presentes 20 variedades diferentes aunque también pueden encontrarse en la naturaleza otras menos corrientes, algunas de las cuales poseen funciones biológicas. Dentro de las primeras se encuentran la alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, fenilalanina, glicina, ácido glutámico, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptófano y valina. En el segundo grupo se hallan, en el colágeno la*

---

<sup>1</sup> CALLEJO GONZALEZ, Ma. de Jesús, ob.cit.,p

<sup>2</sup> CHEFTEL, Jean-Claude, CUQ, Jean-Louis y LORIENT, Denis, *Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas*; España, Acribia editorial, 1989, p. 1-98.

<sup>3</sup> GONZALEZ-TORRES, Laura, TELLEZ-VALENCIA, Alfredo, SAMPEDRO, José G. y NAJERA, Hugo, *Las proteínas en la nutrición*, en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revsalpubnut/spn-2007/spn072g.pdf>

<sup>4</sup> KARP, G., *Biología Celular y Molecular.*; México, Mc Graw Hill Interamericana editorial, 1998, p. 35-56.

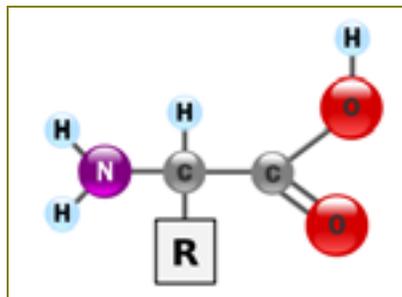
<sup>5</sup> Poli: muchos; meros: partes

<sup>6</sup> BLANCO, Antonio, *Química biológica*; Buenos Aires, Argentina, Ateneo editorial, 2002, 7<sup>o</sup> edición, p. 19-55.

hidroxiprolina y la 5-hidroxisilina; en la elastina la desmosina, y la isodesmosina y en las proteínas de los músculos, la metilhistidina,  $\epsilon$ -N-metil-lisina y  $\epsilon$ -N-trimetil-lisina<sup>7</sup>.

En cuanto a la estructura general de los aminoácidos, los mismos están compuestos por un grupo ácido, carboxilo (-COOH) y un grupo básico, amino (-NH<sub>2</sub>), unidos al carbono central o  $\alpha$ <sup>8</sup> el que además tiene unido siempre un átomo de hidrógeno y una cadena lateral, denominada R, de características variables<sup>9</sup> que influencia sus propiedades fisicoquímicas y, por lo tanto, las propiedades de la proteína que los contienen<sup>10</sup>. Son, entonces,  $\alpha$ -aminoácidos y su fórmula es<sup>11</sup>:

**Imagen N° 9. Estructura general de los aminoácidos**



Fuente: <http://comeryvivirmejor.blogspot.com/2010/08/aminoacidos.html>

La prolina y la hidroxiprolina, que son derivados de la pirrolidina, no siguen esta estructura general<sup>12</sup>.

El carbono central es asimétrico ya que está compartiendo electrones con cuatro grupos diferentes, por eso los aminoácidos, con excepción de la glicina en la cual R es un hidrógeno, presentan actividad óptica, es decir, tienen isómeros D y L<sup>13</sup>. Solamente las formas L forman parte de las proteínas.

Cuando una célula viva sintetiza proteínas, el grupo carboxilo de un aminoácido reacciona con el grupo amino de otro, formando un enlace peptídico, el producto de esta unión es un dipéptido. El grupo carboxilo libre del dipéptido reacciona de modo similar con el grupo amino de un tercer aminoácido, y así sucesivamente hasta formar

<sup>7</sup> CHEFTEL, Jean-Claude, CUQ, Jean-Louis y LORIENT, Denis, ob.cit.,p.

<sup>8</sup> BLANCO, Antonio, ob.cit.,p.

<sup>9</sup> KARP, G., ob.cit.,p.

<sup>10</sup> CHEFTEL, Jean-Claude, CUQ, Jean-Louis y LORIENT, Denis, ob.cit.,p.

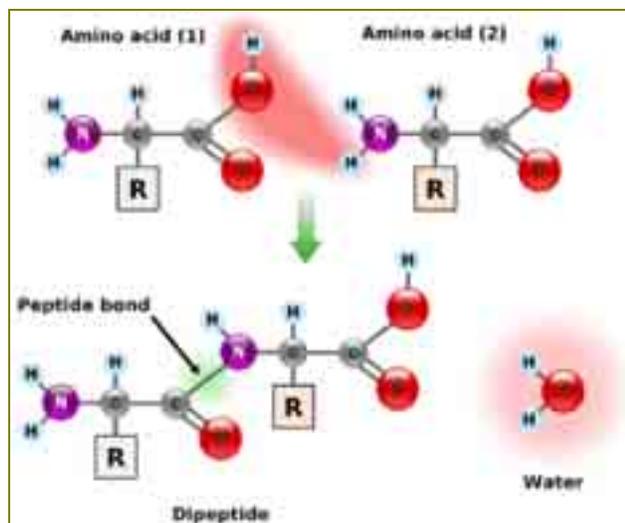
<sup>11</sup> BLANCO, Antonio, ob.cit.,p.

<sup>12</sup> CHEFTEL, Jean-Claude, CUQ, Jean-Louis y LORIENT, Denis, ob.cit.,p.

<sup>13</sup> Los isómeros son moléculas que tienen la misma fórmula molecular pero diferente estructura. Se denomina isómero D al que presenta el grupo funcional a la derecha del espectador y L al que lo tiene hacia la izquierda

una larga cadena<sup>14</sup> que posee un extremo en el cual queda un aminoácido con su grupo  $\alpha$ -amino libre que por convención, se considera como el comienzo de la cadena y se lo llama extremo amino-terminal o N-terminal. La otra punta posee libre el grupo carboxilo unido al carbono  $\alpha$ ; es el extremo final, carboxilo terminal o C-terminal. Los aminoácidos constituyentes de péptidos o proteínas pierden en la unión peptídica un H del grupo amino y OH del carboxilo, formando así una molécula de  $H_2O$  que se pierde; por ello, una vez integradas en la cadena, las unidades que forman el polímero son restos o residuos de aminoácidos<sup>15</sup>. Los oligopéptidos contienen un número indefinido pero pequeño de estos, mientras que los péptidos y polipéptidos constan de un número mayor. Cuando se habla de estos últimos, se hace referencia a los polímeros formados por más de 10 aminoácidos.

**Imagen N° 10. Formación de un enlace peptídico**



Fuente: [http://es.wikipedia.org/wiki/Enlace\\_pept%C3%ADdico](http://es.wikipedia.org/wiki/Enlace_pept%C3%ADdico)

Se considera una proteína a aquella molécula en la cual la cadena polipeptídica tiene una masa molecular superior a 6000 Daltons, correspondiendo a polímeros de más de 50 residuos. Esta macromolécula puede estar formada por una sola cadena o por varias de ellas unidas por enlaces moleculares débiles, siguiendo las instrucciones contenidas en el ADN, el material genético de la célula. Dichas instrucciones son las que determinan cuáles de los veinte aminoácidos se incorporan a la proteína, y en que orden relativo o secuencia lo hacen. Los grupos R de los mismos, como se ha

---

<sup>14</sup> KARP, G., ob.cit.,p.

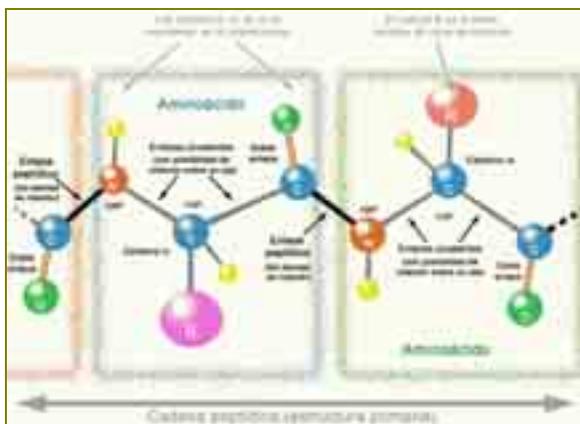
<sup>15</sup> BLANCO, Antonio, ob.cit.,p.

mencionado, establecen la forma final de la proteína y sus propiedades químicas. A partir de las veinte subunidades ya enumeradas, pueden formarse una gran variedad de dichas macromoléculas<sup>16</sup>.

La estructura de las proteínas es muy compleja, razón por la cual resulta conveniente describirla en distintos niveles de organización: estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

La primera es la forma de organización más básica. Se refiere al número e identidad de los aminoácidos que componen la molécula y al ordenamiento o secuencia de esas unidades en la cadena polipeptídica. La unión peptídica, constituida por enlaces covalentes<sup>17</sup>, solo permite formar estructuras lineales; por ello, las cadenas no presentan ramificaciones<sup>18</sup>. La estructura primaria es fundamental para la forma tridimensional que tendrá la proteína. Cualquier modificación en la secuencia de aminoácidos podría ocasionar un cambio en la estructura tridimensional y afectará la función biológica de la macromolécula<sup>19</sup>.

**Imagen N° 11. Estructura primaria de las proteínas**



Fuente: [http://fqep5.galeon.com/Inicio\\_archivos/Anteo.htm](http://fqep5.galeon.com/Inicio_archivos/Anteo.htm)

<sup>16</sup> KARP, G., ob.cit.,p.

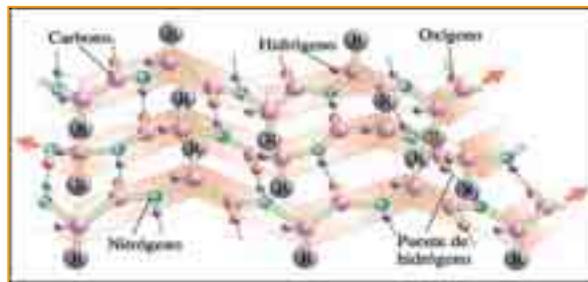
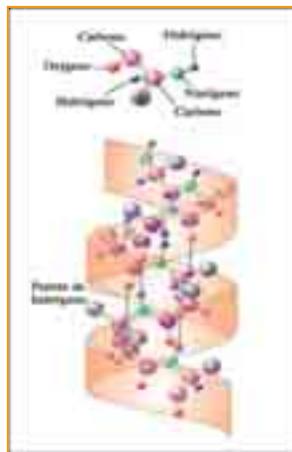
<sup>17</sup> Un enlace covalente se produce por compartimiento de electrones entre dos o más átomos.

<sup>18</sup> BLANCO, Antonio, ob.cit.,p

<sup>19</sup> KARP, G., ob.cit.,p.

La estructura secundaria consiste en la disposición espacial regular, repetitiva, que adopta la cadena polipeptídica, generalmente mantenida por enlaces de hidrógeno y constituye la “columna vertebral” de la proteína<sup>20</sup>. A medida que la cadena de aminoácidos se va ensamblando, empiezan a tener lugar interacciones entre los diversos aminoácidos de la cadena, pudiendo formarse puentes de hidrógeno entre el hidrógeno del amino de un aminoácido y el oxígeno del carboxilo de otro. A causa de estas uniones la cadena polipeptídica se pliega, adoptando dos posibles configuraciones espaciales: las llamadas  $\alpha$ -hélice y hoja  $\beta$ -plegada, las cuales no son las únicas conformaciones que pueden adoptar las proteínas ya que en realidad cada una adopta una forma característica que depende de la secuencia lineal, sin embargo, las antes mencionadas son las más frecuentes.

**Imagen N° 12. Estructura secundaria de las proteínas**



**Configuración hoja  $\beta$  - plegada**

Fuente: <http://preujct.cl/biologia/curtis/libro/c3c.htm>

**Configuración  $\alpha$  - hélice**

Existen porciones de la cadena polipeptídica que no tienen estructura secundaria bien definida, y suelen denominarse enroscamientos aleatorios o *ad random*<sup>21</sup>.

---

<sup>20</sup> BLANCO, Antonio, ob.cit.,p

<sup>21</sup> KARP, G., ob.cit.,p

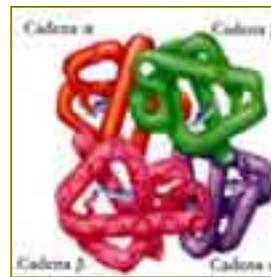
Cuando se habla de estructura terciaria, se hace referencia a la arquitectura tridimensional completa de la proteína<sup>22</sup> debido a la interacción de los grupos R. En muchas proteínas la estructura terciaria le brinda a la proteína una forma globular, como por ejemplo en las enzimas, que son proteínas con función catalítica. Otras proteínas tienen estructura terciaria fibrosa y suelen tener largas hélices o extensas hojas plegadas. Estas proteínas fibrosas suelen tener función estructural como el colágeno<sup>23</sup>.

La estructura cuaternaria se aplica solo a proteínas constituidas por dos o más cadenas polipeptídicas y refiere a la disposición espacial de esas cadenas y a los enlaces que se establecen entre ellas que generalmente son débiles<sup>24</sup>. Es el grado máximo de organización proteica<sup>25</sup>.

**Imagen N° 13. Estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas**



**Estructura Terciaria (\*)**



**Estructura Cuaternaria (\*\*)**

Fuentes: (\*) <http://www.floresdelsureste.org/biologia/ejercicios/proteinas-3/66-proteinas-3-soluciones.html>

(\*\*) <http://www.fundrepa.org/esp/principal/hemo/imagenes.htm>

Las proteínas pueden clasificarse en tres grandes grupos: simples, conjugadas y derivadas.

En el primer grupo se incluyen a aquellas cuya hidrólisis total producía solo aminoácidos. Sin embargo, la disponibilidad de métodos más sensibles ha permitido detectar, en la mayoría de ellas, la presencia de carbohidratos asociados a la molécula. Se las sigue clasificando en este grupo teniendo en cuenta la reducida proporción de glúcidos que contienen con respecto a la masa proteica. Ejemplos de

---

<sup>22</sup> BLANCO, Antonio, ob.cit.,p

<sup>23</sup> KARP, G., ob.cit.,p

<sup>24</sup> BLANCO, Antonio, ob.cit.,p

<sup>25</sup> KARP, G., ob.cit.,p

este grupo son las albúminas<sup>26</sup>, globulinas<sup>27</sup>, histonas<sup>28</sup>, protaminas<sup>29</sup>, glutelinas y gliadinas<sup>30</sup>, y escleroproteínas<sup>31</sup>, como son la queratina, el colágeno y las elastinas.

En el segundo grupo se incluyen a aquellas que se asocian a una proteína simple y otro tipo de compuesto. Corrientemente se llama apoproteína a la porción proteínica, mientras el otro componente recibe el nombre de grupo prostético. Según las características de éste, se distinguen en diferentes categorías o grupos. Así, tenemos las nucleoproteínas, en donde la porción proteínica está representada por una proteína simple, fuertemente básica, del tipo de histonas, unida al grupo prostético; cromoproteínas, formadas por una proteína simple asociada a un grupo prostético coloreado; glicoproteínas, en donde las proteínas se encuentran unidas a hidratos de carbono; fosfoproteínas, las que actúan como reservorio de fosfato; lipoproteínas, en las cuales el grupo prostético está representado por lípidos de diverso tipo; y metaloproteínas, proteínas conjugadas con elementos metálicos como grupo prostético, como el Fe, Cu, Zn, Mg y Mn, esenciales para su estructura y función<sup>32</sup>.

En el tercer grupo se encuentran aquellas obtenidas tras acciones de procesos enzimáticos. Se conocen los proteanos, que son el resultado de una breve acción de ácidos o enzimas y son insolubles en agua; las proteosas, las cuales son solubles en agua, no coagulan por el calor y precipitan por sulfato amónico saturado, siendo productos intermediarios de la digestión proteica; las peptonas, que poseen las mismas propiedades que las proteosas, pero son de menor peso molecular y constituyen productos intermediarios de la digestión proteica; y los péptidos, constituidos por dos o más aminoácidos, unidos por una unión peptídica, que se

---

<sup>26</sup> Proteínas solubles en agua que precipitan de la solución por adición de sales a alta concentración. Tienen carácter ácido y están constituidas por una única cadena. Pertenecen al grupo de las proteínas globulares y se encuentran en tejidos animales y vegetales: sangre (albúmina sérica), leche (lactalbúmina), clara de huevo (ovalbúmina), lentejas (legumelina), alubias (faseolina), trigo (leucosina).

<sup>27</sup> Proteínas insolubles en agua pura que se disuelven en soluciones salinas diluidas. Suelen estar integradas por varias cadenas polipeptídicas y son proteínas globulares. En el plasma sanguíneo existe gran variedad, encontrándose también en la clara de huevo, la leche, y en tejidos animales y vegetales.

<sup>28</sup> Fuertemente básicas, contienen alta proporción de lisina, arginina e histidina. Tienden a formar complejos con compuestos ácidos como ácidos nucleicos. Se las encuentra en los núcleos celulares, asociadas a ADN.

<sup>29</sup> Proteínas de carácter básico. Asociadas a ácidos nucleicos.

<sup>30</sup> Insolubles en agua, pero se disuelven en soluciones salinas, solubles en ácidos diluidos. Se encuentran principalmente en granos de cereales. en general son pobres desde el punto de vista nutritivo, ya que no poseen todos los aminoácidos esenciales en proporciones adecuadas.

<sup>31</sup> También llamadas albuminoides, son insolubles y están presentes solo en animales integrando tejidos de sostén y estructura de gran resistencia física. Constituyen el tipo fibroso.

<sup>32</sup> BLANCO, Antonio, ob.cit.,p

hidrolizan a aminoácidos simples y son productos intermediarios de la digestión proteica<sup>33</sup>.

Las proteínas alimentarias tienen gran importancia como integrantes de la dieta. Los glúcidos y lípidos de los alimentos cumplen principalmente una función de aporte energético; en las proteínas presentes en nuestros alimentos, el papel energético es secundario<sup>34</sup>. La función principal de éstas es aportar el nitrógeno y los aminoácidos necesarios para la síntesis de las proteínas corporales constituyentes del propio organismo y las demás sustancias nitrogenadas<sup>35</sup>. Es decir que su función primordial es estructural o plástica, no reemplazable por otros principios de la dieta<sup>36</sup>.

La digestión de este nutriente comienza en el estómago, con la intervención de su componente ácido, constituido por el HCL, que tiene en este caso dos funciones. La primera es la de convertir el pepsinógeno, segregado por las células de la mucosa, en pepsina, una enzima clave que inicia el proceso de hidrólisis proteica, la segunda, la de favorecer la desnaturalización de la macromolécula. Esta enzima desdobra proteínas y péptidos, en sitios específicos de la unión peptídica, como el grupo carboxilo de algunos aminoácidos, fenilalanina, triptófano y tirosina, y quizás, leucina y otros aminoácidos acídicos. Cuando la proteína, parcialmente fraccionada, pasa al intestino delgado, las enzimas pancreáticas tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasas A y B son las responsables de continuar su digestión. La primera actúa sobre las uniones de péptidos que afectan los grupos carboxilo de arginina y lisina. Es también, al igual que la quimotripsina, una endopeptidasa puesto que escinde péptidos en el interior de la cadena proteica. En cambio, las carboxipeptidasas A y B son consideradas exopeptidasas en cuanto que escinden aminoácidos del carboxilo final de los polipéptidos. La hidrólisis final de los péptidos producidos por las enzimas pancreáticas tiene lugar en la superficie de las membranas de las microvellosidades de las células de la mucosa intestinal. En resumen, el resultado final de la digestión luminal de las proteínas en el intestino delgado es la obtención de fragmentos de oligopéptidos, dipéptidos y aminoácidos. La absorción de las proteínas es principalmente en forma de aminoácidos individuales, y en la parte ileal del intestino delgado. Se realiza por un mecanismo que utiliza transportadores dependientes de energía, los cuales se encuentran en la membrana de las microvellosidades. Éstos, lo son para cuatro grupos distintos de aminoácidos. Un grupo lo constituyen los neutros, y dentro de ellos, los aromáticos, como tirosina, triptófano y fenilalanina; y los

---

<sup>33</sup>Alimentación y nutrición, Nutrientes. Bioquímica. Proteínas, en: [http://www.alimentacionynutricion.org/es/index.php?mod=content\\_detail&id=70](http://www.alimentacionynutricion.org/es/index.php?mod=content_detail&id=70)

<sup>34</sup>BLANCO, Antonio, ob.cit.,p

<sup>35</sup>CHEFTEL, Jean-Claude, CUQ, Jean-Louis y LORIENT, Denis, ob.cit.,p

<sup>36</sup>BLANCO, Antonio, ob.cit.,p

alifáticos, como alanina, serina, treonina, valina, leucina, isoleucina y glicina; y metionina, histidina, glutamina, asparagina y cisteína. Los otros grupos se encuentran constituidos por los aminoácidos básicos, como lisina, arginina, ornitina y cistina; los dicarboxílicos, como ácidos glutámico y aspártico; y los aminoácidos, como prolina, hidroxiprolina y glicina. Los humanos pueden absorber, también, dipéptidos, tripéptidos y tetrapéptidos, y este mecanismo puede ser más rápido que el utilizado individualmente por cada uno de los aminoácidos. Además, se han detectado, tetrapéptidasas en el borde en cepillo de la membrana de los microvellosidades, las cuales hidrolizan tetrapéptidos en tripéptidos y aminoácidos libres, y también, tripeptidasas y dipeptidasas en la membrana y en el citoplasma de las células de la mucosa intestinal. En fracciones de citosol<sup>37</sup> de células de la mucosa intestinal se han aislado dipeptidasas y aminopeptidasas, lo que sugiere que la parte final de la hidrólisis de los péptidos puede tener lugar en el interior de las células<sup>38</sup>.

El ser humano necesita un total de veinte aminoácidos, de los cuales, 11 de ellos el propio organismo los sintetiza y no se necesita adquirirlos de la dieta, éstos son llamados no esenciales o dispensables, a saber: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina y cisteína, fenilalanina y tirosina, treonina, triptofano, y valina. Ya que la metionina es un precursor de la cisteína y la fenilalanina de la tirosina, estos se consideran normalmente en parejas. Los nueve restantes, el individuo no es capaz de sintetizarlos y deben ser aportados por la dieta. Si falta uno solo de ellos no será posible sintetizar ninguna de las proteínas en la que sea requerido dicho aminoácido.

Esto puede dar lugar a diferentes tipos de desnutrición, según cual sea el aminoácido limitante, es decir, el que no se encuentra en la proteína alimentaria y por tanto, no contribuye a la síntesis de nuevas moléculas de este nutriente. La histidina es un aminoácido esencial sólo para niños, ya que la privación de éste en bebés de 3 meses o menos, conlleva a la aparición de eczema como una forma de dermatitis. El déficit de aminoácidos esenciales afecta mucho más a los niños que a los adultos<sup>39</sup>.

---

<sup>37</sup> El citosol, también llamado hialoplasma, es el medio acuoso del citoplasma en el que se encuentran inmersos los orgánulos celulares. Representa aproximadamente la mitad del volumen celular. Etimológicamente citosol significa la parte soluble del citoplasma.

<sup>38</sup> Alimentación y nutrición, Sistema digestivo. Digestión y absorción, en: [http://www.alimentacionynutricion.org/es/index.php?mod=content\\_detail&id=49](http://www.alimentacionynutricion.org/es/index.php?mod=content_detail&id=49)

<sup>39</sup> GONZALEZ-TORRES, Laura, TELLEZ-VALENCIA, Alfredo, SAMPEDRO, José G. y NAJERA, Hugo, ob.cit.,p

En el Cuadro N° 7 se muestran los requerimientos diarios de los 9 aminoácidos indispensables que, en 1985 publicaron, la Organización Mundial de la Salud, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, y la Universidad de Naciones Unidas, WHO/FAO/UNU por sus siglas en inglés. Estas estimaciones son en base a miligramos por kilogramo de peso por día, y es valorado según el grupo de edad.

**Cuadro N° 7. Requerimientos estimados de aminoácidos <sup>a</sup>**

Aminoácido	Requerimientos, mg / kg / día, por grupo de edad			
	Infantes (3-4 meses) <sup>b</sup>	Niños (~2 años) <sup>c</sup>	Niños (10-12 años) <sup>d</sup>	Adultos <sup>e</sup>
Histidina	28	?	?	8-12
Isoleucina	70	31	28	10
Leucina	161	73	42	14
Lisina	103	64	44	12
Metionina más Cisteína	58	27	22	13
Fenilalanina más Tirosina	125	69	22	14
Treonina	87	37	28	7
Triptófano	17	12.5	3.3	3.5
Valina	93	38	25	10
Total sin histidina	714	352	214	84

<sup>a</sup> De WHO (1985).

<sup>b</sup> Basado en las cantidades de aminoácidos en leche materna o de vaca que proveen niveles que apoyan el buen crecimiento.

<sup>c</sup> Basado en el balance de nitrógeno suficiente para apoyar la adecuada ganancia de tejido magro (16mg N / kg × día).

<sup>d</sup> Basado en el rango superior de requerimiento para un balance positivo de nitrógeno.

<sup>e</sup> Basado en el estimado mayor de requerimiento para alcanzar el balance de nitrógeno

Fuente: GONZALEZ-TORRES<sup>40</sup>

Las proteínas alimentarias a menudo se clasifican como “completas” o “incompletas” según su contenido en aminoácidos. Las primeras son aquellas que contienen los nueve aminoácidos indispensables en concentraciones suficientes para cubrir los requerimientos de los seres humanos. Las segundas son deficientes en uno

---

<sup>40</sup> GONZALEZ-TORRES, Laura, TELLEZ-VALENCIA, Alfredo, SAMPEDRO, José G. y NAJERA, Hugo, ob.cit.,p

o más aminoácidos de los nueve esenciales que deben ser proporcionados por los alimentos.

El concepto de proteínas complementarias está basado en la obtención de los nueve aminoácidos indispensables por la combinación de alimentos que tomados aisladamente serían considerados como proteínas incompletas, la cual proporciona todos los aminoácidos esenciales necesarios para el cuerpo humano consiguiendo un patrón equilibrado de aminoácidos que se usan eficientemente. Otra forma de obtener esto, es combinar una pequeña cantidad de una proteína completa con grandes cantidades de la variedad incompleta. En el pasado, los nutricionistas consideraban que las proteínas incompletas tenían que consumirse al mismo tiempo para ser complementarias. Actualmente se acepta que las proteínas complementarias de los alimentos consumidas a lo largo del día, en combinación con las reservas corporales de aminoácidos, generalmente aseguran un balance de aminoácidos adecuado.

El aprovechamiento de este nutriente aislado no depende de su origen, intervienen muchos factores más, como son la combinación con otras proteínas, otras moléculas o nutrimentos, además de los procesos de digestión, absorción, o el hecho de que algunos aminoácidos puedan estar en formas químicas no utilizables, entre otros. El término "calidad proteica" se refiere a la capacidad de una proteína de la dieta para incorporarse en las corporales y se puede estimar a través de varios indicadores, dentro de los que se destaca el valor biológico o "calificación química", la cual, esta definida como la proporción en que se encuentra un aminoácido indispensable limitante con respecto al patrón de referencia. Por definición, se entiende como aminoácido limitante a aquel en el que el déficit es mayor comparado con la proteína de referencia, es decir, aquel que, una vez realizado el cálculo, da un valor químico más bajo. La denominada "de referencia" es una teórica definida por la FAO la cual tiene la composición adecuada para satisfacer correctamente las necesidades proteicas al contener una proporción de aminoácidos esenciales utilizables en un 100%. Así, ha propuesto a la del huevo y a la de la leche humana como referencia. Se han fijado distintas proteínas de referencia dependiendo de la edad, ya que las necesidades de aminoácidos esenciales, como se ha mencionado con anterioridad, son distintas en las diferentes etapas del crecimiento y desarrollo humano.

En la dieta de los seres humanos se puede distinguir entre 2 tipos de estas macromoléculas, las de origen animal y las de origen vegetal. Dentro de las primeras, las que provienen de huevo, leche y derivados lácteos son consideradas como de excelente calidad; otras carnes, que constituyen tejido muscular, como el pescado, res y aves contienen proteínas de buena calidad. De las segundas, la de la soja es

*considerada de buena calidad, la contenida en cereales, harinas y la mayor parte de tubérculos y raíces vegetales está clasificada como de mediana calidad, y la mayoría de las frutas y verduras contienen proteína de baja calidad. Las de origen vegetal, tomadas en conjunto, son menos complejas que las de origen animal y éstas, tienen en general composiciones más próximas a la considerada ideal, pero esto no quiere decir que las vegetales no se puedan aprovechar, o que su calidad se vea desmerecida.*

*En general, se recomiendan unos 40 a 60 g de proteínas al día para un adulto sano. La WHO y las RDA, del inglés Recommended Dietary Allowances, de EUA recomiendan un valor de 0.8 a 1.0 g / kg de peso al día para el mismo grupo. Por supuesto, durante el crecimiento, el embarazo o la lactancia estas necesidades aumentan.*

*Los aminoácidos en los alimentos no siempre están disponibles ya que la degradación de las proteínas así como su absorción puede ser incompleta, siendo el porcentaje promedio de digestión y absorción en las de origen animal de alrededor de un 90% y el de las de origen vegetal de sólo un 60 a un 70% aproximadamente.*

*Hay varias razones que limitan la digestibilidad de estas macromoléculas. Una, es la conformación de la proteína: las proteasas atacan a las fibrosas insolubles más lentamente que a las globulares solubles. Pero, la digestibilidad puede ser fácilmente incrementada por la desnaturalización de este nutriente, por ejemplo, por un tratamiento térmico previo. Otra, es la unión a ciertos metales, lípidos, ácidos nucleicos, celulosa u otros polisacáridos, que puede limitar parcialmente su digestibilidad. Además, existen los llamados factores antinutricionales como los inhibidores de tripsina o quimotripsina, de los cuales se habló en el capítulo anterior. El tamaño y superficie de la partícula donde se encuentran las proteínas también influye sobre la digestibilidad, como en el caso de las proteínas de los cereales en las cuales puede ser incrementada, por ejemplo, mediante el molido más fino de la harina. Además, las diferencias biológicas entre individuos pueden afectar a la digestión de proteínas, así como a la absorción de aminoácidos. La edad es una de estas diferencias, pues en los primeros meses de vida no se encuentran presentes todas las enzimas necesarias para la correcta degradación de este nutriente, así como en los ancianos o adultos mayores se dejan de producir otras tantas enzimas y la digestión se vuelve cada vez más difícil. Algunos otros individuos pueden presentar defectos genéticos como deficiencia de enterocinasa o tripsinógeno, deficiencia de prolina dipeptidasa, síndrome de Hartnup, que es un defecto en el transporte de aminoácidos*

neutros; los cuales impiden que se produzcan enzimas para degradar ciertas proteínas, o que su degradación se lleve a cabo eficazmente<sup>41</sup>.

La conformación de una proteína basada en sus estructuras secundaria y terciaria es frágil. Por ello, el tratamiento de las proteínas por los ácidos, bases, soluciones salinas concentradas, disolventes, calor, radiaciones, entre otros., puede modificar, de una forma más o menos importantes, esta conformación. A este proceso se lo denomina “desnaturalización” la cual es entonces, cualquier modificación de su conformación, a nivel de estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, que no vaya acompañada por la ruptura de los enlaces peptídicos implicados en la estructura primaria. Es un fenómeno complejo, durante el cual aparecen conformaciones nuevas, frecuentemente fugaces y efímeras, en donde el estado final puede corresponder a una estructura polipeptídica, totalmente desplegada, en la que son transitorias las interacciones intraproteicas y proteínas disolventes. Sin embargo, un aumento del nivel de estructura, por encima del de la estructura natural, también debe considerarse como una forma de desnaturalización. Algunas proteínas ya están en su forma natural desplegadas, como es el caso de algunos monómeros de caseínas, lo que explica su estabilidad frente a determinados agentes desnaturalizantes, los cuales han sido mencionados anteriormente, como por ejemplo, el calor.

Los efectos de la desnaturalización son numerosos y entre ellos se encuentran: el descenso de la solubilidad, la alteración de la capacidad de fijación de agua, la pérdida de la actividad biológica, como en el caso de las enzimas; el aumento de la viscosidad intrínseca, la incapacidad de cristalización y el aumento de la sensibilidad al ataque de las proteasas, debido al desbloqueo de enlaces peptídicos correspondientes a los sitios de acción específica de las mismas<sup>42</sup>.

Si la proteína que forma parte de los alimentos esta desnaturalizada, el proceso de digestión es más fácil. Cuando se consume este nutriente, lo que el organismo utiliza son los aminoácidos que lo componen, ya que el organismo fabrica o sintetiza los aminoácidos que no han podido ser absorbidos después de digerir las proteínas de los alimentos. Durante el proceso de digestión de las mismas, deben pasar por las diferentes estructuras que componen el tracto digestivo, en este trayecto, estas macromoléculas se encuentran expuestas a agentes ácidos o a enzimas, de manera

---

<sup>41</sup> GONZALEZ-TORRES, Laura, TELLEZ-VALENCIA, Alfredo, SAMPEDRO, José G. y NAJERA, Hugo, ob.cit.,p

<sup>42</sup> CHEFTEL, Jean-Claude, CUQ, Jean-Louis y LORIENT, Denis, ob.cit.,p

*tal que sufren el proceso de desnaturalización, debido a que se desarman del todo y finalmente, los aminoácidos liberados son absorbidos<sup>43</sup>.*

*El proceso de desnaturalización puede ser reversible o irreversible pero frecuentemente es como en el segundo caso, sobre todo cuando se aplica un tratamiento fuertemente desnaturalizador y la masa molar de la proteína es elevada. Sin embargo, en algunos casos, se produce más o menos rápidamente una renaturalización de la molécula.*

*La sensibilidad de las proteínas a la desnaturalización, está en función de la velocidad con la cual el agente desnaturalizante rompe las interacciones o enlaces que establecen las estructuras secundaria, terciaria o cuaternaria. Como las mismas varían de una proteína a otra, los efectos de dichos agentes van a depender de éstas<sup>44</sup>.*

---

<sup>43</sup>La desnaturalización de los alimentos, en : <http://www.buenastareas.com/ensayos/La-Desnaturalizaci%C3%B3n-De-Los-Alimentos/1807256.html>

<sup>44</sup> CHEFTEL, Jean-Claude, CUQ, Jean-Louis y LORIENT, Denis, ob.cit.,p

***HIDROLIZADOS PROTEICOS***

***UN SOLO PRODUCTO CON VARIOS USOS***

***PARA LA ALIMENTACIÓN***



*La esencia de la hidrólisis proteica es la rotura del enlace péptidico y en consecuencia la generación de péptidos de menor tamaño o incluso de aminoácidos libres. La rotura de estos enlaces puede producirse por métodos químicos con ácidos o bases, o biológicos con enzimas. Hoy día apenas se utiliza el primer método debido a sus efectos perjudiciales sobre la calidad nutricional del producto final, ya que se destruyen L-aminoácidos y se forman compuestos tóxicos como la Lisinoalanina. Por el contrario, el proceso enzimático se realiza en condiciones más suaves de pH y temperatura que van a reducir la formación de compuestos indeseables.*

*La propiedad fundamental de un hidrolizado proteico, que va a determinar en gran medida las restantes características del mismo, es su grado de hidrólisis, es decir, el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original. Existen diversos métodos para medir el mismo, siendo el más usado la titulación con TNBS (2,4,6-trinitrobenzenesulfonicacid) por su reproducibilidad y sencillez. El grado final va a estar determinado por las condiciones usadas, es decir, concentración de sustrato<sup>1</sup>, relación enzima/sustrato, tiempo de incubación y condiciones fisico-químicas como el pH y la temperatura. Otro factor que también va a determinar el mismo, es la naturaleza de la actividad enzimática, es decir, su actividad específica y tipo de actividad. Así la naturaleza de la enzima usada no solo va a influir en éste, sino también en el tipo de péptidos producidos. En este sentido, las proteasas pueden dividirse en dos grandes grupos según su actividad catalítica, como se muestra en la imagen N° 14. Así, pueden ser endopeptidasas si rompen enlaces internos de la cadena proteica o exopeptidasas si hidrolizan el enlace terminal de la cadena. Dentro de las segundas a su vez se pueden dividir en aminopeptidasas si rompen por el extremo N-terminal o carboxipeptidasas si lo hacen por el extremo carboxilo. La especificidad de la proteasa también es variable en función de la secuencia aminoacídica. Por ejemplo, algunas cortan donde haya un aminoácido concreto, mientras que otras son menos específicas y reconocen varios. El origen de éstas puede ser animal, vegetal, de bacterias u hongos, aunque las de origen bacteriano son las más abundantes en la industria de los hidrolizados proteicos dada la manejabilidad de estos organismos y los altos rendimientos de producción<sup>2</sup>. Las primeras enzimas proteolíticas utilizadas en la industria alimentaria fueron proteasas pancreáticas de origen animal. Actualmente, los preparados enzimáticos de grado alimentario*

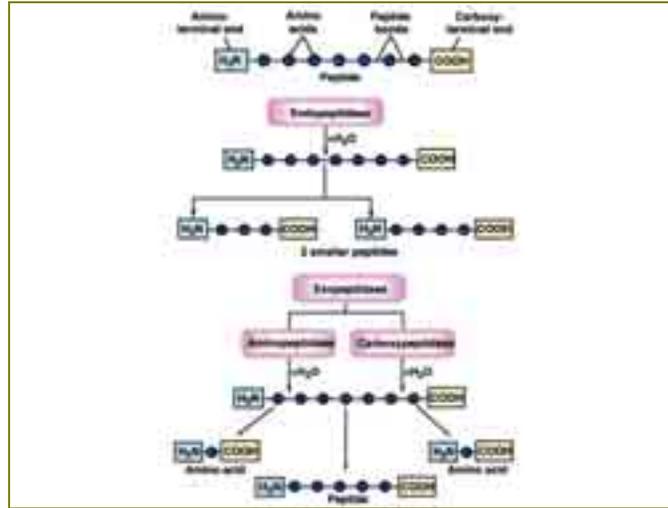
---

<sup>1</sup> Compuesto químico que se transforma en un producto en una reacción enzimática.

<sup>2</sup> VIOQUE, J., CLEMENTE, A., PEDROCHE, J., YUST, M. y MILLAN, F., Obtención y aplicaciones de hidrolizados proteicos, en: <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/385/388>

disponibles en el mercado suelen ser mezclas de estas enzimas y normalmente se venden en estado líquido o como polvos<sup>3</sup>.

Imagen N° 14. Clasificación de las proteasas según su actividad catalítica



Fuente: [http://163.178.103.176/Temas/Temaf6Dig/ATPSilver/CAP20/S7/FG20\\_07.jpg](http://163.178.103.176/Temas/Temaf6Dig/ATPSilver/CAP20/S7/FG20_07.jpg)

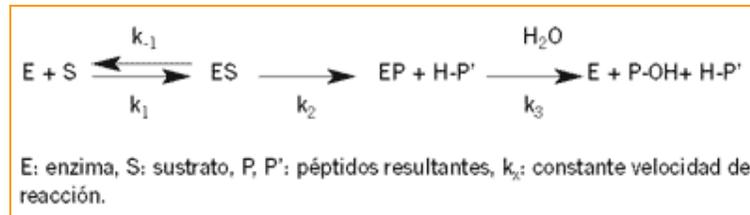
La hidrólisis proteica se realiza normalmente en un reactor, con control de agitación, pH, temperatura y tiempo del proceso. El sustrato se disuelve o resuspende en agua hasta que se estabilizan la segunda y tercera variables mencionadas; a continuación se agrega la proteasa dando inicio a la hidrólisis. A medida que ésta progresa se produce una disminución del pH debido a la rotura de los enlaces peptídicos. En los casos de hidrólisis enzimática éste debe ser mantenido en el óptimo de la enzima mediante la adición de base diluida. Para finalizar el proceso, la enzima puede ser inactivada con calor, mediante una disminución del pH o con una combinación de ambos, o también puede ser retirada del medio mediante filtración y la proteína finalmente precipitada.

El proceso de hidrólisis no se desarrolla en una sola reacción, sino que se trata de un conjunto de reacciones simultáneas de rupturas de enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio, lo que le da una gran complejidad al mismo. Se propone un proceso de hidrólisis constituido por tres reacciones consecutivas: primero la formación de un complejo enzima-sustrato representado por la proteína, luego la rotura del enlace amínico dando como resultado la liberación de un péptido y

<sup>3</sup> BENITEZ, R., IBARZ, A. y PAGAN, J., "Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones", en: Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, v. 42, n° 2, La Plata, Argentina, 2008, p. 227-36.

finalmente, la separación del péptido restante de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua. El proceso puede reiniciarse sobre los dos nuevos péptidos o sobre uno solo de ellos. Estos tres pasos se representan esquemáticamente en la siguiente imagen:

**Imagen N° 15. Mecanismo catalítico de una proteasa**



Fuente: BENITEZ, R., IBARZ, A. y PAGAN, J.<sup>4</sup>

Para llevar a cabo la hidrólisis proteica debe establecerse la relación proteína-proteasa una vez que se ha efectuado, si es necesario, un posible pretratamiento del sustrato y a continuación, deben ser definidas las condiciones de la reacción del proceso de hidrólisis. Las principales variables que determinan el resultado de la misma son temperatura, pH, relación enzima-sustrato, influenciada por la agitación, y el tiempo de reacción, las cuales son, como se ha mencionado con anterioridad, los cuatro parámetros a controlar. Los primeros 3 factores determinan la velocidad de reacción y pueden influir en la especificidad de la enzima. El tiempo de reacción solamente determina el grado final de hidrólisis. Los efectos interactivos entre los parámetros de la hidrólisis también influyen en la composición del hidrolizado. Si el proceso de hidrólisis no se controla, el pH de la solución cambiará, como se ha mencionado, después del inicio de la hidrólisis debido a la formación de grupos aminos nuevos, los cuales son capaces de liberar o aceptar protones<sup>5</sup>, dependiendo de aquel. Cuando es bajo todos los grupos amino están protonados y solamente parte de los grupos carboxilo están desprotonados, resultando en una captación neta de protones por cada enlace peptídico roto, causando un incremento del mismo. A pH neutro y alcalino la hidrólisis resulta en una disminución de éste, pues todos los carboxilos están desprotonados y solamente parte de los grupos amino están protonados. Con el fin de prevenir un cambio del mismo durante la hidrólisis, la reacción debería llevarse a

<sup>4</sup> BENITEZ, R., IBARZ, A. y PAGAN, J., ob.cit.,p

<sup>5</sup> En física, el protón (del griego πρῶτον, prōton [primero]) es una partícula subatómica con una carga eléctrica elemental positiva y una masa 1.836 veces superior a la de un electrón.

cabo en un sistema buffer<sup>6</sup> o en un sistema de pH-stat en el cual el pH se fija en el valor deseado, lo que permite que la enzima siempre actúe en el valor óptimo de pH determinado y el cálculo final de base o ácido consumido durante el proceso, pueda traducirse en el cálculo del grado de hidrólisis<sup>7</sup>.

Las características del hidrolizado que se obtenga vendrán determinadas evidentemente por el uso que se le quiera dar a este. Así, el grado y tipo de hidrólisis va a determinar el resto de las propiedades del mismo. En este sentido, dependiendo de estos factores, tendrá una aplicación u otra. Hoy día, los hidrolizados proteicos vegetales que se producen para su uso en alimentación se pueden agrupar en tres grandes grupos como se muestra en el cuadro N° 8: hidrolizados con bajo grado de hidrólisis, entre el 1 y el 10%, para la mejora de las propiedades funcionales; hidrolizados con grado de hidrólisis variable para ser usados como flavorizantes; e hidrolizados extensivos, con grado de hidrólisis superior al 10%, para su uso en alimentación especializada.

**Cuadro N° 8: Principales tipos de hidrolizados proteicos y sus aplicaciones**

<b>Hidrolizado</b>	<b>Grado de hidrólisis (%)</b>	<b>Aplicación (%)</b>
Limitado (con bajo grado de hidrólisis)	1-10	Mejora de las propiedades funcionales
Variable	Variable	Mejora del flavor
Extensivo (con alto grado de hidrólisis)	>10	Como suplemento proteico en alimentación especializada

Fuente: VIOQUE, J. y MILLÁN F.<sup>8</sup>

<sup>6</sup> Un tampón, buffer, solución amortiguadora o solución reguladora es la mezcla en concentraciones relativamente elevadas de un ácido débil y su base conjugada, es decir, sales hidrolíticamente activas. Tienen la propiedad de mantener estable el pH de una disolución frente a la adición de cantidades relativamente pequeñas de ácidos o bases fuertes. Se puede entender esta propiedad como consecuencia del efecto ion común y las diferentes constantes de acidez o basicidad: una pequeña cantidad de ácido o base desplaza levemente el equilibrio ácido-base débil, lo cual tiene una consecuencia menor sobre el pH. Cada sistema buffer tiene su propio rango efectivo de pH, el cual dependerá de la constante de equilibrio del ácido o base empleado.

<sup>7</sup> BENITEZ, R., IBARZ, A. y PAGAN, J., ob.cit.,p

<sup>8</sup> VIOQUE, J. y MILLÁN F., Los hidrolizados proteicos en alimentación: Suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional, en: <http://digital.csic.es/handle/10261/5750>

En referencia a la primera aplicación, se ha demostrado que una hidrólisis limitada mejora las propiedades funcionales de la proteína original, como la solubilidad<sup>9</sup>, el poder emulsificante<sup>10</sup>, espumante<sup>11</sup> o la absorción de agua o aceite. Esta mejora se debe al menor tamaño de los péptidos, incremento de grupos NH<sub>4</sub> y COO<sup>-</sup> y exposición de grupos hidrófobos<sup>12</sup> de la proteína que estaban inmersos en el interior de la proteína intacta<sup>13</sup>. Sin embargo, en hidrolizados extensivos estas propiedades desaparecen. Se ha postulado que 20 aminoácidos es el tamaño mínimo para que los péptidos puedan estabilizar las interfases aceite-agua, en el caso de emulsiones o aire-agua, en el caso de espumas. Así, hidrolizados con mejor poder espumante son usados en la producción de pasteles, pan, helados y postres. Aquellos con buen poder emulsificante son usados en la fabricación de mayonesas, carne picada y salchichas; y los que poseen una buena absorción de aceite o agua son usados en derivados cárnicos y en productos bajos en grasas. Las propiedades funcionales dependen del tamaño molecular, estructura e incluso secuencia aminoacídica de los péptidos producidos por la hidrólisis enzimática. Es decir, en el futuro un mejor conocimiento de la relación estructura-función de los péptidos en sistemas modelo y reales incrementará el uso de enzimas para mejorar las propiedades funcionales. De esta forma, con modificaciones enzimáticas apropiadas la funcionalidad de los hidrolizados proteicos puede ser diseñada o dirigida para cubrir las necesidades específicas de un alimento concreto<sup>14</sup>.

Otro tipo de hidrolizados son aquellos con un grado de hidrólisis variable, generalmente alto, para ser usados como flavorizantes<sup>15</sup>. En este sentido, los mismos, según el sustrato usado y las condiciones de hidrólisis, también pueden aportar sabor y olor a los alimentos a los que se añadan. Tradicionalmente aquellos usados como flavorizantes se han obtenido mediante la hidrólisis ácida de proteínas vegetales con

---

<sup>9</sup> La solubilidad es una medida de la capacidad de disolverse una determinada sustancia (solute) en un determinado medio (solvente); implícitamente se corresponde con la máxima cantidad de soluto disuelto en una dada cantidad de solvente a una temperatura fija y en dicho caso se establece que la solución está saturada. Su concentración puede expresarse en moles por litro, en gramos por litro, o también en porcentaje de soluto (m(g)/100 mL).

<sup>10</sup> Una emulsión es una mezcla de líquidos inmiscibles de manera más o menos homogénea. Un líquido (la fase dispersa) es dispersado en otro (la fase continua o fase dispersante).

<sup>11</sup> Un agente espumante es una sustancia química con propiedades surfactantes (tensoactivo) que cuando se encuentra presente en pequeñas dosis en una disolución facilita la generación de espuma.

<sup>12</sup> En el contexto fisicoquímico, el término se aplica a aquellas sustancias que son repelidas por el agua o que no se pueden mezclar con ella. Un ejemplo de sustancias hidrófobas son los aceites.

<sup>13</sup> VIOQUE, J., CLEMENTE, A., PEDROCHE, J., YUST, M. y MILLAN, F., ob.cit.,p

<sup>14</sup> VIOQUE, J. y MILLÁN F., ob.cit.,p

<sup>15</sup> El flavor es una combinación compleja de sensaciones olfativas, gustativas y trigeminales percibidas durante la degustación. Puede estar influenciado por efectos táctiles, térmicos, dolorosos y/o cinestésicos.

HCl durante 4 a 24 horas y a temperaturas entre 100° y 125° C. Así, el grado de hidrólisis va a depender del tiempo, temperatura y concentración de ácido usada, todo lo cual va a influir en los atributos sensoriales del producto. El flavor va a depender de la cantidad y tipo de péptidos o aminoácidos liberados, por ejemplo, el ácido glutámico funciona como un potenciador del sabor, o la glicina o alanina tienen un sabor dulce. Pero quizás el factor principal a la hora de determinar un flavor sea la interacción de estos aminoácidos o pequeños péptidos con otros componentes como azúcares o lípidos, la cual puede producirse mediante reacciones de Maillard<sup>16</sup>, generando compuestos secundarios volátiles responsables del olor y sabor del producto. La neutralización del producto con hidróxido sódico o carbonato sódico va a generar una cantidad de sal que es una parte substancial del producto final. Actualmente, el uso de estos hidrolizados obtenidos mediante tratamiento con ácidos está en desuso, por los componentes antinutricionales ya comentados que pueden generarse. Así, se está potenciando el uso de proteasas para la obtención de un hidrolizado extensivo que pueda ser usado en alimentación como flavorizante. Sin embargo, ya que las condiciones de hidrólisis de pH y temperatura con proteasas son bastante suaves, estos hidrolizados presentan poco flavor en relación con los obtenidos con ácidos, por lo tanto, el mismo puede mejorarse mediante un postratamiento térmico que permita la generación de reacciones de Maillard. Es decir, en el futuro, controlando el grado de hidrólisis de las proteínas y azúcares y la temperatura de postratamiento se podrá definir y controlar el patrón de flavor de un determinado hidrolizado.

En cuanto a los hidrolizados extensivos, éstos están destinados a una alimentación especializada, bien como suplemento proteico o en dietas médicas. En este apartado entran aquellos que buscan explotar o mejorar las características nutricionales de las proteínas de origen. Los mismos se pueden dividir a su vez en dos grandes grupos: por un lado aquellos para ser usados como suplemento proteico en la dieta y por el otro, hidrolizados con una composición definida para el tratamiento de enfermedades o síndromes específicos. En este último grupo se alcanza el máximo de especialización en lo que respecta al diseño del alimento ya que se obtiene un producto muy específico para un objetivo muy concreto. Respecto al primer grupo, dos factores favorecen el uso de los hidrolizados como suplemento proteico. Desde un punto de vista funcional su elevada solubilidad que permite su utilización en alimentos

---

<sup>16</sup> Las reacciones de Maillard (técnicamente: glucosilación o glicación no enzimática de proteínas) se trata de un conjunto complejo de reacciones químicas que se producen entre las proteínas y los azúcares reductores que se dan al calentar (no es necesario que sea a temperaturas muy altas) los alimentos o mezclas similares. Se trata básicamente de una especie de caramelización de los alimentos.

líquidos y desde un punto de vista nutricional, el hecho de que la absorción gastrointestinal de los pequeños péptidos que componen el hidrolizado, principalmente di y tripéptidos, parece ser más efectiva en comparación con las proteínas intactas o aminoácidos libres.

**Cuadro N° 9: Aplicaciones de los hidrolizados proteicos extensivos**

<b>Suplemento proteico</b>	Alimentación en 3ª edad	
	Nutrición deportiva	
	Dietas para el descenso de peso	
<b>Dietas Médicas</b>	Hidrolizados hipoalergénicos	
	Tratamiento de errores congénitos del metabolismo	Fenilcetonuria
		Tirosinamia
	Estados hipermetabólicos	Quemados
		Postcirugía
	Otras enfermedades	Enfermedad de Croh
		Fibrosis quística
Pancreatitis		

Fuente: VIOQUE, J. y MILLÁN F.<sup>17</sup>

Los sectores de la población a los que van dirigidos estos alimentos son diversos aunque, por diferentes razones, con necesidades todos ellos de un sobreaporte proteico. Por ejemplo, se puede citar su uso en la alimentación de la tercera edad en donde se produce una pérdida de apetito, causada por diversas razones, como factores sociales o falta de ejercicio; y genera una malnutrición que está correlacionada directamente con un incremento de enfermedades y mortalidad. Para estas personas, comer más cantidad no es la solución idónea dada la falta de apetito, pero la demanda de proteínas necesarias podría cubrirse con bebidas enriquecidas con hidrolizados proteicos, ya que su ingesta es más atractiva que la de alimentos sólidos. En este apartado también se puede incluir la alimentación enteral y parenteral<sup>18</sup>, constituyentes del llamado soporte nutricional el cual, en las últimas décadas, se encuentra en lugar prioritario dentro de las medidas que han permitido

<sup>17</sup> VIOQUE, J. y MILLÁN F., ob.cit.,p

<sup>18</sup> VIOQUE, J., CLEMENTE, A., PEDROCHE, J., YUST, M. y MILLAN, F., ob.cit.,p

una mayor sobrevida y mejoría de la calidad de vida<sup>19</sup>. Otro campo de aplicación es en la nutrición deportiva, sobre todo en ejercicios de resistencia como ciclismo o aquellos que requieren un desarrollo muscular importante como halterofilia<sup>20</sup> o incluso culturismo. En este sentido, bebidas refrescantes suplementadas con péptidos pueden tomarse durante el ejercicio o tras su finalización. Por último, también tienen aplicación los hidrolizados para personas que sigan un régimen para el descenso de peso. De esta manera se proporcionan al cuerpo adecuadas cantidades de proteínas con un mínimo de otras fuentes de calorías, de manera que se mantiene el balance de N y se reduce peso con la pérdida de grasas<sup>21</sup>.

Respecto a las aplicaciones medicinales de los hidrolizados proteicos, sin duda la más conocida e importante por su impacto en nutrición haya sido la producción de hidrolizados hipoalergénicos. La alergia alimentaria<sup>22</sup> es un problema al que no se le ha prestado mucha atención, a pesar de que en los últimos años son cada vez más las personas que se ven afectadas. Las consecuencias de una reacción alérgica pueden ir desde pequeños trastornos físicos hasta incluso la muerte por shock anafiláctico<sup>23</sup>. Hoy día no existe ninguna medicación para prevenir las mismas, de hecho, evitar estos alimentos de manera estricta es la única forma de impedir la reacción contra ellos, pudiendo si consumir dietas constituidas por hidrolizados proteicos hipoalergénicos<sup>24</sup>. En alimentación, la alergia a las proteínas de leche de vaca observadas en recién nacidos es la más frecuente. Para aliviar esta situación, desde hace más de 40 años se vienen produciendo en USA hidrolizados de leche de vaca hipoalergénicos, denominados de primera generación, a partir de caseína con más de un 70% de aminoácidos libres y péptidos hasta 8 aminoácidos. Posteriormente, desde hace unos 10 años, se comercializan los de segunda generación, a partir de proteínas del suero, con un 40-60% de aminoácidos libres y péptidos hasta 12 aminoácidos, y finalmente desde hace pocos años se producen los de tercera generación, con menos de un 20% de aminoácidos libres y péptidos hasta 15 aminoácidos. En estos

---

<sup>19</sup> PINEDA PEREZ, S., Soporte nutricional en la atención primaria de salud, en: [http://bvs.sld.cu/revistas/mgi/vol19\\_3\\_03/mgi03303.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/mgi/vol19_3_03/mgi03303.htm)

<sup>20</sup> Halterofilia o levantamiento olímpico de pesas es un deporte consistente en el levantamiento de la mayor cantidad de peso posible en una barra en cuyos extremos se fijan varios discos, los cuales determinan el peso final que se levanta.

<sup>21</sup> VIOQUE, J., CLEMENTE, A., PEDROCHE, J., YUST, M. y MILLAN, F., ob.cit.,p

<sup>22</sup> La alergia alimentaria es una forma específica de intolerancia a un alimento o a uno de sus componentes, que activa el sistema inmunológico provocando una serie de reacciones en cadena, entre ellas la producción de anticuerpos.

<sup>23</sup> La anafilaxia es una reacción inmunitaria generalizada del organismo, una de las más graves complicaciones y potencialmente mortales, ante el contacto con un alérgeno con el que anteriormente ya había tenido contacto.

<sup>24</sup> VIOQUE, J., CLEMENTE, A., PEDROCHE, J., YUST, M. y MILLAN, F., ob.cit.,p

hidrolizados el tratamiento con la proteasa rompe los epítomos<sup>25</sup> alergénicos de la proteína, bien secuenciales o estructurales, eliminando la alergenicidad del producto y de esta manera permitiendo su consumo por las personas sensibles a sus proteínas<sup>26</sup>.

También se han propuesto para el tratamiento de enfermedades o situaciones muy concretas, hidrolizados proteicos con una composición definida, por ejemplo, en el caso de errores congénitos del metabolismo, como la fenilcetonuria<sup>27</sup> o tirosinemia<sup>28</sup> se proponen hidrolizados sin los aminoácidos aromáticos que estos enfermos no pueden metabolizar. En estados hipermetabólicos, como los procesos de cicatrización por cirugía o quemaduras se hace necesario un sobreaporte de aminoácidos azufrados que podrían ser proporcionados en forma de hidrolizados enriquecidos en éstos. En enfermedades hepáticas, como las encefalopatías, donde es necesario aumentar el aporte de aminoácidos ramificados y disminuir el de aromáticos, hidrolizados proteicos enriquecidos en los primeros y pobres en los segundos también son apropiados. Finalmente, dada la buena solubilidad, digestibilidad y absorción intestinal de los hidrolizados extensivos, estos también son usados en enfermos con una actividad gastrointestinal deficiente, como en los casos con reducida superficie de absorción, como en la enfermedad de crohn o cuando la capacidad digestiva está reducida como en la fibrosis quística o en la pancreatitis<sup>29</sup>. Dentro de los hidrolizados extensivos, existe una aplicación que por su interés, novedad y potencialidad requiere una mención especial. Esta constituye la obtención o generación de péptidos bioactivos a partir de proteínas hidrolizadas, los cuales son secuencias de aminoácidos de pequeño tamaño, entre 2 y 15 residuos, inactivas dentro de la proteína intacta pero que pueden ser liberados bien durante la digestión del alimento o por un procesado previo del mismo, como por ejemplo mediante la generación de hidrolizados proteicos los cuales tendrían efectos beneficiosos para el organismo en diversos casos. Estos péptidos con diferentes funciones se han encontrado en diversas proteínas aunque la leche es el material mejor estudiado.<sup>30</sup>

---

<sup>25</sup> Un epítopo o determinante antigénico es la porción de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunitario, específicamente la secuencia específica al que se unen los anticuerpos, receptores de las células B o de células T.

<sup>26</sup> VIOQUE, J. y MILLÁN F., ob.cit.,p

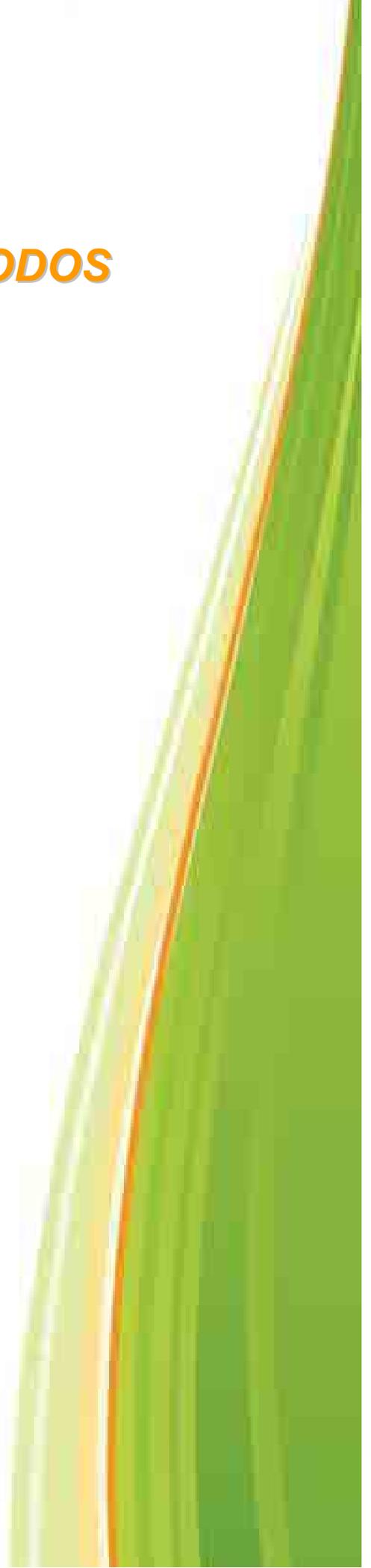
<sup>27</sup> La fenilcetonuria, también conocida como PKU, es causada por la carencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa, lo que se traduce en la incapacidad de metabolizar el aminoácido tirosina a partir de fenilalanina en el hígado.

<sup>28</sup> La tirosinemia muestra niveles elevados de tirosina. A nivel bioquímico se debe al déficit de las enzimas fumarilacetoacetasa hidrolasa tipo Ia y maleilacetoacetato isomerasa tipo Ib, produciendo la acumulación de fumarilacetoacetato y maleilacetoacetato que serían los agentes productores del daño hepatorenal.

<sup>29</sup> VIOQUE, J., CLEMENTE, A., PEDROCHE, J., YUST, M. y MILLAN, F., ob.cit.,p

<sup>30</sup> VIOQUE, J. y MILLÁN F., ob.cit.,p

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***



El presente trabajo de tesis es realizado utilizando los siguientes materiales y métodos:

**Muestras:**

Se utilizan tres lotes de diferentes variedades de BSG, los cuales son suministrados gentilmente por Antares S.A. de esta ciudad, y se encuentran detallados en el siguiente cuadro:

**Cuadro N° 1. Variedades de BSG utilizadas**

Lote 1	Lote 2	Lote 3
77,8% malta Pilsen <sup>1</sup>	93% malta Pilsen	100% malta Pilsen
17% caramelo		
4,5% chocolate	7% caramelo	
0,7% malta Negra <sup>2</sup>		

Las muestras son tomadas en condiciones estériles en bolsas de muestreo directamente a 10 cm de la superficie del tanque de maceración.

**Imagen N° 16. Cebada agotada y Bolsas de muestreo**



Fuente: <http://www.microclar.com/bolsasDM.php>

<sup>1</sup> Malta clara, poco horneada con gran poder enzimático, que suele formar la parte más grande o la totalidad de la mezcla. Es llamada lager, pale o pils, según el fabricante.

<sup>2</sup> Malta de color que va de ámbar a negro, muy horneada y con poco o nada de poder enzimático. Suele ser usada en pequeñas cantidades para incidir sobre el color o el gusto de la cerveza o por algún motivo técnico propio de la elaboración.

Para analizar la estabilidad durante el almacenamiento, cada lote de BSG se divide en cinco submuestras, las cuales se envasan en bolsas de PVC, para ser conservadas bajo las condiciones que se detallan a continuación:

**Cuadro N° 2. Condiciones de almacenamiento del BSG**

<b>Submuestra</b>	<b>Tipo de conservación</b>	<b>Temperatura de conservación (°C)</b>
A	Congelado	-18 ° C
B	Refrigerado	0 ° C
C	Refrigerado	10 ° C
D	Temperatura ambiente	Alrededor de 20 ° C
E	Previo secado en horno durante 24 horas a 60 ° C y luego mantenido a temperatura ambiente	Alrededor de 20 ° C

Cada muestra, antes de ser utilizadas como sustrato, se coloca a temperatura ambiente durante 20 minutos en una cabina de seguridad biológica con el fin de lograr las mismas condiciones de temperatura inicial.

**Imagen N° 17. Cabina de seguridad biológica**



Fuente: <http://www.directindustry.es><sup>3</sup>

<sup>3</sup><http://www.directindustry.es/prod/bioquell/campanas-de-aspiracion-de-seguridad-biologica-61087-455671.html>

**Composición proximal:**

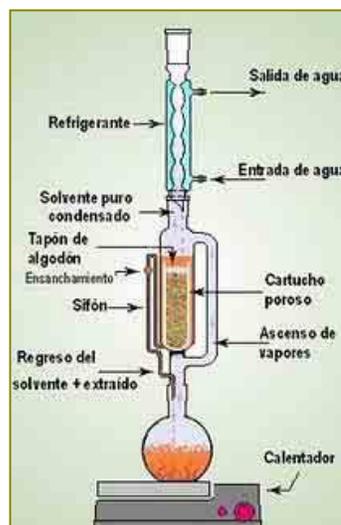
La humedad del BSG se determina por diferencia de peso, a partir de 5 g de muestra colocada en un cristizador y haciendo uso de una balanza analítica, antes y después de calentarlo a 80° C en estufa hasta un peso constante; es decir, con menos de 0.001 g de variación entre dos pesadas consecutivas. Antes de pesar las muestras, se colocan en un desecador durante 30 minutos con el fin de que las mismas reduzcan su temperatura para la posterior manipulación y sin absorber la humedad del ambiente.

El contenido de grasas se determina por diferencia de peso antes y después de la extracción durante 14 horas con éter de petróleo<sup>4</sup> en un sistema Soxhlet a una velocidad de extracción de alrededor de 3 a 5 gotas por segundo. Antes de colocar la muestra en el cartucho de extracción, la misma se muele y tamiza utilizando una malla de 0,5 mm. Las muestras se mantienen a 110° C durante 30 minutos para evaporación total del solvente. Finalmente se coloca el cartucho con la muestra en un desecador durante 30 minutos antes del pesaje.

**Imagen N° 10. Cristizador,  
Desecador y Balanza Analítica**



**Imagen N° 11  
Sistema Soxhlet**



Fuentes: <http://www.electrolabmedic.com><sup>5</sup>  
<http://www.iaspectra.com><sup>6</sup>, <http://quimica-gris.blogspot.com/>  
<http://laboratorio-clinicopasteur.blogspot.co>

<sup>4</sup> El éter de petróleo es una mezcla líquida de diversos compuestos volátiles, muy inflamables, de la serie homóloga de los hidrocarburos saturados o alcanos, y no de la serie de los éteres como erróneamente indica su nombre. Se emplea principalmente como disolvente no polar.

<sup>5</sup> <http://www.electrolabmedic.com/index.php?secc=producto&idproducto=203>

<sup>6</sup> <http://www.iaspectra.com/productos.php?id=2>

El contenido de cenizas se determina por diferencia de peso del BSG seco antes y después de exponer las muestras contenidas en cápsulas de porcelana en el siguiente ciclo de temperatura llevado a cabo en una mufla: 1 hora a 100° C, 1 hora a 200° C y, finalmente, a 650° C hasta incineración total por alrededor de 12 horas, momento en el que se observan las cenizas de color blanquecino. Antes de pesar, las muestras se colocan en un desecador durante 1 hora.

**Imagen N° 12 Cápsulas de porcelana y Mufla**



Fuente: <http://es.encydia.com><sup>7</sup>



Fuente: <http://www.extintoresmelisam.com.ar><sup>8</sup>

El contenido de proteína cruda se determina según el método AOAC 991.20 Oficial, es decir, mediante la técnica Kjeldahl. La proteína se calcula, entonces, a partir del contenido de nitrógeno total utilizando un factor de conversión de 6,25.<sup>9</sup>

**Imagen N° 12. Método Kjeldahl**



Fuente: <http://avogadro.bitacoras.com>

<sup>7</sup> [http://es.encydia.com/ca/C%C3%A1psula\\_de\\_porcelana](http://es.encydia.com/ca/C%C3%A1psula_de_porcelana)

<sup>8</sup> <http://www.extintoresmelisam.com.ar/extintores/maquinas.php>

<sup>9</sup> JONES, D.B., "Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins", en: United States Department of Agriculture, circular n° 183, 1941, p. 8.

El contenido de hidratos de carbono se determina considerando la diferencia entre 100 y la suma de los porcentajes de agua, proteínas, lípidos totales ó grasa y cenizas. El total de hidratos de carbono incluye los valores de fibra dietética total.

Todas las determinaciones se realizan por triplicado y estos parámetros se presentan como valores medios en base seca, DB, dry basis por sus siglas en inglés, así como las desviaciones estándar<sup>10</sup> para todos los sistemas de estudios.

### Crecimiento Microbiano:

La microflora natural asociada a las submuestras mencionadas, es decir, de la A a la E, se enumera periódicamente siguiendo los métodos descritos por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos (ICMSF 1978). En resumen, 5 g de las muestras en peso fresco se mezclan con 50 ml de buffer<sup>11</sup> de fosfato a pH 7 en un homogenizador (Stomacher 400 Circulator Homogenizer) durante 2 minutos a máxima velocidad.

Los microorganismos viables de cada muestra se enumeran en placas de petri mediante diluciones seriadas<sup>12</sup> de cada sobrenadante utilizando  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-7}$ . Para la detección de bacterias aerobias mesófilas<sup>13</sup> se utiliza como medio de cultivo Agar para recuento total (PCA) y, para la de hongos y levaduras, Agar de extracto de levadura, glucosa y cloranfenicol (YGC). Las placas se colocan en una estufa de incubación a 32° C durante 24-48 horas para la detección de la microflora mesófila y a 55 ° C durante 24 horas con el fin de determinar el número de bacterias termófilas<sup>14</sup>.

Imagen N° 18.  
Homogenizador Stomacher®



Fuente:  
<http://www.carlroth.com>

<sup>10</sup> La desviación estándar es una medida del grado de dispersión de los datos del valor promedio. Dicho de otra manera, es simplemente el "promedio" o variación esperada con respecto de la media aritmética.

<sup>11</sup> Un buffer, tampón o solución amortiguadora o reguladora, es una solución mixta formada por un ácido débil y su base conjugada o por una base débil y su ácido conjugado que resiste los cambios de pH frente a la adición de cantidades relativamente pequeñas de ácidos o bases fuertes, en donde la capacidad de controlar éste es mayor mientras más parecidas son las concentraciones de ácido y base. El buffer de fosfato es aquel en el cual la disociación es del ácido fosfórico.

<sup>12</sup> Las diluciones seriadas son una técnica de laboratorio en la cual se disminuye la concentración de una sustancia en una serie de cantidades proporcionales.

<sup>13</sup> Un organismo mesófilo, es aquel que tiene una temperatura óptima de crecimiento comprendida entre 20° C y 45° C. La temperatura mínima se encuentra en el rango de 15° C a 20° C y la temperatura máxima en torno a 45° C.

<sup>14</sup> Organismos vivos que pueden soportar condiciones extremas de temperatura relativamente altas, por encima de los 45° C.

En todos los lotes se mide la microflora mesófila a los 0, 5, 10, 15, 30 y 40 días, mientras que las bacterias termófilas se miden a los 0, 30 y 40 días.

**Imagen N° 9. Estufa de incubación y Placas de petri**



Fuentes: <http://ocw.um.es><sup>15</sup>  
<http://www.cienytec.com/lab2horno.ht>

**Fuentes enzimáticas:**

Las fuentes enzimáticas utilizadas en la presente tesis fueron obtenidas a partir de cultivos microbianos de las siguientes cepas<sup>16</sup> proteolíticas: *Bacillus cereus*, *Pseudomonas* no clasificadas, *Pseudomonas* pútida, dos cepas de *Enterococcus hirae* (a, b), y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, las cuales fueron aisladas previamente de repollo fresco y fermentado<sup>17</sup> y fueron mantenidas y tratadas con procedimientos de conservación y de reactivación. Las cepas de *B. cereus* son inoculadas en un Medio Mínimo<sup>18</sup> (MM) en las condiciones de temperatura y pH óptimas para la producción de las proteasas<sup>19</sup>. El resto de las cepas son inoculadas en un Caldo Cerebro Corazón<sup>20</sup> (CCC). Luego del período de incubación de los cultivos, el cual es de 24-48 horas a 32° C en estufa, se obtienen por centrifugación, a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4° C en una centrífuga de mesa, los sobrenadantes que son usados como fuentes enzimáticas crudas.

<sup>15</sup>[http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/higiene-inspeccion-y-control-alimentario/practicas-1/practica-1-tecnicas-utiles-para-el-control/skinless\\_view](http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/higiene-inspeccion-y-control-alimentario/practicas-1/practica-1-tecnicas-utiles-para-el-control/skinless_view)

<sup>16</sup> Conjunto de especies bacterianas que comparten, al menos, una característica.

<sup>17</sup> PEREZ BORLA, O., DAVIDOVICH, L.A., y ROURA, S.I., "Isolation and characterization of proteolytic microorganisms from fresh and fermented cabbage", en: *Food Sci. Technol.*, n° 43, 2010, p. 298-301.

<sup>18</sup> Los medios mínimos son medios definidos que únicamente le proporcionan al microorganismo los nutrientes necesarios para crecer, pero no para desarrollarse óptimamente.

<sup>19</sup> KOTLAR, C.E., PONCE, A.G., SANSEVERO, R., y ROURA, S.I., "Characterization of *Bacillus cereus* isolated from fermented cabbage and conventional optimization of extracellular protease production" en: *The Int. J Microb.*, n° 8, 2010, p. 18.

<sup>20</sup> El caldo cerebro corazón es un medio líquido, muy rico en nutrientes, adecuado para el enriquecimiento y cultivo de bacterias aerobias y anaerobias, de microorganismos exigentes como estreptococos, neumococos y otros microorganismos de difícil desarrollo.

Para que los inóculos agregados sean equivalentes, se mide a través de un espectrofotómetro la absorbancia<sup>21</sup> de los mismos a una longitud de onda de 600 nanómetros<sup>22</sup> (nm) después de la incubación durante 48 horas. La absorbancia medida se mantiene alrededor de 1,20.

**Imagen N° 9. Centrifuga de mesa y Espectrofotómetro**



Fuentes: <http://en.wikipedia.org/wiki/Centrifuge>  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Espectrofot%C3%B3metro>

### **Ensayo de granulometría:**

El ensayo de granulometría<sup>23</sup> se realiza para obtener los diferentes tamaños de las partículas de BSG con el fin de evaluar la capacidad de las fuentes enzimáticas de hidrolizar cada fracción. Para realizar este ensayo se parte de una muestra seca y molida y se trabaja con una serie de tamices estándares A.S.T.M. (American Society of Testing Methods, E-11) dispuestos de forma seriada, con la malla más pequeña del tamiz en la parte inferior sobre la base del mismo y la más grande en la parte superior. Se colocan 200 gramos de la muestra en el tamiz superior y el conjunto de tamices se agita mecánicamente durante 10 minutos a 150 revoluciones por minuto (rpm). Las fracciones recogidas son de 0 a 500, 500 a 1410, 1410 a 2000, 2000 a 2380 y 2,380 a 4,000  $\mu\text{m}$ .

---

<sup>21</sup> La absorbancia es el grado de absorción de la luz o de otra energía radiante a su paso a través de un medio. La cantidad de luz absorbida por la sustancia depende del número de moléculas interpuestas en el trayecto del haz, de la naturaleza de la sustancia en solución y de la longitud de onda ( $\lambda$ ) de la luz monocromática empleada. Así para una misma sustancia y para una misma longitud de onda la cantidad de luz absorbida depende de la concentración de la sustancia en solución y del espesor de la masa de solución interpuesta, resultando ser proporcional a la concentración de la especie que absorbe la luz en la muestra.

<sup>22</sup> El nanómetro es la unidad de longitud que equivale a una milmillonésima parte de un metro. Comúnmente se utiliza para medir la longitud de onda de la radiación ultravioleta, radiación infrarroja y la luz.

<sup>23</sup> Determinación de la distribución de los tamaños de las partículas a través de tamices. La composición granulométrica puede definirse como "la relación de porcentajes en que se encuentran los distintos tamaños de partículas respecto al total."

Las partículas retenidas en cada tamiz se retiran y se registran sus masas. Los resultados se expresan como el porcentaje retenido en cada malla.

**Imagen N° 12. Tamices estándares A.S.T.M.**



Fuente:

[http://www.zonytest.com.ar/zonytest\\_ejr.htm](http://www.zonytest.com.ar/zonytest_ejr.htm)

La capacidad de las fuentes enzimáticas de hidrolizar cada fracción granulométrica se evalúa con el método de difusión en agar. En resumen, el ensayo cualitativo de la actividad proteolítica se evalúa en medio mínimo (MM) plaqueado<sup>24</sup>, suplementado con una alícuota<sup>25</sup> de 100 milímetros cúbicos ( $\mu\text{L}$ )<sup>26</sup> de un homogeneizado compuesto de una fracción de 5 gramos de BSG recolectada de cada una de las mallas del tamiz y 50 mL de buffer fosfato a pH 7.2. En las placas preparadas se cortan hoyos de 5 mm de diámetro en condiciones estériles y una alícuota de 20  $\mu\text{l}$  del sobrenadante libre de células, usado como fuente enzimática cruda, se coloca en cada hoyo, con cuidado de no desbordar. Estas placas se incuban aeróbicamente, es decir en presencia de oxígeno, a 32° C durante 48 horas y la actividad proteolítica bacteriana se observa al día, en base a la presencia de zonas claras, alrededor del hoyo, es decir, de zonas hidrolizadas. Así, la zona clara, de 6 mm o más, medida desde el centro, en el medio que rodea el hoyo indica actividad proteolítica positiva<sup>27</sup> y la misma es negativa cuando no se observa dicha zona. Los diámetros de la zona circular clara resultantes de la proteólisis alrededor de los hoyos, también llamados halos, son medidos y los resultados se expresan como el diámetro elevado al cuadrado.

<sup>24</sup> PEREZ BORLA, O., DAVIDOVICH, L.A., y ROURA, S.I., ob.cit.,p

<sup>25</sup> La alícuota es una parte que se toma de un volumen (alícuota líquida) o de una masa (alícuota sólida) iniciales, para ser usada en una prueba industrial o de laboratorio, cuyas propiedades físicas y químicas, así como su composición, representan las de la sustancia original. Normalmente las alícuotas son el resultado de repartir un volumen inicial en varias partes iguales. Se suele medir en mililitros (mL) o gramos (g).

<sup>26</sup> Unidad de volumen equivalente a la millonésima parte de un litro, representada por el símbolo  $\mu\text{l}$ . También equivale a 1 milímetro cúbico.

<sup>27</sup> *ibid*

Para descartar resultados falsos positivos por la presencia de un halo debido a una reacción positiva de la enzima amilasa, las placas son teñidas con yodo con el fin de visualizar la presencia de una zona traslúcida debido a la actividad amidolítica sobre el MM, ya que el yodo tiñe de azul las zonas de la placa con almidón y de amarillo aquellas donde no se encuentra el mismo.

**Imagen N° 13. Método de difusión en agar**



Fuente: <http://www.ritmodominicano.com><sup>28</sup>

**Ensayo de molienda:**

Muestras constituidas por alrededor de 10 gramos de BSG seco retenido sobre la malla N° 10, que incluye las fracciones retenidas por encima de las mallas N° 5, de 4000 micras<sup>29</sup> de apertura; 8, de 2380 y 10, de 2000 micras, se muelen en una trituradora multipropósito a una velocidad de 24.000 rpm por 15, 30 y 45 segundos con el objetivo de aumentar el área superficial del BSG para favorecer la acción de las enzimas proteolíticas. Luego se separan nuevamente en fracciones de diferentes tamaños de partículas usando un conjunto de tamices, como se explica en el análisis de granulometría.

La actividad proteolítica de las muestras de molienda se observa también por el método de difusión en agar, tal como se describe, suplementando el MM con un homogeneizado de 5 gramos de BSG de molienda en 50 ml de buffer fosfato a pH 7,2.

**Imagen N° 13. Trituradora multipropósito**



Fuente: <http://spanish.alibaba.com>

---

<sup>28</sup> [http://www.ritmodominicano.com/wiki.php?title=M%C3%A9todo\\_Kirby-Bauer](http://www.ritmodominicano.com/wiki.php?title=M%C3%A9todo_Kirby-Bauer)

<sup>29</sup> El micrómetro o micra es la unidad de longitud equivalente a una millonésima parte de un metro. Su símbolo científico es  $\mu\text{m}$ .

### Polifenoles:

La extracción de polifenoles se ensaya utilizando las siguientes condiciones.

Variando:

1. La relación del sustrato BSG con la solución alcohólica de etanol<sup>30</sup> : 1 BSG en 1, 2 ó 4 volúmenes de solución alcohólica.
2. La concentración del alcohol en la solución alcohólica: 20, 30, 40 y 50% alcohol/agua.
3. La velocidad de agitación: 0, 50 y 100 rpm.
4. Los tiempos de extracción siempre manteniendo la temperatura de extracción igual a la ambiental: 30, 60 y 120 minutos.
5. La cantidad de ciclos de extracción: uno y dos ciclos adicionales.

Después de realizado el protocolo de extracción de polifenoles, la mezcla se filtra y se recoge el BSG.

Luego de los ciclos de extracción, el contenido de polifenoles totales en el extracto de etanol acuoso se determina siguiendo la metodología descrita por Singleton y Rossi<sup>31</sup> la cual se detalla brevemente a continuación: el extracto de etanol acuoso obtenido se incuba con 550 µL de NaOH 1 M durante 16 horas a 20° C. La mezcla se neutraliza con 200 µL de ácido acético y se centrifuga a 10.000 rpm durante 20 minutos. El contenido de fenoles totales se ensaya en el sobrenadante con el reactivo Folin-Ciocalteu y usando ácido gálico<sup>32</sup> como estándar. Los polifenoles poseen una estructura química especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante que se basa en la capacidad de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas<sup>33</sup>, por tal motivo, se utiliza el reactivo mencionado, el cual funciona midiendo la cantidad de sustancia analizada que se necesita para inhibir la oxidación del mismo<sup>34</sup> constituido por una mezcla de ácidos de color amarillo, fosfowolfrámico y fosfomolibdico, que se reducen al interactuar con los compuestos fenólicos dando origen a óxidos de coloración azul, óxidos de wolframio y molibdeno, los cuales exhiben una amplia absorción de luz cuya intensidad es proporcional a la concentración de dichos compuestos<sup>35</sup> analizándose mediante electroespectrometría.

<sup>30</sup> El compuesto químico etanol, conocido como alcohol etílico, es un alcohol que se presenta como un líquido incoloro e inflamable con un punto de ebullición de 78° C.

<sup>31</sup> SINGLETON, V.L. y ROSSI, J.A., "Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagent" en: J. Sci. Food Agric., n° 10, 1965, p. 144-148.

<sup>32</sup> El ácido gálico es un ácido orgánico también conocido como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico y se encuentra tanto en su forma libre como formando parte de taninos.

<sup>33</sup> <http://es.wikipedia.org/wiki/Antioxidante>

<sup>34</sup> [http://es.wikipedia.org/wiki/Reactivo\\_de\\_Folin-Ciocalteu](http://es.wikipedia.org/wiki/Reactivo_de_Folin-Ciocalteu)

<sup>35</sup> [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lia/salazar\\_g\\_c/capitulo6.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/salazar_g_c/capitulo6.pdf)

Los resultados se expresan como mg de ácido gálico (GA) equivalentes/L de extracto, ya que dentro de los polifenoles, los taninos hidrolizables, son ésteres de ácido gálico, de glucosa y otros azúcares<sup>36</sup>. La elección de éste como estándar se basa en la disponibilidad de una sustancia estable y pura, y es a la vez menos costoso que otras opciones<sup>37</sup>. Las muestras son preparadas y analizadas por triplicado.

Por otra parte, con el objetivo de determinar si luego de alguno de los procesos de extracción de polifenoles se logra una disminución en el contenido de los mismos sobre el sustrato, se determina cualitativamente la presencia de éstos usando Fast Blue BB Sal, que tiene la capacidad de reaccionar específicamente con compuestos fenólicos<sup>38</sup> para dar un producto de la reacción de color marrón rojizo característico. Las muestras teñidas luego de los procedimientos de extracción se observan a través de un microscopio estereoscópico trinocular con un rango de ampliación de 7 a 30X. Para un mejor contraste, las muestras también son teñidas con yodo con el fin de diferenciar la fracción de almidón.

La capacidad de la fuente enzimática de hidrolizar las muestras libres de polifenoles se analiza cualitativamente mediante el método de difusión en agar.

**Imagen N° 14. Microscopio estereoscópico trinocular**



Fuente: <http://serviciospro.wanadoo.es/tecnicro/olympus.htm>

---

<sup>36</sup> <http://es.wikipedia.org/wiki/Polifenol>

<sup>37</sup> <http://waterhouse.ucdavis.edu/phenol/fofinmicro>

<sup>38</sup> O'BRIAN, T.P. y MC CULLY, M.E., "The Study of Plant Structure: Principles and Selected Methods", en: Termarcarphi Pty., Ltd., 1981.

**Esterilización:**

El procedimiento de esterilización del BSG se lleva a cabo de cuatro formas diferentes:

**Cuadro N° 3. Esterilización del BSG**

Formas			
Adición de 50 mg/L de ketoconazol <sup>39</sup>	Esterilización en autoclave a 121° C durante 15 minutos	Adición de peróxido de hidrógeno <sup>40</sup> (20 v)	Exposición a luz ultravioleta (UV) <sup>41</sup> durante 2 horas

La eficacia de cada tratamiento se evalúa analizando el número de microorganismos remanentes en unidades formadoras de colonias/gramo (UFC/g). Posteriormente se evalúa la capacidad de la cepa proteolítica *Bacillus cereus* en hidrolizar el sustrato BSG esterilizado a través de la medición cualitativa de la actividad proteolítica; es decir, por el método de difusión en agar.

**Protocolo para la preparación del sustrato de fermentación:**

La materia prima se seca a 60° C durante 24-48 horas y se tamiza. El material retenido sobre la malla del tamiz número 10 se muele, luego los polifenoles son extraídos con una solución alcohólica, relación BSG 1:4, es decir, 25 gramos de BSG en 100 ml de solución; en 30% de alcohol y 70% de agua. Finalmente el BSG se añade a una solución salina<sup>42</sup> y, se esteriliza a 121° C durante 15 minutos. El medio obtenido se denomina sustrato de fermentación (FS).

<sup>39</sup> Droga con propiedades antifúngicas.

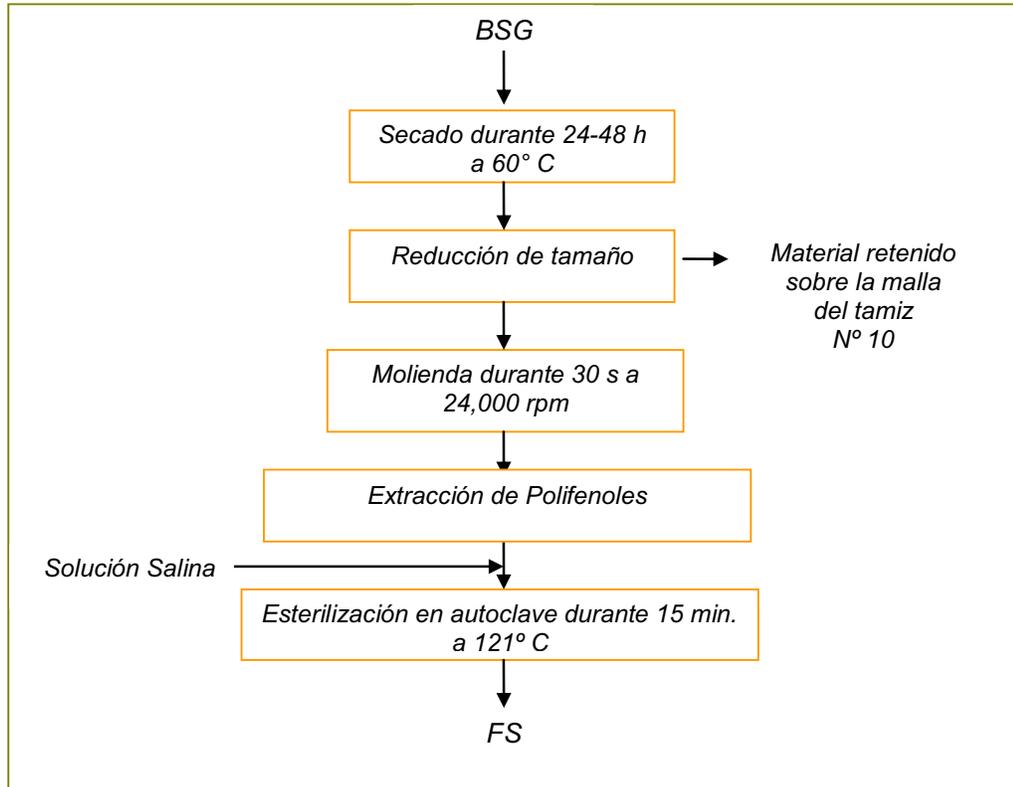
<sup>40</sup> También conocido como agua oxigenada, es un producto químico muy reactivo compuesto por hidrógeno y oxígeno. Sus radicales libres altamente reactivos originados a partir de la molécula de "agua oxigenada", penetran la membrana celular y destruyen cadenas proteicas, ocasionando la "pérdida de viabilidad" del microorganismo.

<sup>41</sup> Es parte del espectro electromagnético de radiación la cual también es emitida por el sol. Está situada entre las bandas de rayos X y la luz visible. El principal mecanismo del efecto letal de la luz UV sobre las bacterias, se atribuye a su absorción por el ADN y el resultante daño de éste.

<sup>42</sup> Solución de cloruro sódico en agua purificada.

La figura N° 1 muestra un diagrama de flujo típico para la preparación del BSG.

**Figura N° 1. Procedimiento esquemático del pre-tratamiento del BSG**



### **Hidrólisis:**

Las reacciones de hidrólisis enzimática se realizan a escala de laboratorio. El FS se añade a 100 ml de un Medio Mínimo Salino (MMS), que contiene 0,1% de fosfato monoácido de potasio,  $K_2HPO_4$ ; 0,02% de sulfato de magnesio,  $MgSO_4 \cdot H_2O$ ; 0,01% de cloruro de calcio,  $CaCl_2$ ; y 1% de carbonato de sodio,  $Na_2CO_3$ . Esta solución luego se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. El carbonato de sodio se esteriliza por separado y se añade al resto del medio después de alcanzar la temperatura ambiente. Posteriormente, 100 ml del medio anterior se inoculan en un Erlenmeyer de 150 ml con diferentes volúmenes de la fuente de enzima provenientes del cultivo microbiano denominada “enzima cruda” por su escaso nivel de purificación o un volumen equivalente del cultivo conteniendo las células bacterianas activas. Luego se incuba a 32° C con agitación orbital durante 30 horas. Después de este período, se recolecta un volumen fijo y se centrifuga a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4° C.

El sobrenadante obtenido se utiliza para el ensayo de actividad proteolítica.

**Imagen N° 15. Erlenmeyer y Agitador orbital**



Fuentes: <http://www.sks-science.com><sup>43</sup> y <http://www.auxilab.es><sup>44</sup>

### **Actividad proteolítica:**

La actividad proteolítica del sobrenadante libre de células bacterianas y obtenido de la reacción de hidrólisis ya descrita, se evalúa utilizando azocaseína<sup>45</sup> como sustrato. Brevemente, 120  $\mu$ l del sobrenadante se incuban con 480  $\mu$ l de una solución que contiene 10 gramos de azocaseína por litro de buffer Tris<sup>46</sup>-HCl a una concentración 0,1 molar (M)<sup>47</sup>, a pH 7 durante 30 minutos a 32° C en un baño con circulación controlada. La reacción se detiene mediante la adición de 480  $\mu$ l de ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final de 100 g/L y se refrigera a 4° C durante 30 minutos. Luego, se centrifuga a 10.000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, a 800  $\mu$ l del sobrenadante se le añaden 200  $\mu$ l de NaOH 1,8 normal (N)<sup>48</sup> y se miden las absorbancias a 420 nm en un espectrofotómetro.

Para el ensayo control, la reacción se detiene con TCA, como ya se mencionó, inmediatamente después de que se agrega el sobrenadante conteniendo la fuente enzimática. La actividad proteolítica se expresa como la cantidad de enzima que causa un cambio de absorbancia de 0,01 a 420 nm en las condiciones de ensayo, es decir, 30 minutos a 32 ° C, por ml de fuente enzimática (U/ml).

<sup>43</sup> <http://www.sks-science.com/laboratory-glassware-p-6326.html>

<sup>44</sup> [http://www.auxilab.es/es/catalogo/agitadores\\_mecanicos\\_orbitales\\_Agitador-orbital-685-1.aspx](http://www.auxilab.es/es/catalogo/agitadores_mecanicos_orbitales_Agitador-orbital-685-1.aspx)

<sup>45</sup> Sustrato de proteasas no específico. La hidrólisis de la caseína libera el grupo azo, el cual es detectado por absorbancia a 420 nm.

<sup>46</sup> Tris es el nombre abreviado del compuesto orgánico conocido como tris (hidroximetil) aminometano, el cual se utiliza en particular para preparar disoluciones buffer.

<sup>47</sup> La molaridad (M), o concentración molar, es el número de moles de soluto por cada litro de disolución.

<sup>48</sup> La normalidad (N) es el número de equivalentes de soluto por litro de disolución, el cual se calcula dividiendo la masa total por la masa de un equivalente.

**Contenido de proteínas solubles:**

El contenido total de proteínas solubles se determina según el método de Lowry<sup>49</sup>, usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Brevemente, 500  $\mu$ l de la muestra son agregados a 700  $\mu$ l de la solución de Lowry, o solución C, conformada por la mezcla de los reactivos A ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% y NaOH 0,1 M), B<sub>1</sub> ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1%) y B<sub>2</sub> (tartrato sódico-potásico al 2%) en una relación de 100:1:1, respectivamente, en un tubo de ensayo. Esta se mezcla vigorosamente en el agitador Vórtex y luego se guarda en la oscuridad durante 30 minutos, tiempo en el que se agrega 100  $\mu$ l del Reactivo de Folin diluido en agua destilada en una relación 1:4. Esta solución es nuevamente agitada por medio del agitador y se conserva durante 20 minutos en la oscuridad. La solución es transferida finalmente a una cubeta de vidrio y se lee la absorbancia a 750 nm. El mismo procedimiento se sigue para la construcción de la curva estándar reemplazando la muestra por una solución patrón de 500 g/L de albúmina de suero bovino (BSA).

**Imagen N° 16. Agitador Vórtex**



Fuente: <http://www.labotienda.com>

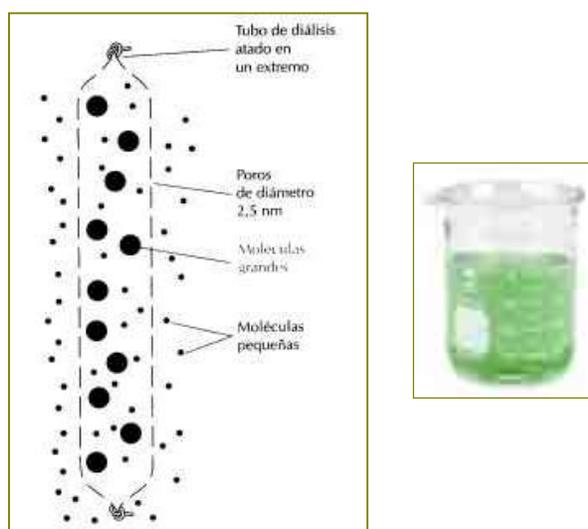
---

<sup>49</sup> LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J., "Protein measurement with the Folin phenol reagent", en: J. Biol. Chem., n° 193, 1951, p. 265-276.

**Diálisis del hidrolizado proteico:**

El hidrolizado proteico obtenido se transfiere a dos bolsas plásticas especiales para diálisis de 3500 y 12000-14000 Dalton (Da)<sup>50</sup> de peso molecular de corte, que son cortadas previamente a la longitud deseada, con cierta longitud extra. Un nudo se realiza en un extremo y luego se llena con el hidrolizado proteico. Finalmente se procede a cerrar con otro nudo el extremo restante. Las bolsas de diálisis con las muestras son colocadas en un buffer a pH 8 durante 24 hs a una temperatura de 4° C. Durante este período de tiempo, las moléculas grandes permanecen atrapadas dentro de las bolsas mientras que las pequeñas difunden a través de la membrana en dos direcciones. Completada la diálisis, las bolsas son vaciadas con extremo cuidado en un vaso de precipitado por punción. Sobre la muestra dializada se mide el porcentaje de proteína soluble.

**Imagen N° 16. Bolsa para diálisis y Vaso de precipitado**



Fuentes: <http://tlaboratorioquimico.blogspot.com><sup>51</sup> y <http://mazinger.sisib.uchile.cl><sup>52</sup>

<sup>50</sup> Unidad de masa empleada en física de partículas y bioquímica, especialmente en la medida de masas atómicas y moleculares. Equivale a la doceava (1/12) parte de la masa de un átomo de carbono-12.

<sup>51</sup> <http://tlaboratorioquimico.blogspot.com/2008/09/vaso-de-precipitado-o-vaso-de-pp.html>

<sup>52</sup> [http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias\\_quimicas\\_y\\_farmacuticas/apquim-an-instr-9/c27a.html](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmacuticas/apquim-an-instr-9/c27a.html)

### **Calorimetría diferencial de barrido:**

Por esta metodología se determina la temperatura y el grado de desnaturalización de las proteínas. Entre 15 y 20 mg de cada una de las cuatro muestras que se utilizan, cebada malteada, cebada agotada (BSG), sustrato de fermentación (FS) y el residuo sólido que queda después de la fermentación obtenido por centrifugación del producto de hidrólisis; se colocan en cápsulas de aluminio que se sellan herméticamente. Las muestras son analizadas haciendo un barrido de temperaturas a una velocidad de calentamiento de 10° C/minuto entre 20 y 220° C, usando un Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC). El equipo es previamente calibrado usando indio<sup>53</sup>, ácido láurico y ácido esteárico como patrones de calor y temperatura.

De los termogramas obtenidos se determinan la temperatura de pico y el área bajo la curva, que corresponden a la temperatura y a la entalpía<sup>54</sup> de desnaturalización térmica de las proteínas respectivamente (Td en ° C y ΔH en J/g proteína), empleando el software Universal Analysis V4.2E. Las determinaciones se realizaran como mínimo por duplicado.

### **Imagen N° 17. Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC)**



Fuente: <http://www.ictp.csic.es/fq/equipos.htm>

### **Análisis estadístico:**

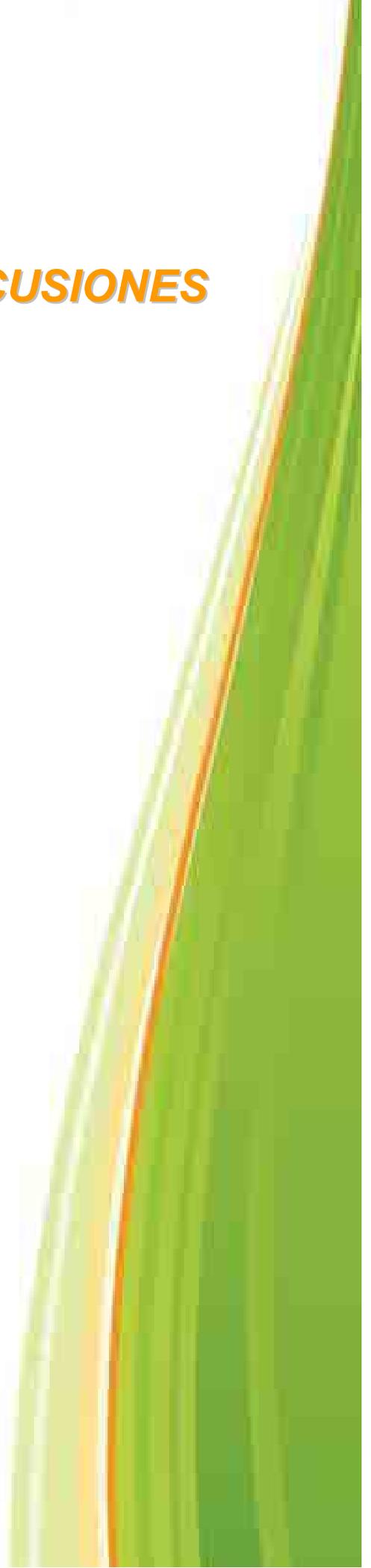
Los datos son analizados mediante pruebas de hipótesis a través de un paquete de software estadístico SAS versión 8.0. El nivel de probabilidad se fija en  $p < 0,05$ .

---

<sup>53</sup> Elemento químico de número atómico 49 situado en el grupo 13 de la tabla periódica de los elementos. Su símbolo es In.

<sup>54</sup> Entalpía (del prefijo en y del griego "enthalpos" ενθαλπος calentar) es una magnitud termodinámica, simbolizada con la letra H, cuya variación expresa una medida de la cantidad de energía absorbida o cedida por un sistema termodinámico, es decir, la cantidad de energía que un sistema puede intercambiar con su entorno.

# ***RESULTADOS Y DISCUSIONES***



**Composición proximal:**

A pesar de que el BSG es el principal subproducto del proceso de elaboración de la cerveza, ha recibido poca atención como un bien con valor comercial, y su disposición provoca a menudo problemas ambientales<sup>1</sup>. Sin embargo, como se ve reflejado en la composición química detallada en la Tabla N° 1, es un subproducto de interés como materia prima. En la misma se presentan los resultados de la composición proximal para las tres variedades de BSG empleadas en esta tesis. El contenido de proteínas, grasas, cenizas e hidratos de carbono se expresan como porcentaje en base seca (%BS), teniendo en cuenta los valores de humedad de las muestras.

**Tabla N° 1. Composición química proximal de las diferentes variedades de BSG**

Ensayos (% p/p)	Variedad de BSG		
	100% Pilsen	93% Pilsen	78% Pilsen
Humedad	77,40 ± 0.28 <sup>b</sup>	77,69 ± 0.30 <sup>b</sup>	79,70 ± 1.18 <sup>a</sup>
Cenizas Totales (BS <sup>1</sup> )	2,58 ± 0.128 <sup>a</sup>	2,21 ± 0.49 <sup>a</sup>	2,11 ± 0.38 <sup>a</sup>
Proteína Cruda (BS)	29,97 ± 0.93 <sup>a</sup>	30,52 ± 0.43 <sup>a</sup>	34,55 ± 0.49 <sup>a</sup>
Grasas (BS)	5,82 ± 0.93 <sup>b</sup>	5,67 ± 0.79 <sup>b</sup>	6,74 ± 2.74 <sup>a</sup>
Carbohidratos (BS)	61,55 ± 1.12 <sup>a</sup>	60,97 ± 0.79 <sup>a</sup>	56,29 ± 2.748 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> BS: Base seca

El número marcado con una letra superíndice diferente en la misma fila, significa que existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los demás en un nivel del 5%.

No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre las variedades 1 y 2 respecto al contenido de humedad. Sin embargo, la variedad 3 difiere de las otras ( $p$ -valor= 0.0075). El contenido de materia seca (MS) del BSG se encuentra en un rango entre el 20,30 y 22,60%. Estos resultados son acordes con lo informado por Belibasakis y Tsirgogianni<sup>2</sup> y Murdock<sup>3</sup> quienes informaron contenidos de MS entre el 18,6 y 26,0%, respectivamente.

<sup>1</sup> SAFARIK, I., HORSKA, K. y SAFARIKOVA, M., "Magnetically modified spent grain for dye removal", en: *J. Cereal Sci.*, n° 53, 2011, p. 78-80.

<sup>2</sup> BELIBASAKIS, N.G. y TSIRGOGIANNI, D., "Effects of wet brewer's grains on milk yield, milk composition and blood components of dairy cows in hot weather", en: *Anim. Feed Sci. Technol.*, n° 57, 1996, p. 175- 181.

<sup>3</sup> MURDOCK, F.R., HODGSO, A.S., ROBERT, E. y RILEY, J.R., "Nutritive value of wet brewer's grains for lactating dairy cows", en: *J. Dairy Sci.*, n° 64, 1981, p. 1826-1832.

No hay diferencias significativas en el contenido de proteína cruda (PC) entre las tres variedades de BSG, lo cual permite realizar el análisis con el pool de datos. El promedio del mismo es  $31,68 \pm 0,61$  % p/p de base seca (BS). Un valor de contenido de proteínas similar fue también informado por Crickenberger y Johnson<sup>4</sup>, con un valor de PC del 30,10%.

En el contenido de grasa tampoco hay diferencias significativas ( $p < 0,5$ ) entre las variedades 1 y 2. Sin embargo, la variedad 3 difiere de las otras ( $p$ -valor= 0.0419). El contenido del extracto etéreo (EE) del BSG se encuentra en el rango entre el 5,67 y 6,74% p/p (BS), valor inferior al informado por Dong y Ogle<sup>5</sup>.

Respecto al contenido de cenizas totales (CT) no se encuentran diferencias significativas entre las tres variedades de BSG, con un valor promedio de  $2,30 \pm 0,33$ % p/p (BS). Este porcentaje es inferior que los valores informados por Dong y Ogle<sup>6</sup> de un 5%.

No existen diferencias en la composición proximal entre las variedades 1 y 2, así, la diferencia en la composición química de la variedad 3 respecto a las otras variedades puede ser atribuida a la naturaleza de los granos adjuntos utilizados para la fabricación de la cerveza como materia prima, su nivel de compactación y el tipo de canales que atraviesan. Además, pueden existir variaciones en el valor nutritivo de los granos utilizados, el período de fermentación, técnicas de elaboración, entre otros factores que podrían contribuir a las variaciones en la composición química del BSG entre los diferentes investigadores.

El hecho que los lotes no presenten diferencias significativas en el contenido de proteínas ( $p$ -valor  $> 0,05$ ), y dado que las proteínas son el principal parámetro para la caracterización química del BSG utilizado en nutrición animal y humana<sup>7</sup> lo encontrado es un resultado muy prometedor que permite utilizar una mezcla de las tres variedades de BSG.

---

<sup>4</sup> CRICKENBERGER, R.G. y JOHNSON, B.H., "Effect of feeding wet brewer's grains to beef heifers on wintering performance, serum selenium and reproductive performance", en: *J Anim Sci.* n°54, 1982, p.18-22.

<sup>5</sup> DONG, N.T.K. y OGLE, R.B., "Effect of brewery waste replacement of concentrate on the performance of local and crossbred Muscovy ducks" en: *Asian-Aust. J Anim Sci.* n° 16, 2003, p. 1510-1517.

<sup>6</sup> *ibid*

<sup>7</sup> SANTOS, M., JIMENEZ, J.J., BARTOLOME, B., GOMEZ-CORDOVES, C. y DEL NOZAL, M.J., "Variability of brewer's spent grain within a brewery", en: *Food Chem.* n° 80, 2003, p. 17-21.

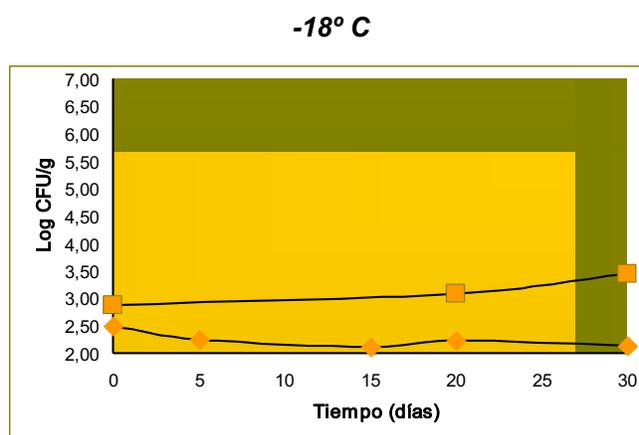
### Caracterización microbiana:

El alto contenido de humedad y la composición del BSG hacen que sea una materia prima muy susceptible de ser degradada por microorganismos. La posible presencia de una microflora residente es la que puede afectar el uso potencial del BSG como una materia prima industrial segura y uniforme para la elaboración de productos de mayor valor agregado a través de procesos Downstream.<sup>8,9</sup>

Inicialmente, el BSG presentó bajos recuentos microbianos ( $\sim 2 \log_{10}$  UFC/g), los cuales pueden atribuirse a las altas temperaturas aplicadas durante el proceso de elaboración de la cerveza. Con el objetivo de investigar el efecto de diferentes temperaturas de almacenamiento sobre la estabilidad microbiológica, el BSG proveniente de las tres variedades es almacenado como se describió previamente en el cuadro N° 2 de la sección materiales y métodos.

No se encuentran diferencias significativas en los recuentos microbianos de las distintas variedades de BSG, por lo tanto el análisis se realiza con el pool de datos correspondientes a las tres variedades. La figura N° 2 presenta la carga promedio de microorganismos de las variedades utilizadas, tanto para microorganismos aerobios mesófilos y termófilos asociados al BSG bajo las condiciones ensayadas.

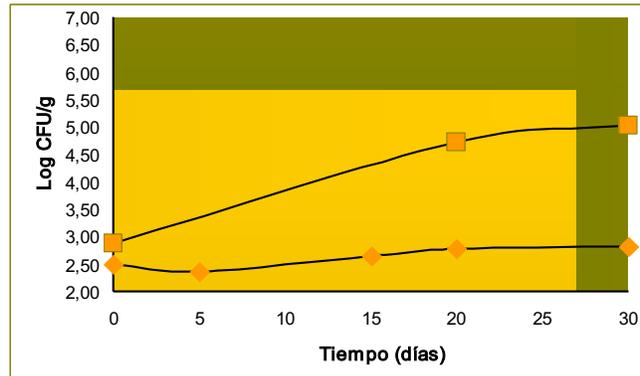
**Figura N° 2. Evolución de la microflora natural promedio aerobia mesófila y termófila del BSG. (■) Microorganismos mesófilos, (◆) Microorganismos termófilos. Perfiles de la población mesófila y termófila de la variedad seca (●) Microorganismos termófilos, (▲) Microorganismos mesófilos.**



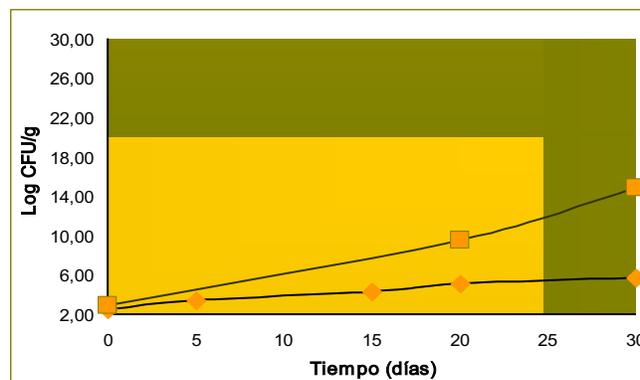
<sup>8</sup> Aguas abajo (Downstream) se utiliza para indicar a los procesos posteriores al proceso de estudio y que de alguna manera se van a ver influenciados o "alimentados" por este.

<sup>9</sup> ROBERTSON, J.A.I., ANSON, K.J.A., TREIMO, J., FAULDS, C.B., BROCKLEHURTS, T.F., EIJSINK, V.G.H. y WALDRON, K.W., "Profiling brewer's spent grain for composition and microbial ecology at the site of production", en: Food Sci. Technol. n° 43, 2010, p. 890-896.

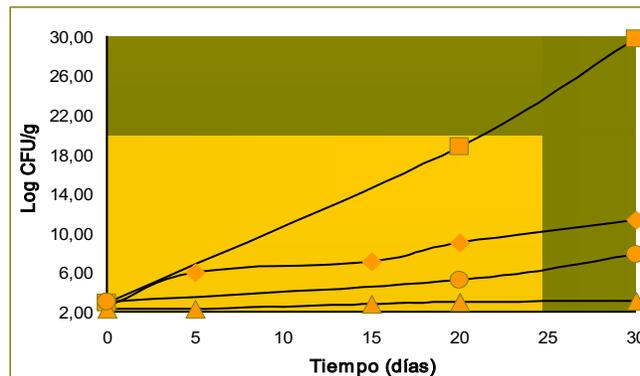
0° C



10° C



20° C



Tanto a -18° C como a 0° C los recuentos microbianos se mantienen en valores similares a los iniciales durante todo el período de almacenamiento, el cual fue de 30 días, excepto para la microflora termófila que presenta un ligero incremento después de 20 días a la temperatura de almacenamiento de 0° C.

Cuando el BSG se almacena a 10° C y 20° C, en ambas poblaciones se observa un incremento lineal significativo. A 20° C, la tasa de crecimiento de los microorganismos termófilos presenta una pendiente significativamente superior en

relación a la temperatura de 10° C. Cuando la temperatura de almacenamiento es de 20° C, se observa una rápida colonización bacteriana, alcanzando recuentos finales para los microorganismos mesófilos de aproximadamente 12 log<sub>10</sub> UFC/g y 30 log<sub>10</sub> UFC/g para la microflora termófila; es decir, esta última población triplica a los microorganismos mesófilos. Es probable que las esporas<sup>10</sup> aeróbicas termófilas predominen, principalmente debido a la temperatura utilizada en la maceración.

Los resultados del recuento de microorganismos muestran que la microflora natural asociada al BSG fresco contiene bacterias aerobias mesófilas y termofilas en cantidades dependientes de las condiciones de almacenamiento, en lugar de levaduras y mohos<sup>11</sup>. El recuento promedio de levaduras y hongos es inferior a 10 log<sub>10</sub> UFC/g a lo largo del período total de almacenamiento. Resultados similares fueron encontrados por Petters<sup>12</sup>, quien informó sobre el predominio de bacterias, con poblaciones cada vez más bajas de las levaduras y hongos filamentosos.

La microflora del BSG previamente secada y almacenada a 20° C, como muestra la cuarta figura, se mantiene prácticamente constante durante el período de almacenamiento (~ 2,5 log<sub>10</sub> UFC/g). Este resultado evidencia que el secado del BSG constituye una alternativa posible para la preservación de esta materia prima. El secado del BSG en hornos se debe llevar a cabo a temperaturas cercanas a 60° C, debido a que la utilización de temperaturas más altas genera sabores desagradables<sup>13</sup>. En general, las muestras secas de BSG alcanzan recuentos microbianos cinco órdenes inferiores al BSG húmedo durante el mismo período de almacenamiento.

El grado de contaminación microbiana inicial del BSG se encuentra dentro de los límites aceptables para uso alimenticio, pero es necesario establecer condiciones adecuadas de almacenamiento para reducir al mínimo la proliferación microbiana antes de la transformación del mismo.

---

<sup>10</sup> Célula reproductora asexual, en la mayoría de los casos aploide y unicelular. Cuando la espora se divide por mitosis sin fusionarse con otra célula produce otro organismo.

<sup>11</sup> El moho es un hongo que se encuentra tanto al aire libre como en interiores. Existen muchas especies de mohos que son especies microscópicas del reino fungi que crecen en formas de filamentos pluricelulares o unicelulares.

<sup>12</sup> PETERS H.I., FLANNIGAN B., AUSTIN B., "Quantitative and qualitative studies of the microflora of barley malt production", en: J. Appl. Microbiol., n° 65, 1988, p. 279-297.

<sup>13</sup> HERNANDEZ, A.M., RODRIGUEZ, J.L., LOPEZ, B. y ZEQUERA, O.L., "Caracterización química y funcional del afrecho de malta", en: Alimentaria, 1999, p.105-107.

**Análisis granulométrico:**

La Tabla N° 2 muestra la distribución del tamaño de las partículas del BSG. La mayoría de las mismas son retenidas por las mallas N° 5, representando el 31,73% y N° 8, con un 59,68%, correspondiente a tamaños de apertura de 2,500 y 2,000  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

**Tabla N° 2. Ensayo de Granulometría del BSG**

Malla A.S.T.M. (N°)	Apertura ( $\mu\text{m}$ )	Partículas retenidas (%)	Descripción	Tinción		Crecimiento microbiano <sup>a</sup>	Actividad proteolítica <sup>b</sup> ( $\text{mm}^2$ )
				Lugol <sup>14</sup>	Fast Blue <sup>15</sup>		
5	4000	31.73	Cáscara. Algunas fracciones de endospermo almidonoso entero.	++	+++	580 <sup>a</sup>	676 <sup>a</sup>
8	2380	59.68	Cáscara. Algunas fracciones de almidón.	+++	++	650 <sup>a</sup>	484 <sup>b</sup>
10	2000	3.83	Mayormente corteza.	+	+	270 <sup>b</sup>	225 <sup>c</sup>
14	1410	2.57	Mayormente astillas.		+	330 <sup>b</sup>	< 100 <sup>d</sup>
35	500	0.70	Polvo y astillas finas.	-	-	126 <sup>c</sup>	Sin halos
< 35		1.49	Polvo.	-	-		

<sup>a</sup> Expresado como UFC. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes.

<sup>b</sup> Expresado como el diámetro de los halos proteolíticos elevado al cuadrado. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes

Para evaluar la capacidad del *B. cereus* de hidrolizar diferentes fracciones del BSG, la actividad proteolítica de cada una de estas fracciones, previa homogeneización en un buffer fosfato a pH 7.2 y adición como suplemento en un MM, se determina cualitativamente a través del método de difusión en agar, midiendo la zona traslúcida alrededor del hoyo provocada por la actividad de las enzimas peptidasas. Como se muestra en la tabla N° 2, el mayor halo proteolítico se observa en la placa suplementada con las fracciones retenidas por encima de la malla N° 5, principalmente compuesta por las cáscaras y el endospermo almidonoso entero. También en las muestras recogidas en las mallas N° 8 y 10 se encuentran halos proteolíticos. Un halo pequeño es observado en el MM suplementado con el homogenato preparado a partir del material retenido por encima de malla N° 14. Al

<sup>14</sup> El lugol o solución de Lugol es una disolución de yodo molecular  $\text{I}_2$  y yoduro potásico KI en agua destilada. Se utiliza esta disolución como indicador en la prueba del yodo, que sirve para identificar polisacáridos como los almidones, glucógeno y ciertas dextrinas.

<sup>15</sup> La tinción Fast blue permite la detección de fibras reticulares en tejido conectivo.

prepararlo con aquellas fracciones con tamaño de apertura menor a  $1.410\ \mu\text{m}$ , no se detecta actividad proteolítica, es decir, hay ausencia de halos. Tampoco se observan halos en los controles, donde sólo se colocó el MM en los hoyos. A partir de estos resultados, el material retenido entre los tamices N° 5 a 10 es separado para las posteriores moliendas.

Si bien no se encuentran diferencias significativas en el crecimiento microbiano entre el medio suplementado con los homogenatos de BSG retenidos en los tamices N° 5 y 8, la actividad proteolítica de los mismos, y del N° 10, presenta diferencias significativas entre estas fracciones.

#### **Análisis de molienda:**

Con el fin de definir el grado de molienda apropiado para la hidrólisis enzimática por *Bacillus cereus*, la muestra recogida por encima de la malla N° 10, que incluye las fracciones retenidas por encima de las mallas N° 5, 8 y 10, es sometida a un proceso de molienda durante 15, 30 y 45 segundos en una máquina trituradora multipropósito.

Después de la molienda del BSG, la distribución del tamaño de las muestras molidas durante los diferentes tiempos mencionados se determina mediante el ensayo de granulometría. La distribución del tamaño de las partículas iniciales, así como el producto de la molienda durante 30 segundos se presenta en la Tabla N° 3. Es notable que el promedio del tamaño de partículas de las muestras antes de la molienda fuera mayor que el valor medido por el tamiz con una apertura de  $2000\ \mu\text{m}$ . Una posible explicación de esta distribución podría atribuirse a la adherencia de las partículas pequeñas a la superficie de las mayores.

La molienda del BSG da como resultado una reducción del diámetro medio de aproximadamente 4 ordenes, entre 2.3638 mm y 0.0656 mm con lo cual, se aumenta el área superficial del BSG para favorecer la acción de las enzimas proteolíticas.

**Tabla N° 3. Distribución del tamaño de las partículas del BSG antes y después de la molienda durante 30 segundos**

	$D_{pi}$ (mm)	$D'_{pi}$ (mm)	Antes de la molienda			Después de la molienda		
			MR	$X_i$	$X_i/D'_{pi}$	MR	$X_i$	$X_i/D'_{pi}$
1	4,000	-	0	0	-	0	0	-
2	2,500	3,250	4,223	0,4167	0,1282	2,566	0,2469	1,9258
3	2,380	2,440	3,644	0,3596	0,1474	3,246	0,3124	2,1195
4	2,000	2,190	1,182	0,1166	0,0533	2,846	0,2739	5,1421
5	1,410	1,705	0,754	0,0744	0,0436	1,452	0,1397	3,2019
6	0,850	1,130	0,231	0,0228	0,0202	0,089	0,0086	0,4246
7	0,605	0,728	0,039	0,0038	0,0053	0,045	0,0043	0,8186
8	0,355	0,480	0,034	0,0034	0,0070	0,026	0,0025	0,3579
9	0,125	0,240	0,021	0,0021	0,0086	0,017	0,0016	0,1895
Pan	0	0,063	0,006	0,0006	0,0095	0,105	0,0101	1,0666
<b>Total</b>			10,134			10,392		
			$L_i = 2,3638 \text{ mm}$			$L_f = 0,0656 \text{ mm}$		

$D_{pi}$  y  $D'_{pi}$  son las aberturas del tamiz y el promedio del incremento promedio de las partículas, respectivamente; MR y  $X_i$  son la cantidad de muestra retenida y la fracción másica sobre el tamiz correspondiente, respectivamente;  $L_1$  y  $L_2$  son los diámetros medios antes y después de la molienda y son

$$\text{definidos como } \frac{1}{L_i} = \sum_{i=1}^n \frac{X_i}{D'_{pi}}.$$

Para determinar el efecto del tiempo de molienda sobre la actividad proteolítica, el BSG molido es homogenizado usando una solución de buffer fosfato a pH 7.2. Este homogenato es utilizado como suplemento del MM. El mayor halo proteolítico, de 784 mm<sup>2</sup>, se corresponde con aquella muestra sometida al menor tiempo de molienda, es decir, de 15 segundos, luego el cuadrado del diámetro disminuye a medida que aumenta el tiempo de molienda a 576 mm<sup>2</sup> y 324 mm<sup>2</sup> para 30 y 45 segundos, respectivamente, como refleja la tabla N° 4. Este resultado indicaría que un tiempo de molienda de 15 segundos es suficiente para incrementar el área superficial de BSG favoreciendo la hidrólisis enzimática por *B. cereus*. Además se observa que un mayor

grado de molienda del material no beneficia la actividad de hidrólisis proteica de esta cepa, probablemente debido a que a pesar de que la mayor superficie expuesta generaría un aumento de los sitios activos para la proteólisis, la concentración de la enzima actuaría limitando el curso de la reacción. Por lo tanto, el material retenido en el tamiz N° 10 es molido durante 15 segundos a 24.000 rpm y los polifenoles son extraídos en esta muestra en una etapa siguiente.

**Tabla N° 4. Actividad proteolítica medida como el diámetro al cuadrado de los halos**

Tiempo de molienda (seg.)	Diámetro al cuadrado (mm <sup>2</sup> )
0	625
15	784
30	576
45	324

#### **Extracción de polifenoles:**

El empleo directo de sub-productos agro-industriales en los alimentos se ve dificultado por la presencia de las sustancias antinutritivas como los residuos de la cáscara que causan problemas de sabor y olor, los polifenoles y otros inhibidores enzimáticos<sup>16</sup>. Desde el punto de vista nutritivo, los compuestos polifenólicos, como ya se ha mencionado, tienden a inhibir la digestión enzimática por su afinidad por las proteínas; los efectos son especialmente acusados en el caso de la digestión nitrogenada, ya que insolubilizan tanto el sustrato como los reactivos hidrolíticos, es decir, las proteasas. Además, desde el punto de vista tecnológico, niveles bajos de polifenoles facilitan el control de los procesos hidrolíticos, incrementado la efectividad de las enzimas proteolíticas y los rendimientos del proceso<sup>17</sup>. Por estas razones, se estudia la extracción de polifenoles como parte del protocolo de preparación del BSG.

Los mayores contenidos de polifenoles son encontrados en las fracciones recogidas sobre el tamiz con tamaño de apertura de 2000  $\mu\text{m}$ , principalmente sobre las mallas de tamaños de apertura de 4000  $\mu\text{m}$ , y 2380  $\mu\text{m}$ .

<sup>16</sup> MILLAN RODRIGUEZ, Francisco, BAUTISTA PALOMAS, Juan, OLIAS JIMENEZ, José Manuel. Procedimiento de obtención de peptonas vegetales de alto grado de hidrólisis y sus aplicaciones. España, Patentscope, 023170. 04.06.1998.

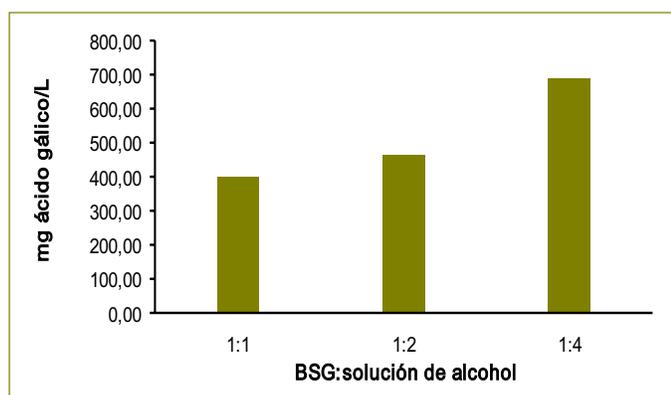
<sup>17</sup> CLEMENTE, A., "Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition", en: Food Sc. & Technol., n°11, 2002, p. 254-262.

El etanol es un buen solvente para extracción de polifenoles a temperaturas moderadas, es también un solvente alternativo al hexano, que ha generado recientemente interés por motivos de seguridad, ambientales y problemas de salud<sup>18</sup>.

En primer lugar, se determina la mejor relación para la solución BSG: etanol (p/v). Para ello se utiliza una solución 70:30 agua: alcohol con diferentes relaciones de masa-volumen de solución alcohólica. La fase líquida se recolecta después de 1 hora de extracción a temperatura ambiente, con el fin de cuantificar la concentración de polifenoles en el extracto.

La mayor extracción de polifenoles es alcanzada en la relación masa-volumen 1:4, como se muestra en la Figura N° 3.

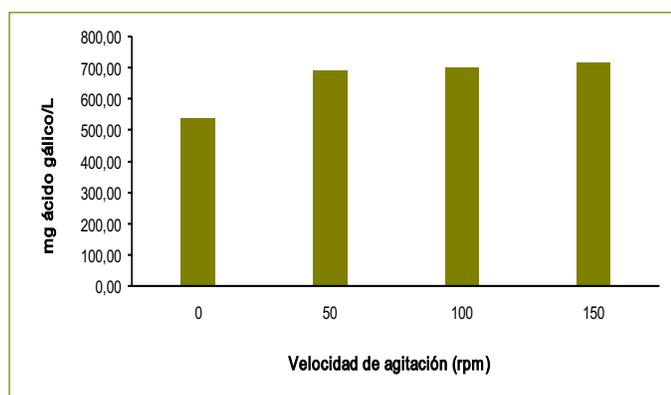
**Figura N° 3. Efecto de la relación masa-volumen de la solución alcohólica en la extracción de los polifenoles totales del BSG. La solución agua: alcohol utilizada fue 70:30; y el experimento fue realizado a 50 rpm durante un tiempo de extracción de 60 min.**



<sup>18</sup> SINEIRO, J., DOMINGUEZ, H., NUÑEZ, M.J. y LEMA, J.M., "Ethanol Extraction of polyphenols in an immersion extractor. Effect of pulsing flow", en: J. Am. Oil Chem. Soc., n° 73, 1996, 1121-1125.

Como la agitación también influye en la extracción de polifenoles, ésta es realizada exponiendo las muestras a 50, 100 y 150 rpm. En base a los resultados, los cuales se pueden observar en la Figura N° 4, una velocidad de agitación de 50 rpm es seleccionada como la mejor condición para favorecer la extracción de polifenoles del BSG. En esta condición, el nivel de extracción es un 30% superior en relación al medio sin agitación.

**Figura N° 4. Efecto de la velocidad de agitación en la extracción de los polifenoles totales del BSG. La solución agua: alcohol utilizada fue 70:30, la relación masa-volumen de la solución alcohólica fue 1:4; y el experimento fue realizado a 50 rpm durante un tiempo de extracción de 60 min.**



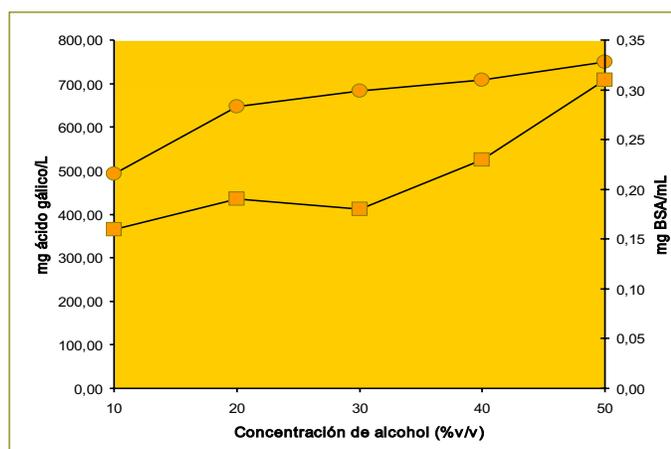
Para definir la concentración de alcohol apropiada para la extracción de polifenoles, la relación masa-volumen de 1:4 se mantiene constante y la concentración de alcohol es variada. Los polifenoles totales en los extractos aumentan a medida que se incrementaba la concentración de etanol en agua. Con una proporción de etanol: agua de 50:50 (v/v), la extracción es máxima.

En base a los resultados, sin embargo, una concentración alcohólica del 30% es la condición óptima de manera de reducir las pérdidas de proteínas solubles y obtener paralelamente una extracción razonable de polifenoles. Como se presenta en la Figura N° 5, a mayor concentración alcohólica, mayores son los niveles de polifenoles extraídos pero así también mayores son las pérdidas de proteínas solubles en el extracto. Cabe mencionar que las proteínas más abundantes en el BSG son hordeínas, es decir, prolaminas de la cebada, glutelinas, globulinas y albúminas<sup>19</sup>.

<sup>19</sup> FORSELL, P., KONTKANEN, H., SCHOLS, H.A., HINZ, S., EIJSINK, V.G.H., TREIMO, J., ROBERTSON, J.A., WALDRON, K.W., FAULDS, C.B. y BUCHERT, .J., "Hydrolysis of Brewers' Spent Grain by Carbohydrate Degrading Enzymes", en: J. Inst. Brew., n° 114, 2008, p. 306-314.

De éstas, las hordeínas constituyen la mayor parte<sup>20</sup>, y se caracterizan por su solubilidad en soluciones acuosas de alcohol<sup>21</sup>. Por estas razones, es elegida, como se mencionó anteriormente, una concentración de alcohol del 30% (v/v).

**Figura N° 5. Efecto de la concentración de etanol en agua en la extracción de los polifenoles totales y sobre el contenido de proteínas solubles del BSG. La relación masa-volumen de la solución alcohólica fue 1:4 (BSG: alcohol); y el experimento fue realizado a 50 rpm durante un tiempo de extracción de 60 min. (●) Extracción de Polifenoles, (■) Contenido de Proteínas Solubles.**



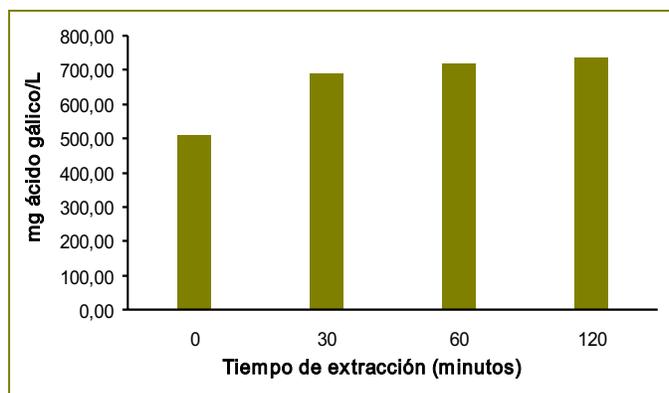
Con el propósito de definir el tiempo de extracción, son evaluados tiempos de 30, 60 y 120 minutos a temperatura ambiente en las condiciones previas establecidas, es decir, masa-volumen 1:4 y concentración de alcohol 30% v/v. El grado de extracción obtenido no presenta diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos, como se demuestra en la Figura N° 6. Un tiempo de extracción de 30 minutos resulta en un aumento del 40% en la extracción de polifenoles dando el mejor rendimiento.

<sup>20</sup> CELUS, I., BRIJS, K. y DELCOUR, J.A., "The effect of malting and mashing on barley protein extractability", en: *J. Cereal Sci.*, n° 44, 2006, p. 203-211.

<sup>21</sup> WINGAD, C.E., IQBAL, M., GRIFFIN, M. y SMITH, F.J., "Separation of hordein proteins from european barley by high-performance liquid chromatography: Its application to the identification of barley cultivars", en: *Chromatographia*, n° 21, 1986, p. 35.

Un mayor tiempo de extracción disminuye los compuestos fenólicos a través de la oxidación y estos productos pueden polimerizarse derivando en compuestos insolubles<sup>22</sup>.

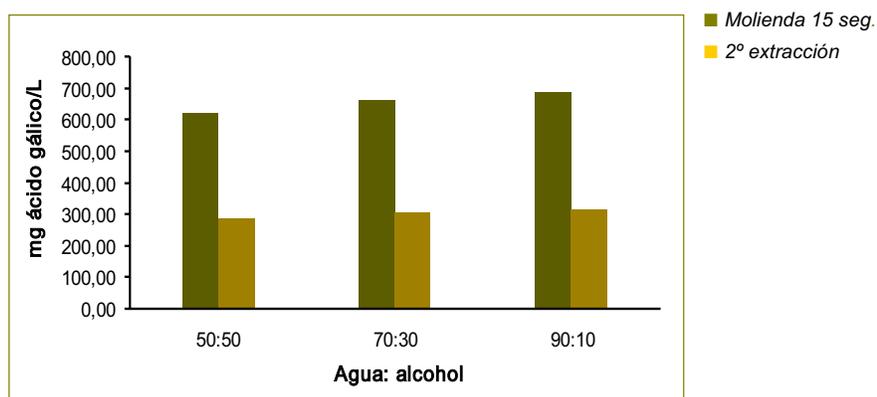
**Figura N° 6. Efecto del tiempo en la extracción de los polifenoles totales del BSG. La concentración de la solución agua: alcohol fue 70:30 (v/v), la relación masa-volumen de la solución alcohólica fue 1:4; y el experimento fue realizado a 50 rpm.**



<sup>22</sup> SHI, J., YU, J., POHORLY, J., YOUNG, J.C., BRYAN, M. y WU, Y., "Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution", en: Food. Agric. Envir., n° 1, 2003, p. 42-47.

La Figura N° 7 muestra el efecto del proceso de molienda y una segunda etapa de extracción aplicados al BSG para la extracción de los compuestos fenólicos. La mayoría de los polifenoles se eliminan en el primer paso de extracción con una disminución de la cantidad eliminada de polifenoles en el segundo ciclo de extracción. El proceso de molienda, de 30 segundos a 24.000 rpm, favorece la extracción de polifenoles, incrementando aproximadamente un 40% el nivel de extracción bajo las mismas condiciones experimentales.

**Figura N° 7. Efecto del proceso de molienda y una segunda etapa de extracción de los polifenoles totales del BSG. La relación masa-volumen de la solución alcohólica fue 1:4 (BSG: alcohol (30%); a 50 rpm durante un tiempo de extracción de 60 minutos cada ciclo. (■) Primer ciclo de extracción; (■) Segundo ciclo de extracción.**



Los fenoles contribuyen con aproximadamente 500 mg de AG/L o 25 mg de AG/g de peso seco del BSG, valores similares informó Robertson y colaboradores<sup>23</sup>.

Entonces, las condiciones óptimas de extracción de polifenoles del BSG molido a escala de laboratorio son: un ciclo de extracción a temperatura ambiente y una relación de líquido, con 30% de etanol, masa sólida de 4:1 durante 30 minutos a 50 rpm en un agitador orbital.

Es importante mencionar que los polifenoles del extracto de cebada podrían ser utilizados como buenos antioxidantes naturales en alimentos que contienen lípidos y en jugos que contienen diferentes tipos de pigmentos naturales<sup>24</sup>. Por lo tanto, la optimización del proceso de recuperación de los polifenoles del extracto constituye una línea de investigación que podría ser estudiada en futuros trabajos.

<sup>23</sup> ROBERTSON, J.A.I., ANSON, K.J.A., TREIMO, J., FAULDS, C.B., BROCKLEHURS, T.F., EIJSSINK, V.G.H. y WALDROM, K.W., *ob.cit.*, p.

<sup>24</sup> TAMAGAWA, K., KOBAYASHI, T., IZUKA, T., IKEDA, A., KOIKE, H., NAGUMA, K. y KOMIYAMA, Y., "Antioxidative Activity of Polyphenol Extract from Barley Bran and Its Application to Food", en: *Food Preserv. Sci.*, n° 25, 1999, p. 271-276.

### **Esterilización:**

Una materia prima se convierte en un buen sustrato para el crecimiento de un organismo objetivo, cuando las condiciones son óptimas para promover el crecimiento diferencial de este organismo. Para esto es necesario eliminar cualquier posible competencia de otros microorganismos, así se evalúa el efecto de los diferentes procesos de esterilización del BSG sobre la actividad proteolítica por *B. cereus*.

Después de la extracción de los polifenoles, los residuos húmedos del BSG se recogen y se dividen en dos fracciones. Una se mantiene húmeda (BSG húmedo) y la otra se seca nuevamente a 60° C durante 24-48 horas (BSG seco). Las soluciones utilizadas para la esterilización en autoclave se preparan con 12% p/v de BSG seco en un Medio Mínimo Salino (MMS) y el 36% p/v de BSG húmedo también en un MMS y se esterilizan a 121° C durante 15 minutos. Otros métodos para la esterilización del BSG estudiados son: el uso de 50 mg/L de ketoconazol, un medicamento antifúngico sintético; 20 volúmenes de peróxido de hidrógeno, un agente antimicrobiano, y el empleo de radiación UV durante 2 horas. Después del paso de esterilización, estos medios son homogeneizados. Una alícuota de los homogenatos, equivalente al contenido de proteínas presentes en un MM más leche<sup>25</sup> se utiliza como suplemento del MM con el fin de medir la actividad proteolítica de la fuente de enzima cruda obtenida de la centrifugación, llevada a cabo a 10.000 rpm, durante 10 minutos y a 4° C, del cultivo de *Bacillus cereus* en un MM sin agar. Otras alícuotas se siembran en PCA y se incuban durante 24-48 horas a 32° C, con el fin de enumerar las unidades formadoras de colonias remanentes luego del proceso de esterilización.

---

<sup>25</sup> PEREZ BORLA, O., DAVIDOVICH, L.A., y ROURA, S.I., ob.cit.,p.

La Tabla N° 5 presenta el número de microorganismos que queda después de cada tratamiento y la actividad proteolítica medida por el método de difusión en agar.

**Tabla N° 5. Crecimiento microbiano y actividad proteolítica después de la esterilización del BSG**

<b>Procedimiento de Esterilización</b>	<b>UFC</b>	<b>Diámetro al cuadrado (mm<sup>2</sup>)</b>
BSG húmedo	330 <sup>c</sup>	289.00 <sup>d</sup>
BSG seco	196 <sup>d</sup>	306.2 <sup>d</sup>
BSG húmedo en MMS + autoclave	0 <sup>f</sup>	576.00 <sup>b</sup>
BSG seco en MMS + autoclave	0 <sup>f</sup>	529.00 <sup>c</sup>
BSG húmedo + Ketoconazol	450 <sup>b</sup>	144.00 <sup>g</sup>
BSG seco + Ketoconazol	655 <sup>a</sup>	<100.00
BSG húmedo + 20 vol. de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	108 <sup>e</sup>	256.00 <sup>e</sup>
BSG seco + 20 vol. de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 <sup>f</sup>	196.00 <sup>f</sup>
BSG húmedo + UV (2 horas)	106 <sup>e</sup>	600.25 <sup>a</sup>
BSG seco+ UV (2 horas)	27 <sup>f</sup>	506.25 <sup>c</sup>

A pesar de que las muestras expuestas a los rayos UV muestran una significativa capacidad hidrolítica, la propia microflora no se elimina totalmente. La esterilización en autoclave es el mejor tratamiento para la muerte microbiana. La esterilización térmica es el método más simple y eficaz para la inactivación de esporas<sup>26</sup>. Se observan grandes halos de actividad proteolítica en aquellas muestras autoclavadas, pudiendo esto estar asociado con un efecto beneficioso del tratamiento térmico en la desnaturalización de las proteínas, lo cual no implica pérdida nutricional, ayudando a la actividad proteolítica del *B. cereus*. Comparativamente, la actividad proteolítica en muestras autoclavadas duplica la observada en las muestras sin esterilizar. Se observa una diferencia significativa entre la esterilización del BSG seco y húmedo. El BSG húmedo autoclavado presenta un halo más grande que el BSG esterilizado en seco.

<sup>26</sup> LADO, B.H. y YOUSEF, A.E., "Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms", en: *Microbes and Infect.*, n° 4, 2002, p. 433–440.

*El tratamiento del BSG con ketoconazol no reduce significativamente la carga microbiana. Este resultado es consistente con el efecto previamente presentado en relación a la acción antifúngica de esta droga y a que la microflora natural asociada no esta constituida especialmente por hongos y levaduras. Por otra parte, un efecto inhibidor de la enzima se observa con la presencia de esta droga.*

*Un resultado similar es encontrado después del tratamiento de la muestra con peróxido de hidrógeno: la actividad proteolítica es menor y no todos los microorganismos son destruidos. Otro inconveniente encontrado en el tratamiento con peróxido de hidrógeno es que se requiere seguidamente un procedimiento con catalasa<sup>27</sup> para quitar el exceso de esta sustancia. En ninguno de los casos analizados se observan halos en los controles.*

*Basado en los resultados, la esterilización por autoclave es seleccionada como el pre-tratamiento del BSG en MMS, en condiciones húmedas, después de la extracción de polifenoles.*

---

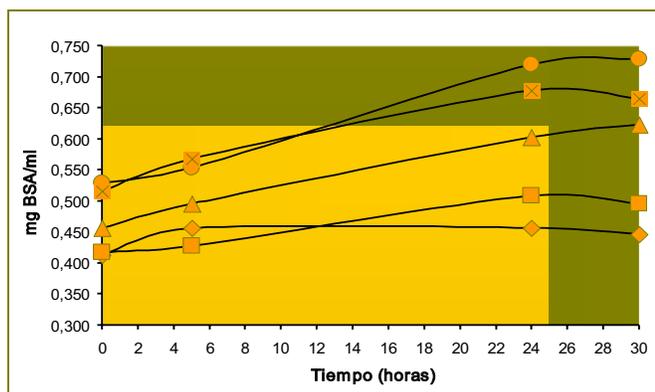
<sup>27</sup> La catalasa es una enzima que se encuentra en organismos vivos y cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en oxígeno y agua.

### Hidrólisis enzimática:

Con los pre-tratamientos anteriormente seleccionados, el BSG se transforma finalmente en el sustrato de fermentación (FS) para la actividad proteolítica del *B. cereus*.

Diferentes fracciones de FS, de un 6, 12, 24, 36 y 48% p/v, en MMS son ensayadas. La Figura N° 8 presenta el perfil de contenido de proteína soluble (CPS) durante la fermentación de *Bacillus cereus*. En primer lugar, un aumento en el CPS se observa a medida que aumenta la concentración del FS durante el período de incubación, alcanzando al 36% p/v de FS el mayor CPS. A mayor concentración de FS, el CPS disminuye. Una mayor concentración de BSG podría tener un efecto en el aumento de la viscosidad del medio lo cual posiblemente conlleva a una limitación en la transferencia de oxígeno para el crecimiento bacteriano, restringiendo entonces la producción de peptidasas por *B. cereus* lo que provoca finalmente una disminución en el CPS.

**Figura N° 8. Efecto de la concentración de BSG sobre el contenido de proteínas solubles. El cultivo fresco en una concentración de 2.5% v/v fue inoculado en el medio de fermentación a 32° C en un agitador orbital a 60 rpm. (♦) 6% (p/v), (■) 12.0% (p/v), (▲) 24.0% (p/v), (●) 36.0% y (X) 48.0% (p/v) del FS en Medio Mínimo Salino.**

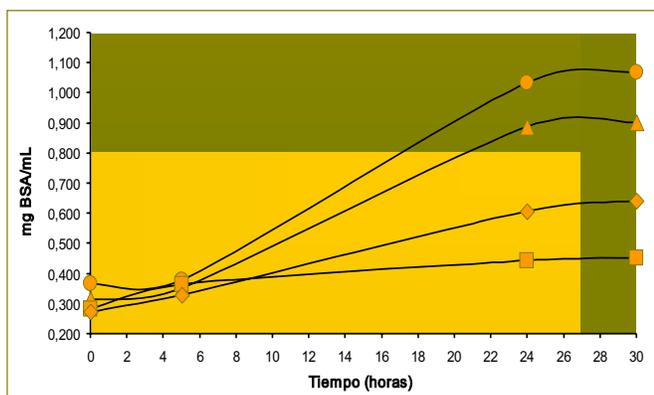


BSA: Albúmina sérica bovina

Con el fin de estudiar el efecto de la fuente de enzimas en la fermentación, se analizan dos tipos de fuentes enzimáticas: extracto de enzima crudo libre de células microbianas y cultivo microbiano fresco. El CPS se mide durante el tiempo de incubación como muestra la Figura N° 9. El mayor CPS se logra mediante la inoculación de un 5% de la enzima cruda, aproximadamente un 20% menos de CPS se encuentra cuando se utiliza la misma concentración de cultivo fresco.

Este hecho confirma la ventaja del uso de enzimas crudas sobre el uso de cultivos microbianos.

**Figura N° 9. Efecto de la fuente de enzima en el contenido de proteínas solubles. La fuente de enzima fue inoculada en el medio de fermentación (36% FS) a 32° C en un agitador orbital a 60 rpm. (▲) 2.5% v/v de enzima cruda, (●) 5% v/v de enzima cruda, (■) 2.5% v/v de cultivo fresco de *B. cereus*, y (◆) 5% v/v de cultivo de *B. cereus*.**



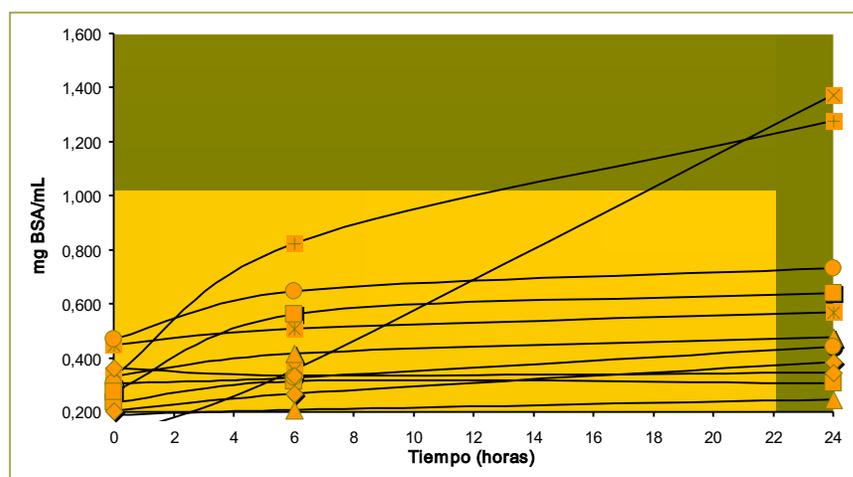
La posible interacción del *Bacillus cereus* con otras cepas proteolíticas microbianas es también evaluada. Un efecto sinérgico notorio se observa cuando se inocula *B. cereus*, ya sea con *Pseudomonas pútida* ó *Pseudomonas no clasificadas*, como se muestra en la Figura N° 10.

La interacción de las cepas de *Bacillus-Pseudomonas* duplica el CPS en relación con el obtenido cuando se emplea un cultivo con *Bacillus* y aumenta en seis órdenes el CPS obtenido por las cepas de *Pseudomonas*. Los resultados presentados sugieren un posible inicio de la hidrólisis proteica del FS por *Bacillus cereus* y que las cepas de *Pseudomonas* completan el proceso de degradación a través de la actividad endopeptidasa.

La actividad del *Enterococcus hirae* (a) solo es capaz también de producir CPS similares a los alcanzados a través de la actividad del *Bacillus cereus*. Sin embargo, la interacción de las dos cepas bacterianas reduce la proteína soluble, lo que indica un posible efecto antagónico entre estas dos cepas.

Dos posibles efectos podrían ser responsables del menor grado de hidrólisis de las proteínas cuando ambas cepas trabajan juntas. Por un lado, una posible competencia por el sitio catalítico y/o la producción de sustancias como bacteriocinas por *E. hirae* que inhiben el crecimiento del *Bacillus cereus*. Algunos datos bibliográficos refuerzan este último hecho. Siragusa<sup>28</sup> describe el aislamiento y la caracterización de una cepa de *E. hirae* que produce una bacteriocina inhibitoria a la *L. monocytogenes* y otras *Listeria spp.* Lasagno y colaboradores<sup>29</sup> reportaron una bacteriocina producida por *Enterococcus hirae* que inhibió el crecimiento de *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringes* y *Staphylococcus aureus*.

**Figura N° 10: Efecto de la inoculación mixta en el contenido de proteínas solubles. Los inóculos fueron preparados a partir de cultivos frescos e incubados en el medio de fermentación, conteniendo 36% p/v, FS a 32° C en un agitador orbital a 60 rpm. (X) 2.5% v/v *B. cereus* + 2.5% v/v *Pseudomonas* no clasificadas, (+) 2.5% v/v *B. cereus* + 2.5% v/v *Pseudomonas pútida*, (●) 5% v/v *Enterococcus hirae* (a), (■) 5% v/v *B. cereus*, (\*) 2.5% v/v *B. cereus* + 2.5% v/v *Enterococcus hirae* (a), (♦) 2.5% v/v *B. cereus* + 2.5% v/v *Enterococcus hirae* (b), (●) 5% v/v *Enterococcus hirae* (b), (▲) 5% v/v *Pseudomonas* no clasificadas, (♦) 5% v/v *Lactococcus lactis subsp. lactis*, (■) 2.5% v/v *B. cereus* + 2.5% v/v *Lactococcus lactis subsp. lactis*, (▲) 2.5% v/v *Pseudomonas pútida*.**



<sup>28</sup> SIRAGUSA, G.R., "Production of bacteriocin inhibitory to *Listeria* species by *Enterococcus hirae*", en: *Appl. Environ. Microbiol.*, n° 58, 1992, p. 3508-3513.

<sup>29</sup> LASSAGNO, M., BEOLEITO, V., SESMA, F., RAYA, R., FONT, G., ERASO, A., "Selection of bacteriocin producer strains of lactic acid bacteria from dietary environment", en: *New Microbiol.*, n° 25, 2002, p. 37-44.

La actividad proteolítica, presentada en la Tabla N° 6, presenta una tendencia similar al CPS, lo que confirma lo expuesto por Chen y colaboradores<sup>30</sup>, quienes sostienen que las peptidasas son inducidas para convertir el BSG en proteínas solubles de manera de apoyar el crecimiento de microorganismos.

**Tabla N° 6. Actividad proteolítica en el medio de fermentación (36% p/v) con un inóculo mixto a 32° C en un agitador rotatorio a 60 rpm.**

Inóculo	Actividad proteolítica (Abs 420 nm) a 24 h.
2.5% v/v <i>B. cereus</i> + 2.5% v/v <i>Pseudomonas</i> no clasificada	0,254 ± 0.027 <sup>a</sup>
2.5% v/v <i>B. cereus</i> + 2.5% v/v <i>Pseudomonas</i> pútida	0,264 ± 0.01 <sup>a</sup>
2.5% v/v <i>B. cereus</i> + 2.5% v/v <i>Enterococcus hirae</i> (a)	0,128 ± 0.005 <sup>c</sup>
2.5% v/v <i>B. cereus</i> + 2.5% v/v <i>Enterococcus hirae</i> (b)	0,125 ± 0.006 <sup>c</sup>
2.5% v/v <i>B. cereus</i> + 2.5% v/v <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	0,098 ± 0.009 <sup>d</sup>
5% v/v <i>Pseudomonas</i> no clasificada	0,102 ± 0.005 <sup>d</sup>
5% v/v <i>Pseudomonas</i> pútida	0,095 ± 0.002 <sup>d</sup>
5% v/v <i>Enterococcus hirae</i> (a)	0,206 ± 0.012 <sup>b</sup>
5% v/v <i>Enterococcus hirae</i> (b)	0,134 ± 0.006 <sup>c</sup>
5% v/v <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	0,121 ± 0.008 <sup>c</sup>
5% v/v <i>B. cereus</i>	0,131 ± 0.009 <sup>c</sup>

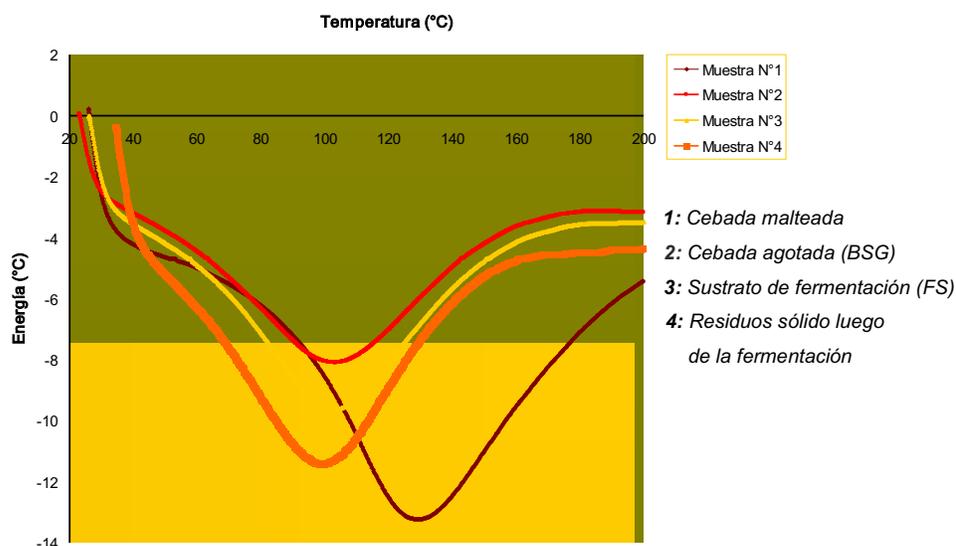
El número marcado con una letra superíndice diferente en la misma columna, significa que existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los demás en un nivel del 5%.

<sup>30</sup> CHEN, Q.H., HE, G.Q. y ALI, M., "Optimization of medium composition for the production of Elastase by *Bacillus* sp. EL3140 with response surface methodology", en: *Enzyme Microb. Technol.*, n° 5, 2002, p. 667-672.

### Caracterización térmica:

Sabiendo que durante la elaboración de la cerveza las proteínas fueron sometidas a altas temperaturas y que esto puede provocar desnaturalización proteica, es decir, pérdida de su estructura tridimensional con la con siguiente alteración de su función celular<sup>31</sup>, se procede entonces, a determinar el grado de desnaturalización de las proteínas del BSG mediante el método de calorimetría diferencial de barrido. El termograma que se presenta en la Figura N° 11, presenta una única endoterma<sup>32</sup> correspondiente a la desnaturalización de las proteínas presentes, indicándonos que éstas no se encuentran totalmente desnaturalizadas probablemente debido a su elevada estabilidad térmica. Las temperaturas de desnaturalización de las muestras analizadas varían entre 100 y 130° C, correspondiendo éstas a las muestras de la fracción insoluble luego de la fermentación y la cebada malteada, respectivamente. Tomando como referencia el valor de 120° C informado por Tintoré y colaboradores<sup>33</sup> como la temperatura de desnaturalización de las hordeínas de la cebada, puede observarse una disminución significativa en la temperatura de desnaturalización del precipitado obtenido luego de la centrifugación del producto de hidrólisis.

Figura N° 11. Termograma



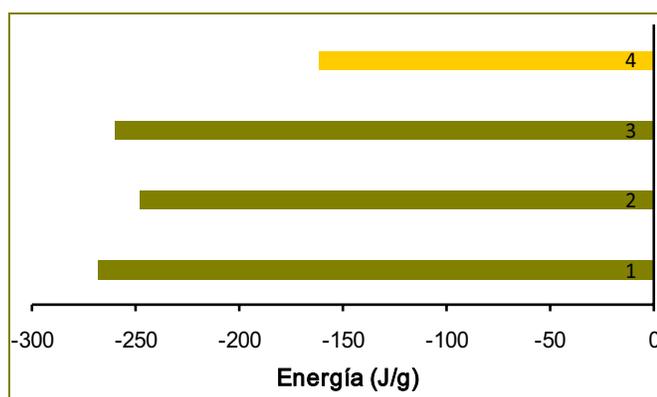
<sup>31</sup> CHEFTEL, Jean-Claude, CUQ, Jean-Louis y LORIENT, Denis, *Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas*; España, Acribia editorial, 1989, p. 1-98.

<sup>32</sup> Pico de absorción de calor representado por el mínimo valor de la curva.

<sup>33</sup> TINTORE, S., AGUIRRE, J., ANCONA, D. y GUERRERO, L., "Extracción y caracterización de las fracciones proteicas solubles del grano de *Phaseolus lunatus* L.", en: *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.54, n° 1, 2004.

La Figura N° 12 muestra que la energía puesta en juego en el proceso de desnaturalización es de -160 J/g para la fracción de sólidos luego de la hidrólisis enzimática y -260 J/g para el sustrato de fermentación. La diferencia de energías entre las muestras antes y después de la hidrólisis enzimática demuestra que hay un aprovechamiento energético de alrededor de 100 J/g en la acción de proteasas de *B. cereus*.

**Figura N° 12. Energía de desnaturalización por gramo de muestra**



- 1: Cebada malteada
- 2: Cebada agotada (BSG)
- 3: Sustrato de fermentación (FS)
- 4: Residuos sólido luego de la fermentación

Se puede concluir entonces, que el hidrolizado proteico obtenido aplicado a un potencial uso en la alimentación humana, generaría un menor gasto energético por parte del organismo durante el proceso de digestión del mismo.

#### **Caracterización molecular de los hidrolizados:**

Uno de los parámetros más importantes para la hidrólisis proteica es la distribución del peso molecular de los péptidos en los hidrolizados. Para esto se emplea una técnica que permite conocer el rango de peso molecular de los mismos. La distribución de tamaños de los péptidos de un hidrolizado puede ser útil para predecir el grado de hidrólisis y la capacidad antigénica del mismo.

En este sentido, el desarrollo de nuevas técnicas capaces de separar y cuantificar los péptidos de  $PM < 1000$  Da puede ser importante, especialmente si el

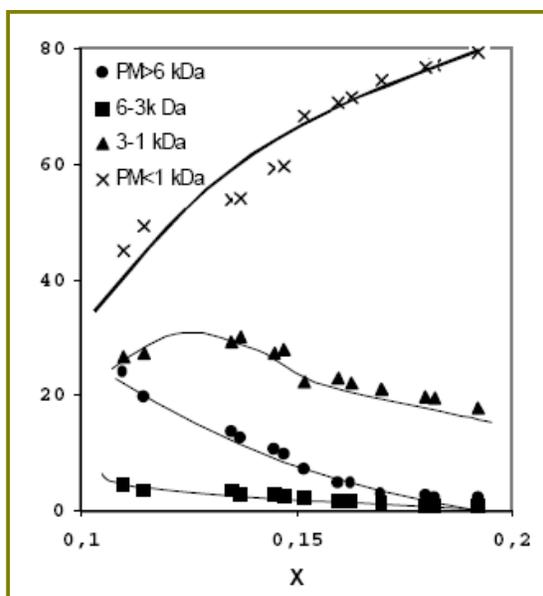
hidrolizado se va a utilizar en la formulación de dietas enterales, en cuyo caso debe estar constituido fundamentalmente por di- y tripéptidos<sup>34</sup>.

A través del proceso de diálisis se determina la distribución de pesos moleculares de los péptidos solubles producto de la hidrólisis enzimática empleando como fuente enzimática cultivos de *B. cereus*, *B. cereus* + *Ps. Pútida* y *B. cereus* + *Ps. not classified*.

Las fracciones que atraviesan las bolsas de diálisis con poros de un tamaño correspondiente a 3500 Da incluyen aminoácidos, péptidos y peptonas solubles. Las que pasan a través de las bolsas con un tamaño de poros entre 3500 y 12000 - 14000 Da incluye proteosas<sup>35</sup> solubles<sup>36</sup>.

Guadix y colaboradores<sup>37</sup> realizaron una caracterización de los hidrolizados de proteínas del lactosuero con proteasas de origen animal, bacteriano y mezclas de ambas. La evolución de las distintas fracciones con el grado de hidrólisis se muestra, en la Figura N° 13 donde el eje "X" corresponde al contenido de proteínas solubles y el "Y" al grado de hidrólisis.

**Figura N° 13. Esquema de referencia para la determinación del Grado de Hidrólisis**



<sup>34</sup> KNIGHTS R.J., Processing and evaluation of the antigenicity of protein hydrolysates. Nutrition for station needs in infance protein hydrolysates; Fina Lisshlpz editorial, 1985, Cap. 8, p.105-115.

<sup>35</sup> Compuestos obtenidos mediante reacciones químicas o enzimáticas. Son derivados secundarios que han sufrido grandes cambios en su estructura y constituyen productos intermedarios de la digestión proteica.

<sup>36</sup> GUADIX, A.; GUADIX, E. M.; PÁEZ-DUEÑAS, M. P.; GONZÁLEZ-TELLO, P. y CAMACHO, F. "Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas", en: Ars Pharmaceutica, n° 41, 2000, p. 79-89.

<sup>37</sup> *ibid*

Tomando como referencia la figura presentada, se determina entonces el grado de hidrólisis de cada una de las muestras retenidas en las bolsas de diálisis.

La Tabla N° 7 presenta la distribución de tamaños y el grado de hidrólisis de las tres muestras. Se observa claramente que la fracción mayoritaria tiene un peso molecular comprendido entre 3,5 y 12-14 KDa; seguida de la fracción con peso molecular inferior a 3,5 KDa y finalmente aquellas fracciones con peso molecular superiores a 12-14 KDa.

En cuanto al grado de hidrólisis se observa que, salvo en el caso de una de las fracciones hidrolizadas por *Bs. cereus* + *Ps. Pútida*, en el resto el mismo es menor al 10% con lo cual, según la clasificación mencionada en el capítulo IV, éstas tendrían mejores propiedades funcionales respecto de la proteína de origen en cuanto a la solubilidad, el poder emulsificante, espumante y la absorción de agua o aceite. Así, los hidrolizados obtenidos podrían ser potencialmente utilizados en la producción de pasteles, pan, helados y postres; en la fabricación de mayonesas, carne picada y salchichas; y en derivados cárnicos y en productos bajos en grasas.

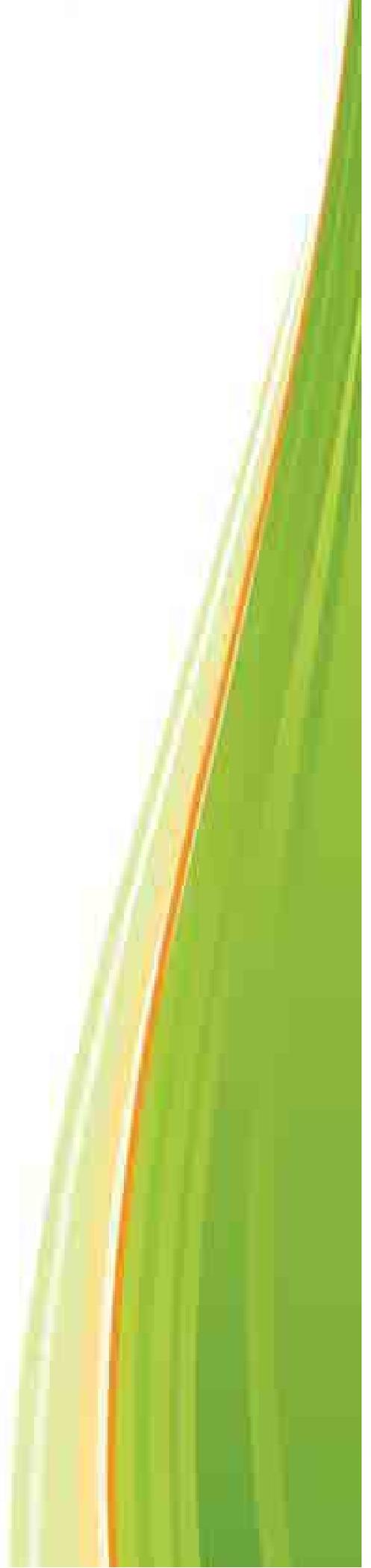
En cuanto a la fracción que da como resultado un grado de hidrólisis de aproximadamente un 20%, la misma podría estar destinada a una alimentación especializada, como suplemento proteico o en dietas médicas para el tratamiento de enfermedades o síndromes específicos.

**Tabla N° 7. Distribución de PM y Grado de hidrólisis**

<b>Peso molecular (KDa)</b>	<b>Proteína soluble (mg BSA/ml)</b>	<b>% Retenido*</b>	<b>Grado de hidrólisis (%)</b>
<b>Bs. cereus</b>			
0 – 3,5	0,327	34.29	<1
3,5 – 12-14	0,559	58.61	<1
> 12-14	0,0676	7.1	aprox. 5
<b>Bs. cereus + Ps. pútida</b>			
0 – 3,5	0,112	9.83	aprox. 4
3,5 – 12-14	0,97	85.16	<1
> 12-14	0,057	5.01	aprox. 20
<b>Bs. cereus + Ps. not classified</b>			
0 – 3,5	0,342	23.52	<1
3,5 – 12-14	0,943	64.85	<1
> 12-14	0,169	11.63	aprox. 7

(\*) El % retenido se obtuvo de la siguiente ecuación:  $\frac{\text{Proteína soluble en un rango de PM}}{\text{Contenido de proteína soluble total}} \times 100$

# ***CONCLUSIONES***



*Con los resultados obtenidos del presente plan de tesis se concluye que la producción de hidrolizados proteicos podría agregar mayor valor al BSG, un subproducto de la producción de cerveza de bajo valor agregado. Esta metodología podría aplicarse a gran escala y extenderse a otros residuos agroindustriales.*

*Este trabajo es una etapa preliminar a fin de encontrar las condiciones óptimas para la preparación del sustrato de partida que permita su futura aplicación en procesos biotecnológicos por su utilidad para aumentar el valor añadido mediante la generación de hidrolizados proteicos con potencial uso en diversas industrias como la agro-alimenticia y la médico-farmacéutica.*

# ***BIBLIOGRAFÍA***



- AGUILERA, J. F, Aprovechamiento de subproductos agroindustriales en la ALIMENTACIÓN de rumiantes, en: <http://www.infogranjas.com.ar/index.php/alimentos/38-general/1467-aprovechamiento-de-subproductos-agroindustriales-en-la-alimentacion-de-rumiantes-.html>
- AMANDUS ALVARADO GILIS, Chistian, Micotoxinas en Nutrición Animal, en: <http://www.monografias.com/trabajos16/micotoxinas/micotoxinas.shtml>
- Alimentación y nutrición, Nutrientes. Bioquímica. Proteínas, en: [http://www.alimentacionynutricion.org/es/index.php?mod=content\\_detail&id=70](http://www.alimentacionynutricion.org/es/index.php?mod=content_detail&id=70)
- Alimentación y nutrición, Sistema digestivo. Digestión y absorción, en: [http://www.alimentacionynutricion.org/es/index.php?mod=content\\_detail&id=49](http://www.alimentacionynutricion.org/es/index.php?mod=content_detail&id=49)
- BELIBASAKIS, N.G. y TSIRGOGIANNI, D., “Effects of wet brewer’s grains on milk yield, milk composition and blood components of dairy cows in hot weather”, en: *Anim. Feed Sci. Technol.*, nº 57, 1996, p. 175- 181.
- BENITEZ, R., IBARZ, A. y PAGAN, J., “Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones”, en: *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, v. 42, nº 2, La Plata, Argentina, 2008, p. 227-36.
- BLANCO, Antonio, Química biológica; Buenos Aires, Argentina, Ateneo editorial, 2002, 7ª edición, p. 19-55.
- BULISANI, Eduardo Antônio; MIYASAKA, Shiro y ALMEIDA, Luiz D’Artagnan de. Observações sobre a adubação foliar em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) - II. *Bragantia* [online]. 1973, vol. 32, n. único ISSN 0006-8705. Similarity: 0.339517.
- CALLEJO GONZALEZ, Ma de Jesús, Industrias de cereales y derivados; Madrid España, Mundi Prensa editorial, 2002, p. 35-42
- CELUS, I., BRIJS, K. y DELCOURD, J.A., “Enzymatic Hydrolysis of Brewers’ Spent Grain Proteins and Technofunctional Properties of the Resulting Hydrolysates”, en: *J. Agric. Food Chem.*, nº 55, 2007, p. 8703–8710.
- CELUS, I., BRIJS, K. y DELCOUR, J.A., “The effect of malting and mashing on barley protein extractability”, en: *J. Cereal Sci.*, nº 44, 2006, p. 203-211.
- Centro Tecnológico AINIA, Congreso Europeo sobre Aprovechamiento de Residuos Agroalimentarios, en: <http://www.ainia.es/html/envios/creatividad/GRUBUP.htm>
- CHEFTEL, Jean-Claude, CUQ, Jean-Louis y LORIENT, Denis, Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas; España, Acribia editorial, 1989, p. 1-98.

- CHEFTEL, Jean-Claude, CHEFTEL, Henri y BESANÇON, Pierre, *Introducción a la Bioquímica y la Tecnología de los Alimentos*; España, Acribia editorial, 1992, 2ª edición, p. 209-217.
- CHEN, Q.H., HE, G.Q. y ALI, M., "Optimization of medium composition for the production of Elastase by *Bacillus* sp. EL3140 with response surface methodology", en: *Enzyme Microb. Technol.*, nº 5, 2002, p. 667-672.
- CLEMENTE, A., "Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition", en: *Food Sc. & Technol.*, nº11, 2002, p. 254-262.
- CRICKENBERGER, R.G. y JOHNSON, B.H., "Effect of feeding wet brewer's grains to beef heifers on wintering performance, serum selenium and reproductive performance", en: *J Anim Sci.* nº54, 1982, p.18-22.
- DONG, N.T.K. y OGLE, R.B., "Effect of brewery waste replacement of concentrate on the performance of local and crossbred Muscovy ducks" en: *Asian-Aust. J Anim Sci.* nº 16, 2003, p. 1510-1517.
- FORSELL, P., KONTKANEN, H., SCHOLS, H.A., HINZ, S., EIJSINK, V.G.H., TREIMO, J., ROBERTSON, J.A., WALDRON, K.W., FAULDS, C.B. y BUCHERT, J., "Hydrolysis of Brewers' Spent Grain by Carbohydrate Degrading Enzymes", en: *J. Inst. Brew.*, nº114, 2008, p. 306-314.
- GUADIX, A.; GUADIX, E. M.; PÁEZ-DUEÑAS, M. P.; GONZÁLEZ-TELLO, P. y CAMACHO, F. "Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas", en: *Ars Pharmaceutica*, nº 41, 2000, p. 79-89.
- GONZALEZ ARGUELLO, José Saul, *Utilización del grano agotado de cervecería y harinas de maíz en la elaboración de extruidos*, en: <http://148.206.53.231/tesiuami/UAM%20LOTE%205/chapingo0058.pdf>
- GONZALEZ-TORRES, Laura, TELLEZ-VALENCIA, Alfredo, SAMPEDRO, José G. y NAJERA, Hugo, *Las proteínas en la nutrición*, en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revsalpubnut/spn-2007/spn072g.pdf>
- HERNANDEZ, A.M., RODRIGUEZ, J.L., LOPEZ, B. y ZEQUERA, O.L., "Caracterización química y funcional del afrecho de malta", en: *Alimentaria*, 1999, p.105-107.
- ISAZA M. José Hipólito, *Taninos o polifenoles vegetales*, en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/849/84903303.pdf>
- JONES, D.B., "Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins", en: *United States Department of Agriculture, circular nº 183*, 1941, p. 8.
- KARP, G., *Biología Celular y Molecular.*; México, Mc Graw Hill Interamericana editorial, 1998, p. 35-56.

- KNIGHTS R.J., *Processing and evaluation of the antigenicity of protein hydrolysates. Nutrition for station needs in infance protein hydrolysates; Fina Lisshlpz editorial, 1985, Cap. 8, p.105-115.*
- KOTLAR, C.E., PONCE, A.G., SANSEVERO, R., y ROURA, S.I., "Characterization of *Bacillus cereus* isolated from fermented cabbage and conventional optimization of extracellular protease production" en: *The Int. J Microb.*, nº 8, 2010, p. 18.
- La desnaturalización de los alimentos, en : <http://www.buenastareas.com/ensayos/La-Desnaturalizaci%C3%B3n-De-Los-Alimentos/1807256.html>
- LADO, B.H. y YOUSEF, A.E., "Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms", en: *Microbes and Infect.*, nº 4, 2002, p. 433-440.
- LASSAGNO, M., BEOLEITO, V., SESMA, F., RAYA, R., FONT, G., ERASO, A., "Selection of bacteriocin producer strains of lactic acid bacteria from dietary environment", en: *New Microbiol.*, nº 25, 2002, p. 37-44.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J., "Protein measurement with the Folin phenol reagent", en: *J. Biol. Chem.*, nº 193, 1951, p. 265-276.
- MILLAN RODRIGUEZ, Francisco, BAUTISTA PALOMAS, Juan, OLIAS JIMENEZ, José Manuel. *Procedimiento de obtención de peptonas vegetales de alto grado de hidrólisis y sus aplicaciones. España, Patentscope, 023170. 04.06.1998.*
- MURDOCK, F.R., HODGSO, A.S., ROBERT, E. y RILEY, J.R., "Nutritive value of wet brewer's grains for lactating dairy cows", en: *J. Dairy Sci.*, nº 64, 1981, p. 1826-1832.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, NRC, *Nutrient Requirements of Warmwater Fishes and Shellfishes. National Academy of Science, Washington, DC, USA. 1983*, en: <http://www.nationalacademies.org/nrc/>
- N. GONÇALVESS, J. VIOQUE, A. CLEMENTE, R. SÁNCHEZ-VIOQUE, J. BAUTISTA y F. MILLÁN, *Obtención y caracterización de aislados proteicos de colza* en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/21867/1/813.pdf>
- O'BRIAN, T.P. y MC CULLY, M.E., "The Study of Plant Structure: Principles and Selected Methods", en: *Termarcarphi Pty., Ltd., 1981.*
- PEDRAZA OLIVERA, Redimio M., MARTÍNEZ SÁEZ, Silvio J., HERNÁNDEZ, Jorge E. y FRANCO GUERRA, Francisco J., *Los taninos en los forrajes y su papel en la nutrición de los rumiantes*, en: <http://www.reduc.edu.cu/147/05/1/14705105.pdf>

- PEREZ BORLA, O., DAVIDOVICH, L.A., y ROURA, S.I., "Isolation and characterization of proteolytic microorganisms from fresh and fermented cabbage", en: *Food Sci. Technol.*, nº 43, 2010, p. 298-301.
- PETERS H.I., FLANNIGAN B., AUSTIN B., "Quantitative and qualitative studies of the microflora of barley malt production", en: *J. Appl. Microbiol.*, nº 65, 1988, p. 279-297.
- PINEDA PEREZ, S., *Soporte nutricional en la atención primaria de salud*, en: [http://bvs.sld.cu/revistas/mgi/vol19\\_3\\_03/mgi03303.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/mgi/vol19_3_03/mgi03303.htm)
- REINOLD, M.R., *Manual práctico de cervecería*; San Pablo, Brasil, Aden editorial, 1997, p. 214.
- ROBERTSON, J.A.I., ANSON, K.J.A., TREIMO, J., FAULDS, C.B., BROCKLEHURST, T.F., EIJSINK, V.G.H. and WALDRUM, K.W., "Profiling brewer's spent grain for composition and microbial ecology at the site of production", en: *Food Sci. Technol.*, nº 43, 2010, p. 890-896.
- SAFARIK, I., HORSKA, K. y SAFARIKOVA, M., "Magnetically modified spent grain for dye removal", en: *J. Cereal Sci.*, nº 53, 2011, p. 78-80.
- SANTOS, M., JIMENEZ, J.J., BARTOLOME, B., GOMEZ-CORDOVES, C. y DEL NOZAL, M.J., "Variability of brewer's spent grain within a brewery", en: *Food Chem.* nº 80, 2003, p. 17-21.
- SCRIMSHAW, N., SQUIBB, R., BRESSANI, R., BEHÁR, M., VITERI, F. y ARROYAVE, G., *Mezclas de proteínas vegetales para la alimentación de niños lactantes y preescolares*, en: <http://bvssan.incap.int/cgi-bin/wxis.exe/iah>
- SHI, J., YU, J., POHORLY, J., YOUNG, J.C., BRYAN, M. y WU, Y., "Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution", en: *Food. Agric. Envir.*, nº 1, 2003, p. 42-47.
- SINEIRO, J., DOMINGUEZ, H., NUÑEZ, M.J. y LEMA, J.M., "Ethanol Extraction of polyphenols in an immersion extractor. Effect of pulsing flow", en: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, nº 73, 1996, 1121-1125.
- SINGLETON, V.L. y ROSSI, J.A., "Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagent" en: *J. Sci. Food Agric.*, nº 10, 1965, p. 144-148.
- SIRAGUSA, G.R., "Production of bacteriocin inhibitory to *Listeria* species by *Enterococcus irae*", en: *Appl. Environ. Microbiol.*, nº 58, 1992, p. 3508-3513.
- TACON, Albert G.J., *Ictiopatología nutricional. Signos morfológicos de la carencia y toxicidad de los nutrientes en los peces cultivados*, en: <http://www.fao.org/DOCREP/003/T0700s/T0700S06.htm#ch6>

- TAMAGAWA, K., KOBAYASHI, T., IZUKA, T., IKEDA, A., KOIKE, H., NAGUMA, K. y KOMIYAMA, Y., "Antioxidative Activity of Polyphenol Extract from Barley Bran and Its Application to Food", en: *Food Preserv. Sci.*, nº 25, 1999, p. 271-276.
- TINTORE, S., AGUIRRE, J., ANCONA, D. y GUERRERO, L., "Extracción y caracterización de las fracciones proteínicas solubles del grano de *Phaseolus lunatus* L.", en: *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.54, nº 1, 2004.
- TOMASO, Juan Carlos, *Cebada cervecera en la Argentina*, en: <http://www.inta.gov.ar/ediciones/ida/cereales/cebada02.pdf>
- VIOQUE Javier y MILLÁN Francisco, *Los hidrolizados proteicos en alimentación: suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional*, en: [http://digital.csic.es/bitstream/10261/5750/1/IG\\_AGROCSIC\\_2.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/5750/1/IG_AGROCSIC_2.pdf)
- VIOQUE, J., CLEMENTE, A., PEDROCHE, J., YUST, M. y MILLAN, F., *Obtención y aplicaciones de hidrolizados proteicos*, en: <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/385/388>
- WINGAD, C.E., IQBAL, M., GRIFFIN, M. y SMITH, F.J., "Separation of hordein proteins from european barley by high-performance liquid chromatography: Its application to the identification of barley cultivars", en: *Chromatographia*, nº 21, 1986, p. 35.

#### Sitios Web consultados

- <http://ar.answers.yahoo.com/question/index?qid=20090507152600AAQtLyi>
- <http://avogadro.bitacorras.com/>
- [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lia/salazar\\_g\\_c/capitulo6.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/salazar_g_c/capitulo6.pdf)
- <http://cyberpediatria.com/marl2.htm>
- <http://comeryvivirmejor.blogspot.com/2010/08/aminoacidos.html>
- <http://diccionario.babylon.com/absorbancia/>
- <http://enciclopedia.us.es/index.php/Vacuola>
- [http://es.encydia.com/ca/C%C3%A1psula\\_de\\_porcelana](http://es.encydia.com/ca/C%C3%A1psula_de_porcelana)
- [http://es.mimi.hu/salud/vitaminas\\_liposolubles.html](http://es.mimi.hu/salud/vitaminas_liposolubles.html)
- <http://es.scribd.com/doc/58144849/11/Definicion-de-granulometria>
- <http://es.scribd.com/doc/4744861/Desviacion-estandar>
- <http://forum.wordreference.com/showthread.php?t=1023092>
- [http://fqep5.galeon.com/Inicio\\_archivos/Anteo.htm](http://fqep5.galeon.com/Inicio_archivos/Anteo.htm)

- <http://laboratorio-clinicopasteur.blogspot.com>
- [http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/higiene-inspeccion-y-control-alimentario/practicas-1/practica-1-tecnicas-utiles-para-el-control/skinless\\_view](http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/higiene-inspeccion-y-control-alimentario/practicas-1/practica-1-tecnicas-utiles-para-el-control/skinless_view)
- <http://ocw.unc.edu.ar/facultad-de-ciencias-quimicas/ciencias-quimicas-2/actividades-y-materiales/capitulo-iii-teorico-6>
- <http://quimica-gris.blogspot.com/>,
- <http://saludbio.com/diccionario/definicion-de/soluci%C3%B3n-salina>
- <http://serviciospro.wanadoo.es/tecmicro/olympus.htm>
- <http://spanish.alibaba.com/products/industrial-grain-grinder.html>
- <http://tplaboratorioquimico.blogspot.com/2008/09/vaso-de-precipitado-o-vaso-de-pp.html>
- <http://waterhouse.ucdavis.edu/phenol/folinmicro>
- <http://www.agualatinoamerica.com/docs/pdf/3-4-02diaz.pdf>
- <http://www.alimentacion-sana.com.ar/informaciones/novedades/alergias%202.htm>
- <http://www.bioingenieria.edu.ar/grupos/geic/cieer07/presentaciones/Est-plasm-Enriquez.PDF>
- <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/cerebcorinfus.htm>
- <http://www.camaracervecera.com.ar/capacidad-anual-de-produccion-de-cerveza.php>
- <http://www.camaracervecera.com.ar/capacidad-anual-de-produccion-de-malta.php>
- <http://www.camaracervecera.com.ar/empresas-que-conforman-la-camara-de-la-industria-cervecera-y-maltera.php>
- <http://www.camaracervecera.com.ar/proceso-de-fabricacion-de-la-cerveza.php>
- <http://www.camaracervecera.com.ar/malta.php>
- <http://www.camaracervecera.com.ar/marcas-de-cerveza-de-produccion-argentina.php>
- <http://www.carlroth.com/catalogue/catalogue.do?act=showBookmark&ID=0&favOid=000000010001813f00010023&CMD=SELECT&lang=en-com&market=COM>
- <http://www.cienytec.com/lab2horno.htm>
- <http://www.definicionabc.com/ciencia/esporas.php>
- <http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/Clase Procariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20Medios%20de%20cultivo.pdf>

- <http://www.ehu.es/biomoleculas/moleculas/dl.htm>
- <http://www.electrolabmedic.com/index.php?secc=producto&idproducto=203>
- [http://www.espatentes.com/pdf/2206516\\_t3.pdf](http://www.espatentes.com/pdf/2206516_t3.pdf)
- <http://www.extintoresmelisam.com.ar/extintores/maquinas.php>
- <http://www.floresdelsureste.org/biologia/ejercicios/proteinas-3/66-proteinas-3-soluciones.html>
- <http://www.greenfacts.org/es/glosario/pqrs/peroxido-hidrogeno.htm>
- <http://www.hierbitas.com/principiosactivos/heterosidos.htm>
- <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2027.pdf>
- <http://www.iaspectra.com/productos.php?id=2>
- <http://www.icsa.es/index.php/Reactivos/Luxol-Fast-Blue/Detailed-product-flyer.html>
- <http://www.ictp.csic.es/fq/equipos.htm>
- <http://www.inta.gov.ar/balcarce/propapa/evalsen/boletin4.htm>
- <http://www.microclar.com/bolsasDM.php>
- <http://www.liberherbarum.com/pn1389.htm>
- <http://www.sks-science.com/laboratory-glassware-p-6326.html>
- [www.tecnologiaslimpias.org/.../313302\\_mp.htm](http://www.tecnologiaslimpias.org/.../313302_mp.htm)
- <http://www.todoexpertos.com/categorias/ciencias-e-ingenieria/bioquimica/respuestas/1263887/pardeamiento-enzimatico>
- <http://www.uniprot.org/taxonomy/4513>
- [http://www.zonytest.com.ar/zonytest\\_ejr.htm](http://www.zonytest.com.ar/zonytest_ejr.htm)
- <http://www.1diccionario.com/buscar/hidroquinona>