



CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

TRABAJO FÍN DE MASTER

CURSO 2014/2015

Alumno: **Ángel L. Gutiérrez de la Fuente**

Tutor: **Manuel Gómez Pallarés**

Cotutor: **Pedro A. Caballero Calvo**

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de los Alimentos

E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera

Universidad de Valladolid

Resumen

Las proteínas son ingredientes ampliamente empleados en la formulación de alimentos, no sólo por su interés nutricional, sino también por las propiedades funcionales que aportan. Actualmente, hay una carencia de estudios sistemáticos sobre propiedades funcionales de las proteínas, que abarquen distintas procedencias. Es por ello que este trabajo se plantea con el ánimo de elaborar una recopilación de datos, sobre funcionalidad alimentaria, de proteínas de diversa naturaleza (cereal, leguminosa, tubérculo, lácteo, huevo, carne), a fin de realizar un análisis comparativo para su caracterización. Con este objetivo, se seleccionó una serie de ensayos para valorar sus atributos sobre propiedades de hidratación (capacidad de captación y retención de agua e hinchado), emulsión (capacidad y estabilidad) y espumado (capacidad y estabilidad) que permitió evaluar la expresión funcional de cada proteína según la medida de carácter que manifestó en el ensayo. Los resultados más destacados fueron los siguientes: las proteínas cárnicas y el aislado de soja mostraron los mejores comportamientos en los ensayos de hidratación. Por su parte, las proteínas de guisante se caracterizaron por su versatilidad y grado de emulsión y las proteínas de patata exhibieron una alta capacidad de espumado. El nivel de expresión funcional mostrado por algunas proteínas aquí evaluadas parecen justificar su incorporación en matrices alimentarias adecuadas para su necesidad tecnológica.

Abstract

Proteins are ingredients used in the formulation of foods, not only for their nutritional value, but also the functional properties they provide. Nowadays, there is a lack of systematic studies on functional properties of proteins, encompassing different origins. That is why this paper is proposed with the aim of developing a data collection on food functionality of proteins from various sources (cereal, legume, tuber, milk, egg, meat) and carry out a comparative analysis for characterization. Hence, a series of tests were selected to assess their properties on hydration (water holding capacity, water binding capacity and swelling volume), emulsion (capacity and stability) and foaming (capacity and stability) so their functionality level were tested. Meat proteins and soy isolate showed the best performance in the hydration tests. Pea proteins exhibited versatility and a good degree on emulsion. Potato proteins revealed a high foaming capacity. The functionality of some evaluated proteins appears to justify their addition onto adequate food systems for their technological need.

Índice:

1. Introducción.....	1
2. Materiales y métodos.....	6
3. Resultados y discusión.....	10
4. Conclusiones.....	25
5. Agradecimientos.....	26
6. Bibliografía.....	26

Abreviaturas utilizadas:

Acrónimos	Ensayos:
WHC	Capacidad de retención de agua
SV	Aumento de volumen o hinchado
WBC	Capacidad de captación de agua
EC	Capacidad emulgente
ES	Estabilidad de la emulsión
FC	Capacidad de espumado
FS	Estabilidad de la espuma

Acrónimos	Proteínas
C1015/SF	Cerdo Scanpro 1015/SF
CT95	Cerdo Scanpro T95
MPI	Aislado de leche
WPI	Aislado de suero
CC	Caseína de cuajo
CS	Caseinato de sodio
OVA	Clara de huevo
ISOY	Aislado de soja
TexSoy	Texturizada de soja
GuiTR	Guisante suministrado por Trades
GuiF85G	Guisante de Nutralys F85G
GuiF85F	Guisante de Nutralys F85F
GuiS85F	Guisante de Nutralys S85F
GNWH	Gluten hidrolizado Nutralys W
Glutex	Texturizado de proteína de trigo
ProAr	Proteína de Arroz
Pat206P	Patata Solanic 206P
Pat306P	Patata Solanic 306P

1. Introducción

Las proteínas son polímeros de gran complejidad. Estos compuestos pueden estar formados por hasta 21 aminoácidos diferentes. Su tamaño, composición y forma de unión de estos aminoácidos proporcionan a las proteínas su capacidad de desempeñar una gran variedad de funciones biológicas de gran importancia. El nombre de la proteína deriva del griego proteois, que significa de primera clase (Damodaran, 2008).

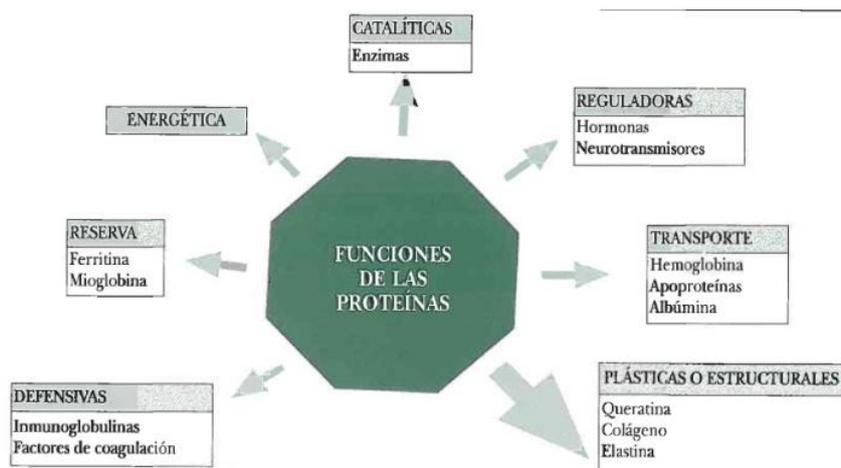


Figura 1. Funciones de las proteínas (Verdú, 2015)

La estructura básica de los aminoácidos que componen las proteínas está integrada por un carbono alfa ligado a un átomo de hidrógeno, un grupo amino, un grupo carboxilo y una cadena lateral llamada grupo R. La existencia del grupo R es la que principalmente proporciona a la proteína sus propiedades fisicoquímicas, así como determina el grado o número de puentes de hidrógeno y la reactividad (Pesko and Ringe, 2004), ya que según estas cadenas laterales y su interacción con el agua, los aminoácidos pueden ser hidrófobos o hidrófilos. (Damodaran, 2008).

La unión de varios aminoácidos mediante enlaces covalentes, da lugar a un ordenamiento secuencial que es considerado como la estructura primaria de la proteína. Esta secuencia, es la base del carácter único que poseerá la proteína en términos de disposición de estructura final y de características funcionales (Kristo y col., 2015). Tras este ordenamiento, la proteína se organiza según fuerzas electrostáticas, mediante puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y enlaces dipolo-dipolo para establecer uno de los dos tipos de estructura secundaria: α hélice o lámina β (Badui, 2006). El plegado de esta estructura a una forma tridimensional compacta, estable y con un valor mínimo de energía libre, conforma el diseño típico de

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

proteína globular (caseína, lisozima, mioglobina) o fibrosa (keratina, colágeno o fibrina) (Belitz y col., 2009) que abunda en los sistemas biológicos. Aunque no habitualmente, una proteína puede estar formada por varias estructuras o monómeros asociados de forma no covalente, conformando la estructura cuaternaria, que se da por ejemplo en proteínas vegetales de cereales y de la soja y en animales, como la β -lactoglobulina presente en la leche. (Damodaran, 2008).

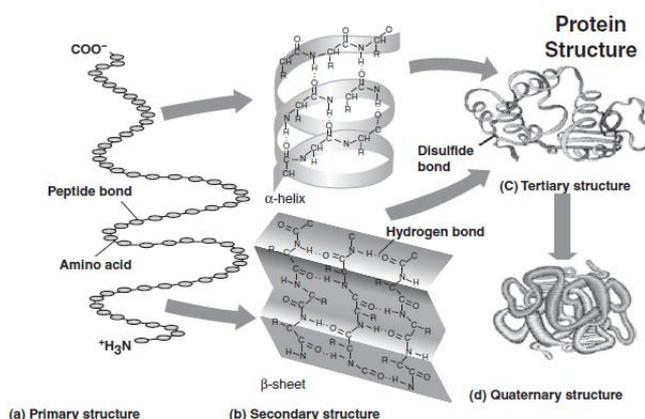


Figura 2. Los cuatro niveles de estructura proteica. (Ustunol, 2015)

El conocimiento de la estructura de las diferentes proteínas es de relevancia en cuanto que supone otro factor que establece las propiedades fisicoquímicas de la proteína, incluyendo la carga superficial o la capacidad hidrofóbica, la estabilidad al calor y a los químicos, la flexibilidad molecular y el comportamiento disociativo. (Culbertson, 2006).

Orígenes y fuentes proteicas

En la naturaleza, las proteínas están presentes y participan de forma activa en multitud de procesos biológicos, las más comunes se presentan con su origen respectivo en la siguiente tabla:

Tabla 1: Orígenes y ejemplos de las proteínas más frecuentes

Fuente	Proteínas alimentarias comunes
Animal	Proteínas musculares, proteínas sanguíneas, del tejido conectivo, proteínas lácteas, proteínas del huevo
Vegetal	Cereales: trigo, maíz, cebada, avena, arroz; Leguminosas: soja, guisante, garbanzo, lenteja; Tubérculos: patata; Semillas oleaginosas: Colza, cacahuete
Macro algas	Algas verdes y verde-azules: Spirulina, Anabaena, Nostoc, Ulva, Enteromorpha
Microorganismos	Hongos: micoproteínas

Adaptado de Phillips y col. (2011)

Nutricionalmente, la ingesta de proteínas es importante, ya que la toma de 9 aminoácidos que el ser humano no puede generar es esencial para su normal

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

funcionamiento, además supone una fuente de nitrógeno importante para la reconstrucción y desarrollo de tejidos corporales y llega a ser en ciertos momentos una fuente energética a través de la gluconeogénesis, proceso por el que un gramo de proteína libera 4 Kcal.

Funcionalidad de las proteínas en los complejos alimentarios.

Las propiedades funcionales de las proteínas son aquellas propiedades físico-químicas que proporcionan a un sistema alimentario o ingrediente, determinadas características sensoriales o de comportamiento físico durante su preparación, almacenamiento o consumo (Cheftel y col., 1989)

Las propiedades funcionales no son sólo dependientes de las características intrínsecas de las proteínas (secuencia de aminoácidos, tamaño y forma molecular, relación hidrofobicidad/hidrofilicidad) sino también de las condiciones a las que se exponen para su procesado, tratamiento de conservación e interacción con otros componentes (agua, aceite, sales, hidratos de carbono,..) (Kristo y col., 2015). En la siguiente tabla se muestran algunas de las propiedades funcionales de las proteínas, junto a su mecanismo predominante de actuación en algunas matrices alimentarias de inclusión.

Tabla 2: Ejemplos de funcionalidades tecnológicas de las proteínas y alimentos típicos dónde se incorporan.

Funcionalidad	Mecanismo	Alimento	Tipo de proteína
Solubilidad	Hidrofilicidad	Bebidas	Suero
Viscosidad	Captación de agua, tamaño y forma hidrodinámica	Sopas, salsas, aderezos para ensaladas, postres	gelatina
Hidratación	Puentes de hidrógeno, hidratación iónica	Salchichas de carne, pasteles y panes	Proteínas musculares, de huevo
Gelificación	Inmovilización de agua, formación de red	Carnes, geles, horneados, pasteles y queso	Proteínas musculares, de huevo y lácteas
Cohesión-Adhesión	Enlaces iónicos e hidrófobos y puentes de hidrógeno	Carnes, embutidos, pastas, productos horneados	Proteínas musculares, de huevo y de suero
Elasticidad	Enlaces hidrófobos y puentes de disulfuro	Carnes, horneados	Proteínas musculares y de cereales
Emulsión	Adsorción y formación de películas en interfase	Salchichas, mortadela, sopa, pasteles, aderezos,	Proteínas musculares, de huevo y lácteas
Espumado	Adsorción en la interfase y formación de películas	Crema batida, helados, pasteles y postres	Proteínas de huevo y lácteas
Retención de grasa y sabor-olor	Enlaces hidrófobos y fenómenos de retención	Donuts y horneados bajos en grasa	Proteínas de huevo, lácteas y de cereales

Adaptado de Kinsella y col. (1985).

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

Muchas de las propiedades funcionales de las proteínas, como la solubilidad, hinchado, retención de agua, viscosidad, gelificación, emulsión o espumado dependen de las interacciones agua-proteína (Damodaran, 2008). El fenómeno de hidratación se encuentra relacionado con el tipo y número de aminoácidos de su secuencia (los aminoácidos polares con carga neta tienen mayor poder de hidratación que los polares sin carga y éstos a su vez que los no polares). La capacidad de hidratación se mantiene incluso en medios donde los aminoácidos polares tienen menor capacidad, es decir, cuando coincide el pH de medio con el punto isoeléctrico proteico, pues los grupos no polares interactúan con el agua mediante un proceso llamado hidratación hidrofóbica (Wijeratne, 2005). Las propiedades de hidratación se encuentran muy vinculadas a su vez, con la solubilidad (Were y col., 1997).

Entre las propiedades de hidratación de las proteínas, destaca la capacidad de retención de agua o Water Holding Capacity (WHC), definida como la capacidad de la proteína deshidratada para absorber agua contra la fuerza de gravedad. En este proceso de hidratación, la proteína adsorberá y fijará moléculas de agua en las zonas polares, la capa adsorbida incrementará de tamaño (adsorción multicapa), y se producirá un hinchamiento y una solvatación o dispersión (Chou y Morr, 1979). La capacidad de hinchamiento se determina a través de un parámetro denominado Swelling Volume (SV). Otro dato importante de hidratación, es la capacidad de retención de agua de una matriz proteica cuando es sometida a una fuerza de centrifugación, designado como Water Binding Capacity (WBC).

La naturaleza anfifílica confiere a las proteínas de propiedades surfactantes, ya que son capaces de formar una emulsión o de generar una espuma debido a su disposición a emigrar espontáneamente a una interfase aceite-agua o aire-agua respectivamente. Las proteínas una vez agregadas, se despliegan y forman un film viscoelástico para mantener en mayor o menor medida la emulsión o la espuma generada.

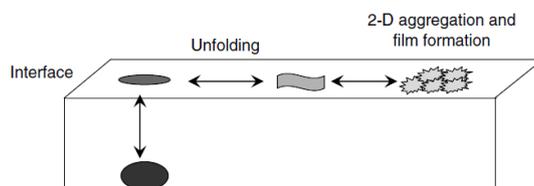


Figura 3. Ilustración esquemática de procesos moleculares que concurren a la formación de películas proteicas en interfase (Damodaran, 2008).

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

Estas propiedades superficiales de las proteínas, no sólo requieren de un grado de hidratación y solubilización elevado (Chandi y Sogi, 2007), sino que dependen también del patrón de distribución de dominios o zonas proteicas con prevalencia hidrófila e hidrófoba. Éstas últimas son las responsables de “anclar” la proteína a la interfase. Por tanto, se considera que el número de segmentos hidrófobos como la fuerza de interacción que tengan para sujetarse a la interfase, serán los elementos más importantes para formar y mantener una emulsión o una espuma. Este número de anclajes será a su vez dependiente de la capacidad de despliegue que tenga la proteína, ya que al distenderse aparecerán nuevas zonas hidrófobas. La estabilidad dependerá de la facultad que tenga la proteína desplegada a formar agregados entre sí para conformar una película viscoelástica y fuerte. (Damodaran, 2008). La medida de funcionalidad de una proteína sobre su comportamiento en interfases, se recoge a través de los parámetros de capacidad y estabilidad de emulsión (Emulsion Capacity – EC y Emulsion Stability –ES, respectivamente) y de capacidad y estabilidad espumante (Foam Capacity –FC y Foam Stability –FS).

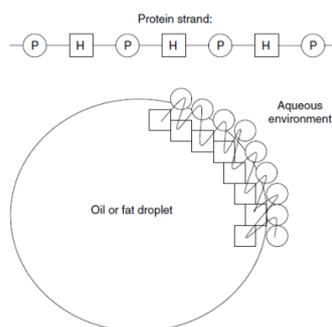


Figura 4: Representación de la formación de una emulsión estable, dónde los segmentos cuadrados de la proteínas se “anclan” en el glóbulo de grasa (o burbuja de aire) son hidrófobos y los segmentos circulares son hidrófilos. (Culbertson, 2006)

Objetivo final del estudio:

Existe una carencia de estudios comparativos sobre las características funcionales de proteínas alimentarias de diversos orígenes. Con el desarrollo de este estudio, se pretende la elaboración de un análisis de caracterización funcional básica (hidratación, emulsión y espumado) sobre una serie de proteínas de distinta procedencia. Asimismo, se persigue destacar sus diferencias cuantitativas y cualitativas que poseen al respecto de las mencionadas propiedades funcionales. Este estudio se completa con el análisis de distribución de tamaño de partícula de las proteínas, $D[4,3]$ y con el estudio de la microestructura de las mismas, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales

Las proteínas, según sus orígenes, que se han empleado en este estudio son:

Tabla 3. Proteínas utilizadas en el ensayo

Fuente proteica	Proteína	% proteína	Proveedor	Observaciones
Cárnica (Cerdo)	Scanpro 1015/SF	82-90%	BHJ Protein Foods (Grasten, Dinamarca)	Contenido en colágeno 60-75%
Cárnica (Cerdo)	Scanpro T95	94-98%	BHJ Protein Foods (Grasten, Dinamarca)	Contenido en colágeno 70-75%
Láctea	Leche atomizada	90%	Glanbia Nutritionals, Kilkenny, Irlanda	
Láctea	Suero	90%	Glanbia Nutritionals, Kilkenny, Irlanda	
Láctea	Caseína de cuajo	88-91%	DairyGold, County Cork, Irlanda	
Láctea	Caseinato de sodio	88%	Grupo Plimon SL, Barcelona, España	
Huevo	Proteína de clara de huevo	80%	EPS S.p.A., Occhiobello, Italia	
Vegetal (Guisante)	Proteína de guisante	80%	Trades S.A., Barcelona, España	
Vegetal (Guisante)	Nutralys F85G	85%	Roquette, Lestrem, Francia	F:Carácter emulgente G: Tamaño partícula grueso.
Vegetal (Guisante)	Nutralys F85F	85%	Roquette, Lestrem, Francia	F:Carácter emulgente F: Tamaño partícula fino.
Vegetal (Guisante)	Nutralys S85F	85%	Roquette, Lestrem, Francia	S:Carácter soluble F: Tamaño partícula fino.
Vegetal (Soja)	Soja	90%	Provedora Hispano Holandesa, S.A., Barcelona, España	
Vegetal (Soja)	Proteína de soja	50%	Trades S.A., Barcelona, España	Proteína texturizada
Vegetal (Gluten)	Nutralys W	82%	Roquette, Lestrem, Francia	Gluten de trigo hidrolizado
Vegetal (Gluten)	Glutex	80%	Kroner Starke, Ibbenbüren, Alemania	Proteína de trigo texturizado
Vegetal (arroz)	Remypro N80+	79%	Remy Industries, Leuven-Wijgmaal, Bélgica	
Vegetal (Patata)	Solanic 206P	90%	Avebe, Veendam, Países Bajos	
Vegetal (Patata)	Solanic 306P	90%	Avebe, Veendam, Países Bajos	

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

También se utilizó un detergente químico, dodecil sulfato sódico (SDS) (Panreac AppliChem, Darmstadt, Germany), para los ensayos de emulsión, por su habilidad para la desnaturalización de proteínas.

2.2 Métodos

2.2.1 Ensayos de hidratación

Se realizaron dos ensayos de hidratación. Los parámetros WHC Y SV, capacidad de retención de agua y volumen de hinchamiento respectivamente, se obtuvieron según la metodología empleada por de la Hera y col. (2013). Las medidas WHC y SV definidas como el porcentaje de agua retenida por la muestra proteica sin ser sometida a ningún tipo de estrés y el aumento de volumen de la muestra debido a esa retención siguieron por tanto, este desarrollo: primeramente se realizó una pesada de 5 g ($\pm 0,01$ g) de cada proteína en báscula (Cobos precisión, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona), sobre probeta graduada de 250 ml. En el caso de las proteínas de gluten de trigo hidrolizado, Glutex y la de texturizada de soja, TexSoy, debido a su grueso tamaño de partícula, fueron pasadas a través de un molino (3303 Perten Instruments, Hägersten, Suecia) y por un tamiz de malla de 180 micras para reducir su volumen y usar un polvo granulado con un tamaño equivalente a la harina. Se recogió el dato de volumen que ocupa esos 5 g de muestra en la probeta. Seguidamente se procedió a verter 100 ml de agua destilada y se dejó en reposo 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se apuntó la medida de volumen de la muestra hidratada. Tras ello se retiró el sobrenadante y se efectuó una pesada de la proteína hidratada. Los parámetros recogidos WHC y SV se calcularon de la siguiente manera:

$$\text{Ecuación 1: } SV \text{ (ml/g)} = \frac{\text{Volumen a las 24 h.} - \text{Volumen inicial}}{\text{Peso}}$$

$$\text{Ecuación 2: } WHC \text{ (\%)} = \frac{\text{Volumen a las 24 horas}}{\text{Volumen inicial}} \times 100$$

En cuanto a la determinación de la capacidad de captación de agua (WBC) se obtuvo un dato adimensional (gramos de agua retenidos por gramo de proteína –ga/gp), a partir de la siguiente sistemática (56.30 AACC, 2012): se introdujeron 5 g ($\pm 0,01$ g) de cada proteína en tubos falcon. Se añadieron 25 g de agua destilada, tras homogeneización con varilla de vidrio, se realizó una agitación previa manual de 5 minutos. Tras ello se introdujeron los tubos en centrifugadora (Bunsen Koch 1460,

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

Madrid, España) durante 10 minutos a 2000 rpm. Finalizado este proceso se extrajo el sobrenadante y se realizó una pesada del tubo para comprobar la diferencia de peso inicial con la del tubo tras las agitaciones, obteniéndose el dato de agua captada de la siguiente manera.

Ecuación 3:

$$WBC (ga/gp) = \frac{\text{Peso tubo con precipitado} - (\text{Peso tubo vacío} + \text{Peso inicial proteína})}{\text{Peso inicial proteína}}$$

2.2.2 Ensayos de emulsión

Para los ensayos de emulsión, la prueba se basó en el método desarrollado por Pearce y Kinsella (1978) de medida de turbidez y estableciendo diferencias de absorbancias. El desarrollo en laboratorio del método fue de la siguiente manera: cada muestra de proteína es pesada (0,5 g ± 0,01 g) en báscula de precisión (Gram Precision, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona) y trasladada a un matraz para enrasar con agua destilada hasta los 100 ml. 6 ml de la mezcla se vierten a tubo Falcon junto con 2 ml de aceite de girasol. La muestra pasó después por un homogeneizador Ultra Turrax T25 (IKA, Staufen, Germany) a 22000 rpm durante 1 minuto. Aparte, se preparó la solución que se utilizó como blanco: 0,1% de un detergente químico, dodecil sulfato de sodio (SDS) en agua destilada. En el espectrofotómetro usado (20 Genesys, Spectronic Unicam, Houston, United States), se estableció una longitud de onda de 500 nm. Tras fijar el blanco, se preparó el analito a medir: 50 µl de la muestra homogeneizada junto con 5 ml de la solución previamente formada de SDS. Se realizaron medidas de absorbancia por duplicado de cada alícuota de muestra cada 10 minutos durante 1 hora. A partir de este ensayo se obtienen dos parámetros: La capacidad de emulsión (Emulsifying Capacity –EC), definida como la máxima capacidad de aceite emulsionada por una cantidad dada de proteína y la estabilidad de la emulsión (Emulsifying Stability -ES) definida como la aptitud de la proteína para mantener la emulsión durante un periodo de tiempo (1 hora).

Ecuación 4: EC (nm): Absorbancia a tiempo cero.

Ecuación 5: ES (nm): Absorbancia a tiempo cero – Absorbancia tras 60 minutos.

2.2.3 Ensayos de propiedades espumantes

En el ensayo realizado para conocer las propiedades espumantes, se utilizó el método de Lin y col (1974) y la ejecución fue la siguiente: se preparó una suspensión de un 3% de proteína en 200 ml de agua destilada en un vaso de precipitados. Tras agitación en batidora (Agitamagic, Barcelona, España) a 100 rpm durante 10 minutos, el conjunto se trasladó a una mezcladora (KitchenAid Artisan, st. Joseph, Michigan, EEUU) donde se sometió primeramente a una agitación a mínima potencia durante 1 minuto y tras ello, a una agitación fuerte (máxima potencia) durante 5 minutos. Después, la mezcla fue vertida a una probeta graduada de 2 l de capacidad (Z324418 Brand Blaubrand, Sigma-Aldrich, st. Louis, EEUU o 1634BB Kavalierglass, Sázava, República Checa). Se tomaron medidas de volúmenes totales y de la espuma a los intervalos de 1 y 120 minutos, y a nivel de observaciones, a los minutos 10, 30 y 60. Los parámetros que se recogieron fueron los siguientes: Capacidad espumante (Foam Capacity –FC), en forma de volumen de espuma inicial (tras un minuto) generado en proporción al volumen total y estabilidad de la espuma, como porcentaje de la espuma remanente tras 120 minutos en proporción a la espuma generada inicialmente.

Ecuación 6:

$$FC (\%) = \frac{\text{Volumen espuma inicial}}{\text{Volumen total}} \times 100$$

Ecuación 7:

$$FS (\%) = \frac{\text{Volumen espuma tras 120 minutos}}{\text{Volumen espuma inicial}} \times 100$$

2.2.4 Determinación de tamaño de partícula

Mediante la técnica de difracción laser, se obtuvo la variable D[4,3] como media del diámetro del volumen equivalente, lo que indica el punto central de la distribución del volumen de las partículas. El instrumento que permitió este análisis es el Mastersizer 3000 de los laboratorios Malvern Instruments (Instrumentación Específica de Materiales S.A, Madrid).

2.2.5 Microestructura de las proteínas

Se tomaron fotografías de las partículas sobre cada muestra de proteína mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido (SEM). Estas microfotografías fueron tomadas con el equipo Quanta 200FEI (Hillsboro, Oregón, EE.UU.). Las microfotografías fueron obtenidas en modo de detección de electrones secundarios, lo cual permite observar la morfología y el relieve de las superficies, a 1,5 KeV en modo alto vacío con un detector de electrones retrodispersados (BSED).

2.2.6 Análisis Estadístico

Los valores fueron sometidos a un análisis unidimensional de varianza para determinar el efecto del origen de la proteína sobre sus propiedades fisicoquímicas. Se utiliza el test de Fisher para describir diferencias significativas de las medias de los valores obtenidos en los experimentos, con un 95% de confianza. Además se realizó un análisis de las posibles correlaciones de todos los parámetros. El software para el diseño del experimento que se usó fue el Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies Inc, Warrenton, USA).

3. Resultados y discusión

3.1 Análisis de la microestructura de las proteínas

La configuración superficial es uno de los aspectos junto a tamaño y características físico-químicas que contribuyen al comportamiento funcional de una proteína. (Damodaran, 2008). En la figura 5 se muestra la configuración estructural de la superficie de algunas de las proteínas utilizadas en este estudio. Las formas globulares exhibidas por las partículas procedentes del aislado de leche (MPI), de suero lácteo (WPI), de la clara de huevo (OVA) y de la patata (Pat306P), contrastan con las conformaciones irregulares que presentan el caseinato de cuajo (CC), la proteína cárnica de cerdo (CT95), el arroz (ProAr) y el gluten de trigo hidrolizado (GNW) y en menor medida la de guisante (GuiF85F). Cabe destacar la alta presencia de estructuras porosas en varias de esas proteínas (GNW, CT95, Pat306P), diferentes a la estructura lisa que tiene el caseinato de cuajo. Estos poros incrementan el tamaño superficial de las partículas, aumentando la probabilidad de contacto y captación por exposición de posibles grupos hidrófilos de moléculas de agua.

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

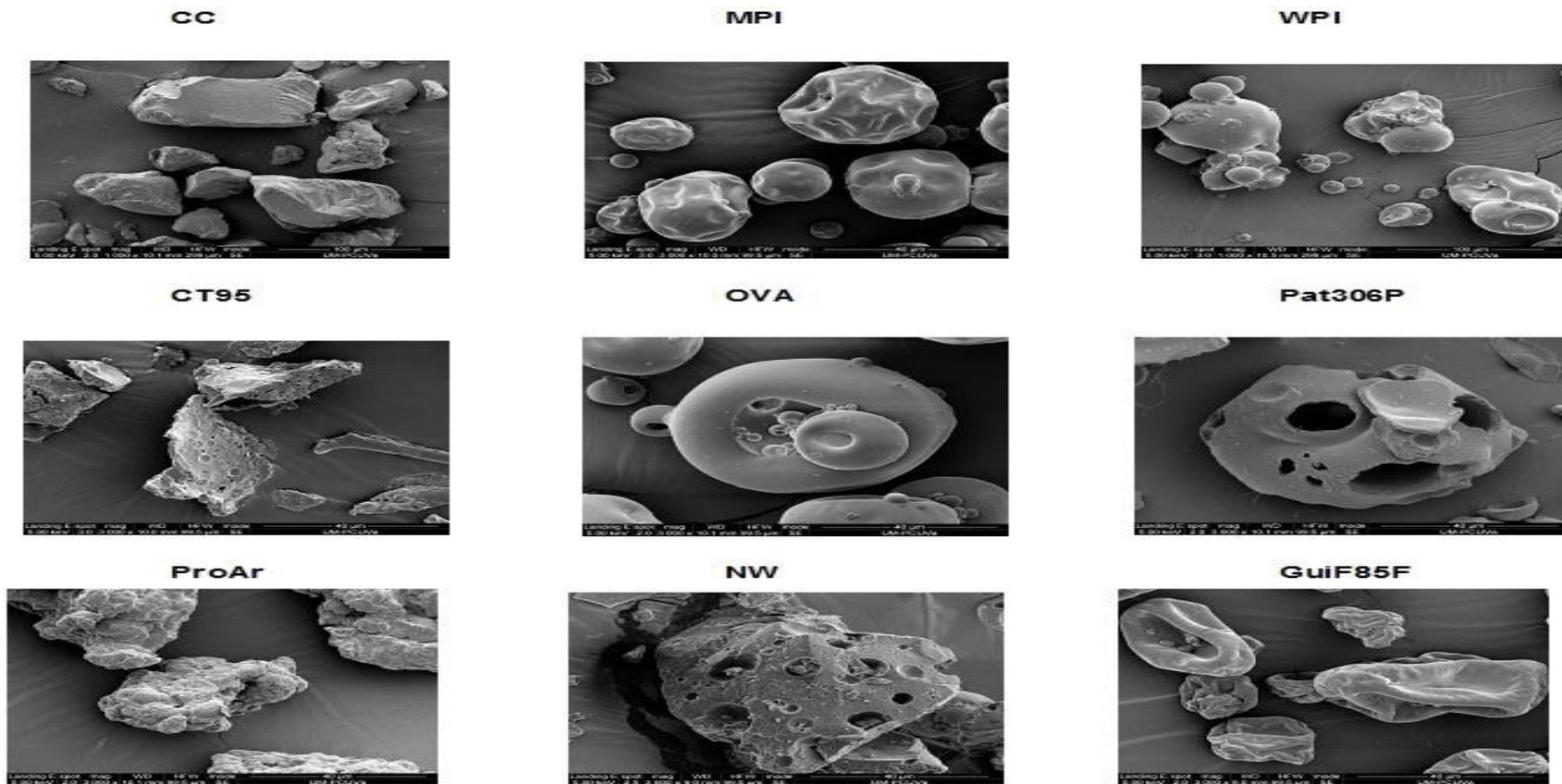


Figura 5. Microfotografías tomadas por el microscopio electrónico de barrido sobre los gránulos de diversas proteínas. CC Caseína de cuajo, MPI aislado de proteína de leche, WPI aislado de suero lácteo, CT95 proteína cárnica de cerdo, OVA proteína de clara de huevo, Pat306P proteína de patata, ProAr Proteína de arroz, NW Gluten de trigo hidrolizado, GuiF85F proteína de guisante.

3.2 Tamaño de partícula

El tamaño de partícula en las proteínas es uno de los factores ligados a la funcionalidad tecnológica de las proteínas (Damodaran, 2008). Se trata de una de las propiedades de caracterización que han sido de utilidad en estudios anteriores, como por ejemplo para destacar las ventajas de la microparticulación de las proteínas de suero lácteo (Dissanayake, 2011). Los resultados obtenidos en el ensayo están reflejados en la tabla 4. Las proteínas texturizadas, de soja (TexSoy) y de trigo (Glutex), mostraron el mayor tamaño de partícula, con valores de 1270 μm y de 563 μm respectivamente. Tras ellos se presentó la proteína de guisante GuiF85G (373 μm). Las proteínas con menor tamaño de partícula fueron las de gluten de trigo hidrolizado (GNW) con 9,39 μm y el aislado de proteína de suero (WPI) con 16,8 μm . En la tabla 6 se observa también que el tamaño de partícula posee una cierta correlación negativa con el parámetro de capacidad espumante.

Tabla 4. Tamaños de las partículas proteicas.

Proteína	D[4,3] (μm)
Texturizada de soja	1270
Texturizado de proteína de trigo	563
Guisante F85G	373
Cerdo Scanpro 1015/SF	294
Caseína de cuajo	216
Proteína de arroz	130
Proteína de guisante	127
Guisante S85F	113
Guisante F85F	105
Aislado de soja	101
Caseinato de sodio	87,1
Cerdo Scanpro T95	79,5
Clara de huevo	67,9
Patata 306P	67,1
Patata 206P	59,3
Aislado de leche	54,2
Aislado de suero	16,8
Gluten hidrolizado W	9,39

3.3 Hidratación

Los resultados de los parámetros de hidratación WHC, SV y WBC están expresados en la tabla 5. Las dos proteínas cárnicas evaluadas, C1015/SF y CT95, ofrecieron los

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

mayores valores de las variables de hidratación. En el ensayo WHC, ambas proteínas configuran un grupo homogéneo sin diferencias significativas ($p < 0,05$). Sin embargo, no ocurre así en los ensayos de SV y de WBC dónde CT95 ofrece valores significativamente más grandes que 1015/SF aunque están presentes en grupos homogéneos próximos. Según las fichas técnicas (BHJ), una gran fracción de proteína está compuesta por colágeno (60-75% en C1015/SF y 70-75% en CT95). El colágeno proviene de una familia de proteínas insolubles, aunque esta condición se puede modificar mediante las técnicas de extracción, por ejemplo mediante la extrusión, deshidratación, secado y molienda se ha conseguido un granulado cárnico capaz de captar hasta 4 veces su peso en agua (Prabhu, 2002). El tratamiento mecánico y térmico dado a estas dos proteínas por el fabricante, especificado en ficha técnica, parece confirmar su utilidad como agente hidratante. El tamaño de los poros internos es de importancia. Observaciones de autores (Zayas, 1997) determinaron que a menor tamaño del poro y distribución uniforme, mejor es su parámetro WHC. El aspecto de la partícula proteica CT95, parece indicar la presencia de pequeños poros distribuidos a lo largo de su superficie, por lo que podría ser un factor que incidiese en su valor de capacidad de retención de agua.

Tabla 5. Propiedades de hidratación, emulsión y espumado de las proteínas.

Proteína	WBC (ga/gp)	SV (ml/g)	WHC (%)	FC (%)	FS (%)	EC (nm)	ES (nm)
Cerdo Scanpro T95	4,824l	12,300j	514,286k	37,442c	81,667ef	0,369bc	0,075 ab
Cerdo Scanpro 1015/SF	4,086k	10,090hi	520,833k	0,000a	0,000a	0,234ab	0,152 ab
Aislado de leche	4,803l	2,198c	157,895de	72,578g	65,625d	0,311b	0,162 ab
Aislado de suero	0,000a	0,000a	0,000a	17,708b	0,000 a	0,679de	0,295b
Clara de huevo	0,000a	0,000a	89,286bc	56,655ef	72,078de	0,370bc	0,267b
Proteína de guisante	3,519h	4,950f	325,000h	58,846f	12,727ab	0,452bcd	0,085 ab
Caseína de cuajo	1,572d	1,200b	175,000e	22,773b	0,000 a	0,337bc	0,139 ab
Proteína de arroz	2,171f	2,298c	215,000f	0,000a	0,000 a	0,036a	0,011a
Gluten hidrolizado W	0,286b	0,599ab	128,636d	87,204h	4,902 a	0,231ab	0,062ab
Guisante S85F	3,713hi	7,992g	433,333ij	52,102de	21,667bc	0,806ef	0,259b
Guisante F85F	4,032jk	9,199h	453,846j	47,285d	26,989c	0,828ef	-0,016a
Guisante F85G	3,783ij	7,400g	408,333i	54,344ef	23,111bc	0,983f	0,286b
Aislado de soja	4,866l	10,542i	470,690j	23,311b	0,000 a	0,842ef	0,096 ab
Patata 206P	0,000a	0,799ab	126,667cd	100,000i	87,167f	0,428bcd	0,115 ab
Patata 306P	0,000a	0,000a	71,429b	100,000i	80,556ef	0,594cde	0,198 ab
Caseinato de sodio	0,719c	0,799ab	140,000de	90,533h	0,000 a	0,459bcd	0,258b
Texturizado de proteína de trigo	1,893e	3,097ce	272,222g				
Texturizada de soja	3,204g	3,992e	322,222h				

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

WHC: Capacidad de retención de agua, SV: Hinchado, WBC: Capacidad de captación de agua. EC: Capacidad emulgente, ES: Estabilidad de la emulsión, FC: Capacidad espumante, FS: Estabilidad de la espuma. Los valores con diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes entre sí (LSD, $p < 0.05$). Unidades: ga/gp (gramos de agua por gramo de proteína).

El posible contenido de proteína miofibrilar de estos granulados, también contribuye a sus características de hidratación, ya que los aminoácidos de las proteínas miofibrilares (actina y miosina principalmente) poseen cadenas laterales con cargas positivas y negativas que les confieren un alto poder de retención y captación de agua. La alta concentración de aminoácidos polares de la miosina (por sus residuos o cadenas laterales de los ácidos glutámico y aspártico) contribuye en gran medida al parámetro de capacidad de captación de agua (WBC) (Zayas, 1997)

La muestra ISOY, de proteína de aislado de soja, obtuvo el mayor resultado en el parámetro WBC, y se mantuvo con una valoración elevada en el resto de parámetros. La elevada concentración proteica presente en el aislado de soja es un factor diferencial en cuanto a capacidad de absorción de agua (Hansen, 1978). Entre las utilidades funcionales propuestas por el fabricante se encuentra su adición en salmueras para mejorar rendimiento y textura en productos como el jamón (PHH). En el estudio de Wagner y col (1990) se observó un incremento en la capacidad adsorbente de un aislado de soja cuando se encontraba en pequeñas concentraciones de cloruro sódico, por lo que su uso en la fabricación de productos cárnicos cocidos es muy extendido [Freixanet]

Las proteínas de guisante (GuiTR, GuiF85G, GuiF85F, GuiS85F) obtuvieron valores inferiores a los anteriores. Estudios previos (Naczki y col, 1986) coinciden con los expuestos en este estudio en cuanto a la capacidad de hidratación de un aislado de guisante es menor que la del concentrado y el aislado de soja pero superior que el gluten. Según el fabricante (Nutralys), el tratamiento dado a los guisantes asegura una concentración proteínica entre el 85-90% y un alto nivel de funcionalidad (solubilidad y emulsión) para la incorporación en carnes y pescados. Ya se ha visto como cambios estructurales que sufren las moléculas proteicas del guisante durante el procesado pueden incrementar la cantidad de emplazamientos polares capaces de interactuar con el agua (Zayas, 1997). Se ha comprobado también la relación directa que posee el parámetro de retención de agua (WHC) con la concentración de proteína de guisante (Sosulski y col, 1987), por lo que el uso de aislados es más eficaz para obtener mejores resultados en los parámetros de hidratación.

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

Las proteínas procedentes de cereales (Glutex y GNW) obtuvieron en general valores poco destacables. Las proteínas del gluten, cuando se hidratan convenientemente, forman un gel fuerte y gomoso. Estas proteínas, insolubles en agua, se asocian entre ellas mediante enlaces covalentes y no covalentes que derivan en la creación de una masa cohesiva y viscoelástica. La capacidad que tiene el gluten para absorber y retener el agua proporciona mayores rendimientos y vida útil a los alimentos en los que se incorpora (Day, 2011). Algunos tipos de tratamientos pueden ser aplicados para aumentar la solubilidad a este tipo de proteína, como así presenta el estudio de Mannigat y col. (1994), en el que un tratamiento ácido mejora las propiedades de solubilidad e hidratación. El fabricante Nutralys, somete al gluten a un tratamiento enzimático para conseguir incrementar su solubilidad y reducir sus cualidades viscoelásticas, en objeto de incorporarlo a alimentos como lácteos, comidas preparadas o cereales sin modificar la reología de estos productos. Este tipo de procesados se obtiene mediante el uso de proteasas como papaína, bromelina, subtilisina, tripsina y pronasa para romper los enlaces peptídicos y reducir el número de moléculas de alto peso molecular (principalmente gluteninas) (Juhász y col., 2015). La apariencia porosa que exhibe esta proteína (Figura 5) pudiera ser un indicador del cierto carácter soluble exhibido en los ensayos.

El fabricante del producto texturizado de proteína de trigo (Glutex) no destaca las propiedades hidratantes en su ficha técnica (Kröner), señalando un uso como análogo de carne para ayudar a generar una estructura y textura al producto final, como por ejemplo, en los sustitutos de carne para vegetarianos.

Los ensayos de hidratación que se realizaron sobre el producto ProAr (proteína de arroz) obtuvieron una valoración intermedio en los parámetros a estudio. Como se ve en la tabla 5 el valor de SV no presenta diferencias estadísticamente significativas con "MPI" ni con Glutex, aunque los valores del resto de parámetros si presentan marcadas diferencias con el resto de proteínas ($P < 0,05$). Según el fabricante (Remy), esta proteína se destaca su carácter insoluble. Esta propiedad ha sido detectada anteriormente en el estudio de Agboola y col (2006). Sus autores lo relacionan con la gran cantidad de puentes disulfuro y por el elevado peso molecular que posee la proteína.

En cuanto a los productos lácteos ricos en caseína (MPI, CC, CS), se apreció un alto valor en la muestra MPI en WBC, equivalente a CT95 e ISOY. El resto de valores de estas proteínas en los parámetros a ensayo mostraron una escasa aunque advertible

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

actividad hidratante, situándose muy próximos en sus valores e incluso conformando un grupo homogéneo en el parámetro WHC.

Se conoce que las caseínas nativas (presentes en gran concentración en el producto MPI) tienen un alto grado de asociación con las moléculas de agua (solvatación), llegando a captar alrededor de 4 gramos de agua por gramo de proteína (Farkye y col., 2015). Su alta solubilidad mostrada predispone funcionalmente su uso en bebidas o su incorporación a productos lácteos frescos, como indica el fabricante en su ficha técnica. Los bajos valores obtenidos por las proteínas de caseína de cuajo y caseinato de sodio pueden ser explicados debido a la relación existente entre estos parámetros y la solubilidad, propiedad que a su vez está relacionada con el pH isoelectrico. Este pH, siendo cercano al del agua destilada (próximo a 7) confiere una limitada solubilidad (O'Kennedy, 2011) y podría ser la razón del bajo valor en los parámetros de hidratación a estas proteínas en las condiciones empleados en el ensayo.

A raíz de la explicación anterior, la muestra de proteína de suero WPI, mostró una solubilidad completa. Farkye y col (2015) indicó que esta solubilidad se manifiesta incluso en su punto isoelectrico y en los ensayos realizados, se tradujo en una dispersión completa de la proteína en agua y no advirtiéndose muestra sólida alguna medible en peso o volumen.

En los ensayos realizados sobre la proteína de clara de huevo (OVA) se obtuvo un valor de cero para WBC y SV, aunque sí se consiguió cierto valor en WHC, equivalente a la muestra de patata (Pat306P). Como en el caso anterior, se percibió una alta solubilidad en los tratamientos dados para la medida de los parámetros de hidratación, lo que imposibilitó la medida en las condiciones de ensayo propuestas. Similar comportamiento se percibió para las proteínas de patata (Pat206P y Pat306P), ya que al igual que en el huevo se observó una gran solubilidad, lo que se tradujo en unos resultados para las variables de hidratación equivalentes con el huevo. Además cabe destacar el gran tamaño de poro exhibido en la superficie de la proteína Pat306P, que como ya se ha explicado, podría estar vinculado a la solubilidad.

La proteína texturizada de soja (TexSoy) mostró unas condiciones de hidratación análogos a la proteína de guisante guiTR. En el ensayo de SV se observó que presentaba las mismas condiciones que la proteína texturizada de gluten (Glutex). En este tipo de producto ya se ha observado como posee una capacidad de absorción de agua de entre 2,5 y 3 veces su propio peso (Riaz, 2011).

En la tabla 6, se encuentran descritos los resultados sobre las correlaciones entre las variables. Los parámetros de hidratación (WHC, WBC y SV) medidos dieron lugar a una correlación positiva fuerte ($p < 0,05$).

3.4 Propiedades emulsionantes de las proteínas

Como se ha expuesto anteriormente, las proteínas tienen la capacidad de formar y estabilizar la emulsión gracias a que su molécula posee elementos hidrófobos e hidrófilos. Esta capacidad es dependiente no sólo del tipo de proteína (la mayor proporción de grupos hidrófobos sobre hidrófilos en la superficie de la conformación proteica, siendo una proteína soluble, crea una sustancia con mejores aptitudes emulsionantes según Nakai y col., 1996) sino también del tamaño del glóbulo de aceite (menor tamaño del glóbulo de aceite y mayor área de interfase que puede ser recubierta por la proteína según el estudio de Ivey y col., 1970), de la temperatura, del pH o de la concentración de proteína (Wang y col., 1976). Por ello en los ensayos efectuados la única variante será el tipo de proteína usada y el resto de condiciones se mantendrán constantes. La estabilidad de la emulsión así mismo también es una propiedad de cada proteína, ya que dependiendo del tiempo aparecerán sucesos como la floculación y coalescencia (Becher, 1965) que dan lugar a la separación de las fases agua-aceite creando una solución menos turbida, lo que se traduce en menores valores de absorbancia.

Por las características del ensayo de emulsión no se pudieron realizar los estudios de caracterización para las proteínas de soja y gluten texturizado, ya que su escasa solubilidad unida a su gran tamaño de partícula comprometió una preparación eficaz de la muestra en las condiciones normalizadas del experimento

En la tabla 5, se muestran los valores de capacidad emulgente (EC). Los valores registrados para las proteínas de guisante (GuiF85G, GuiF85F, GuiS85F) fueron los más altos observados en el ensayo, conformando un grupo homogéneo sin diferencias significativas entre ellas. Estas proteínas GuiF85G y GuiF85F son presentadas por el fabricante como específicas para realizar funciones emulsionantes. Este comportamiento contrasta con la escasa estabilidad observada en la proteína GuiF85F, considerando además que el resto de proteínas (GuiF85G y GuiS85F) manifestaron unos valores altos de estabilidad emulgente en los ensayos. La otra proteína de

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

guisante a estudio (GuiTR), presentó un comportamiento intermedio dentro del rango general de valoración.

Valores pobres de estabilidad frente a altos de capacidad emulgente ya se han expuesto en otros estudios (Makri y col., 2006). La explicación dada por estos autores sobre la aparición de relación inversa de los parámetros EC y ES viene a indicar que es más fácil mantener la estabilidad de una emulsión si ésta no se ha formado en buenas condiciones.

Las propiedades emulsionantes naturales de las proteínas de guisante, pueden ser modificadas mediante los tratamientos dados en la obtención del aislado, sometiéndolas a modificaciones que afecten las propiedades superficiales de este tipo de proteína (Arntfield, 2011). Las modificaciones de estas propiedades también se consiguen utilizando las variedades genéticas que presenten mayor capacidad como agentes emulgentes, por ejemplo seleccionando las que presenten mayor contenido de proteína vicilina, presente en la fracción globulina, y disminuyendo la fracción de albúmina. (Cserhalmi y col., 1998).

El aislado proteico de soja (ISOY) mostró una alta capacidad emulgente, en el mismo grupo homogéneo de las proteínas de guisante de Nutralys, pero no se observó una alta estabilidad de emulsión, obteniendo un valor en un rango intermedio. Esta alta capacidad emulgente se ha observado anteriormente en el estudio de Lee y col., (2002). Otros estudios se encaminaron a incrementar el parámetro ES: mezclando la proteína de soja con proteína de suero, una goma vegetal (*Trigonella foenum-graecum*) y un tratamiento térmico sobre este conjugado antes de la emulsión (Kasran y col 2013) proporcionaron un resultado positivo.

En cuanto a las proteínas lácteas, WPI mostró un notable comportamiento en el parámetro de EC (sin diferencia significativa con GuiS85F) y presentó el mayor valor de estabilidad de todas las proteínas a estudio. Una considerable efectividad como emulgente del WPI a bajas concentraciones (0,5%), ya se ha mostrado anteriormente (Boland, 2011). El autor relaciona esta alta actividad emulgente con la alta concentración de β -lactoglobulina que se presenta en el suero (58%). Su alto valor emulgente frente a otras fracciones de la proteína del suero lácteo ha sido ya previamente constatado (Kim y col., 1987)

Los resultados del resto de proteínas lácteas manifestaron un comportamiento homogéneo en los dos parámetros que eluden a sus propiedades emulsionantes,

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

aunque sus valores no fueron de los más destacables, manteniéndose en un perfil intermedio dentro del rango de proteínas analizadas. La actividad emulsionante de estas proteínas tiene que ver con las fracciones mayoritarias presentes en las caseínas: α_{s1} -caseína (35% en la leche y β -caseína (26%), aunque en el estudio de Dickinson (2003), la capacidad y estabilidad emulgente se concretó sobre los péptidos de β -caseína. La capacidad de flexibilidad conformacional, que tiene la caseína es conocida (Damodaran, 2008) y adquiere su importancia para las emulsiones (y el espumado), ya que rápidamente es capaz de variar su estructura terciaria para orientar sus cadenas laterales hidrófilas hacia la fase acuosa y las hidrófobas hacia la fase aceite (O'Kennedy, 2011)

El uso como emulgente del caseinato de sodio es extendido debido a que se considera un agente emulgente muy eficiente por su balanceado contenido de aminoácidos hidrófobos e hidrófilos (O'Kennedy, 2011) y por su pequeño tamaño de partícula (alrededor de las 84 μm).

Los valores de las variables CE y CS, de los aislados proteicos de patata (Pat206P y Pat306P), se presentaron en un rango intermedio de valores dentro de las proteínas analizadas, permaneciendo ambas en el mismo grupo homogéneo que el caseinato de sodio. La capacidad emulgente y estabilizante de estas proteínas es proporcionada por una fracción de reducido peso molecular conocido como inhibidores de proteasas, ya que proporcionan estabilidad a la emulsión evitando el cremado (Van Koningsveld y col., 2006)

La proteína de clara de huevo (OVA) mostró uno de los valores más altos en el parámetro ES, sólo por detrás de las muestras de WPI y de GuiF85G. En cambio la capacidad de emulsión que presentó en ese ensayo se caracterizó por unos valores intermedios, semejantes a la proteína de carne CT95 y a CC. En el estudio de Kato y col., (1986) se encontró que la superficie hidrofóbica y la flexibilidad de esta proteína eran mayormente las responsables de las propiedades emulgentes.

Los valores de capacidad y estabilidad emulgente (EC y ES) de las dos proteínas cárnicas se incluyen en un rango de valores intermedios. Ambas proteínas contienen una gran proporción de colágeno. Siendo muy limitado el colágeno nativo, su solubilidad en agua o en salmuera, no se puede desestimar que el fabricante haya realizado una hidrólisis parcial del mismo para incrementar su solubilidad y su capacidad de retención de agua, propiedades indispensables para efectuar emulsiones y poder incorporarse a salmueras en productos cárnicos cocidos, como

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

indica el fabricante en sus recomendaciones de empleo uso. El uso o incorporación de fracciones proteicas miofibrilares de la carne adquiere su importancia funcional en emulsiones ya que son solubles en medio salino. (Sikorski, 2001)

Las proteínas del gluten, debido a la baja solubilidad en agua, poseen pobres propiedades emulsionantes. En los ensayos realizados de EC y ES para la muestra GNW se observa cierta actividad y estabilidad emulsionante, aunque los valores medidos son bajos. Como indica el fabricante este producto de base gluten ha sido tratado enzimáticamente para mejorar su solubilidad y disminuir su viscoelasticidad. Mediante la ruptura enzimática de los enlaces peptídicos se reduce el tamaño de las cadenas polipeptídicas, provocando un efecto al gluten similar a la desaminación química, aumentando en cierta manera sus propiedades emulsionantes y espumantes (Day, 2011).

La proteína de arroz (ProAr) mostró los valores más bajos de CE y ES de las proteínas a estudio. La información dada por el fabricante es que se trata de un producto eminentemente insoluble en agua. La dependencia entre las propiedades de emulsión y la solubilidad se ha visto en otras proteínas anteriormente descritas, (Pirincoli, 2010) y es una práctica habitual por los fabricantes el efectuar tratamientos sobre la proteína para mejorar una solubilidad que permita proporcionar otras características funcionales.

Las pruebas realizadas para caracterizar las proteínas a objeto de este estudio mostraron una falta de correlación entre la capacidad emulgente y la estabilidad frente a la emulsión (tabla 6).

3.5 Propiedades espumantes

La determinación de las proteínas de soja texturizada y de gluten texturizado no se han podido realizar debido a la falta de muestra para realizar el experimento.

En la tabla 5 se revela que las proteínas de patata (206P y 306P) obtuvieron las mejores valoraciones de los parámetros de capacidad y estabilidad espumante (FC y FS) (junto a la proteína cárnica CT95), formando ambas un grupo homogéneo sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Las razones para estos valores podrían deberse a una de las fracciones proteicas de la patata, la patatina. Estudios previos han mostrado un escaso poder espumante a pH neutro, pero sí una elevada estabilidad fue mostrada, aminorando el efecto de drenado (Van Konningsveld y col.,

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

2002), que es un efecto típico de desestabilización de la espuma (Wagner, 2000). También se han observado propiedades de formación y estabilización de espuma de la patatina superiores a los de la clara de huevo (Ralet y col., 2001). En el estudio de Partsia y col. (2001) se comprobó una gran capacidad y estabilidad espumante en un aislado de proteína de patata. Este efecto se relacionó con la presencia de pequeñas fracciones proteicas de pequeño peso molecular, cuyos grupos sulfidrilos en el proceso de espumado son oxidados, permitiendo la posible formación de puentes disulfuro intermoleculares y por ende la asociación entre sí de moléculas proteicas para formar agregados de gran tamaño. Esta modificación molecular permite la creación de una película viscoelástica, minimiza la carga superficial e incrementa la capacidad de absorción de agua. Estudios sobre aplicaciones térmicas para aumentar las propiedades espumantes se han llevado a cabo con resultados positivos (Van Koningsveld y col., 2002). El tratamiento de calor induce a un despliegue de la proteína antes de la formación de espuma.

Los resultados de los parámetros FC y FS para las proteínas lácteas son muy variables. Tanto el aislado de proteína de leche (MPI) como el caseinato de sodio (CS) mostraron altas capacidades espumantes, aunque sólo el aislado de proteína de leche mostró buenas condiciones de estabilidad, con valores equiparables a la proteína de clara de huevo (OVA). El resto de proteínas lácteas, aislado de suero (WPI) y caseína de cuajo (CC), mostraron menores capacidades de generación y estabilidad de espuma, llegando la capa de espuma formada, a desaparecer a la hora del inicio del ensayo (WPI) o a la finalización del mismo (CC). En la muestra CS su desintegración fue a gran velocidad, contrastando con la gran cantidad de espuma creada, pero debido a esa escasa estabilidad más de un 95% desapareció a los 10 minutos.

Estudios anteriores (Huppertz, 2010) han mostrado la destacable capacidad de formación y estabilidad de la espuma producidas por las proteínas de origen lácteo, sobre todo si no hay presencia de lípidos o ésta es limitada, como en los aislados proteicos, pues los fosfolípidos interfieren en la formación de espuma.

En las muestras proteicas de base caseína (CC y CS), los cambios fisicoquímicos y conformacionales sufridos en los tratamientos, afectan a las propiedades funcionales (Damodaran, 1994): Todas las fracciones proteicas de las caseínas, excepto las K-caseínas, poseen una fuerte tendencia a adsorberse en la interfase aire-agua. La poca estabilidad de una espuma en ensayos con caseinato de sodio se ha encontrado en el estudio de Martínez-Padilla y col (2013), donde se analizó las propiedades

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

espumantes de una leche desnatada fortificada con distintas clases de proteínas lácteas. En ese experimento se observó como en la muestra que contenía caseinato de sodio, disminuyó la estabilidad de la espuma, apareciendo efectos de drenaje y colapso de burbujas en mayor medida. Además se destacó una gran formación de espuma. Aun así este efecto de desestabilización no se ha hallado en otros estudios (Carrera Sánchez y col, 2004).

La caseína de cuajo, cuya composición es diferente debido a la transformación enzimática de K-caseína a para-k-caseína y la presencia de fosfato de calcio coloidal (O'Kennedy y col., 2011) mostró escaso valor de FC y rápida desaparición de la espuma. Estudios como el de Roman and Sgarbieri (2006) compararon varios productos de caseína, denotando como la caseína de cuajo obtuvo los valores más bajos de emulsión y no logró formación de espuma en las condiciones del ensayo.

La proteína de aislado de suero (WPI) fue la que peor valor de formación de espuma obtuvo, denotando condiciones de inestabilidad debido a la desaparición de la espuma tras 60 minutos en las condiciones de ensayo. Los estudios sobre la capacidad y estabilidad de una espuma mediante las proteínas de suero contrastan con los resultados aquí obtenidos, pues si que han visto buena capacidad para formar y mantener espumas, sobre todo tras un tratamiento de calor (Nicolai y col., 2011). El fabricante del producto WPI describe que su producto contiene proteínas desnaturalizadas. La desnaturalización de proteínas de suero mediante hidrólisis enzimática se ha mostrado efectiva para un incremento de volumen de formación de espuma, sin embargo a los 60 minutos prácticamente desapareció (Sinha et al., 2007). En dicho estudio se postuló la idea de que el incremento inicial en el contenido polipeptídico causado por la hidrólisis, permitió que más aire fuera incorporado. Sin embargo esos polipéptidos carecieron de la fuerza requerida para proporcionar espumas estables.

La proteína de clara de huevo (OVA), obtuvo un valor destacable en FC, aunque significativamente distinto que el grupo formado por las proteínas de patata y de caseinato de sodio ($p < 0,05$). Sin embargo, obtuvo para el parámetro FS uno de los mejores valores, análogo al conseguido por la proteína de patata, Pat306P. En el mecanismo de formación y estabilización de espuma mediante una proteína de clara de huevo, la fracción de glicoproteína es de crucial importancia, ya que se compone de glúcidos, de naturaleza hidrófila, que se adhieren a la fase acuosa, incrementando la viscosidad, reduciendo el drenaje y contribuyendo a la estabilidad de la espuma,

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

formando una película estable y viscoelástica en la interfase (Mine, 2002). También cabe tener presente que este producto ha sido tratado térmicamente (pasteurización). En estudios anteriores, se ha visto cómo este efecto es responsable de incrementar los tiempos de batido para obtener un volumen de espuma semejante al conseguido por una misma proteína no pasteurizada (Lomakima y Mikov., 2006). La causa dada por el autor es la desnaturalización de la red formada por la ovomucina y la lisozima.

En los ensayos efectuados sobre las proteínas de guisante, se puede destacar el valor obtenido en FC por GuiTR, que forma un grupo homogéneo junto a la proteína de clara de huevo. No se percibieron valores sobresalientes en el resto de proteínas de este origen. En el ensayo de estabilidad de emulsión (FS) estas proteínas exhibieron los menores valores (junto a la proteína de gluten de trigo hidrolizado, GNW) de las proteínas vegetales, exceptuando las de patata. Las técnicas de obtención de este tipo de productos podrían afectar a las propiedades espumantes, por ejemplo si se producen pérdidas de la fracción proteica soluble (albúmina), ya que en el estudio de Sathe y col. (1981) se apreció una capacidad espumante de las albúminas de judías semejante a la proporcionada por una clara de huevo.

En el caso de la proteína de gluten de trigo hidrolizado (GNW), destacó su valor de capacidad de generación de espuma (FC), sin diferencia significativa con el caseinato de sodio ($p < 0,05$). Contrasta igual que aquella por su bajo valor de estabilidad (a la hora hubo una desaparición de más de un 60% y a las dos horas de más de un 90%). Como se ha descrito anteriormente en lo referente a la emulsión para este producto, la desaminación del gluten mediante hidrólisis enzimática incrementa la solubilidad de esta proteína, cambiando la estructura conformacional e incrementando la carga superficial, con lo se potencian sus propiedades emulsionantes y espumantes Arntfield y col (2011).

De las proteínas cárnicas evaluadas, sólo CT95 exhibió un cierto valor en los parámetros FC y FS. El valor mostrado de capacidad espumante permitió a esta proteína, presentarse en una posición más destacada que el grupo homogéneo conformado por WPI, CC e ISOY. Así mismo fue considerable su valor de estabilidad espumante, llegando a ser equiparable al obtenido por la proteína de patata.

El aislado de soja (ISOY), exhibió un bajo valor en capacidad espumante (FC) y presentó un valor nulo en FS (en el minuto 60 no se apreció espuma). Un evento similar se recogió en el estudio de Martínez y col (2009), dónde esta proteína se utilizó como agente tensioactivo superficial para obtener una espuma reduciendo la tensión

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

de la interfase aire-agua, pero no se formó una película con las propiedades viscoelásticas necesarias para producir una estabilización.

La proteína de arroz no mostró valores positivos en los ensayos realizados para determinar sus parámetros espumantes. La insolubilidad mostrada por esta proteína puede ser una razón de la falta de valores positivos, a la vista de la relación existente entre la solubilidad y las propiedades de interfase vistas anteriormente.

Las propiedades espumantes al contrario que en emulsión, muestran una correlación positiva entre los parámetros de capacidad y estabilidad ($p < 0,05$). Además se observa también una correlación negativa entre la capacidad espumante y el tamaño de partícula (Tabla 6). No podría desestimarse que la causa de este efecto sea que un limitado tamaño de granulo, disminuya la probabilidad de aparición de los dominios hidrófobos necesarios para facultar a la proteína de la aptitud generadora de espuma.

Tabla 6. Coeficientes de correlación de Pearson y P-valores de las variables correspondientes a este estudio.

	WBC	SV	WHC	FC	FS	EC	ES	D[4_3]
WBC		0,8513 (0,0000)	0,8533 (0,0000)	-0,3712 (0,1294)	-0,1095 (0,6654)	0,2381 (0,3745)	-0,3075 (0,2466)	0,1926 (0,4439)
SV	0,8513 (0,0000)		0,9691 (0,0000)	-0,3559 (0,1471)	-0,0720 (0,7766)	0,3599 (0,1709)	-0,2930 (0,2708)	0,0853 (0,7366)
WHC	0,8533 (0,0000)	0,9691 (0,0000)		-0,4026 (0,0976)	-0,1689 (0,5029)	0,3066 (0,2480)	-0,3216 (0,2245)	0,2346 (0,3488)
FC	-0,3712 (0,1294)	-0,3559 (0,1471)	-0,4026 (0,0976)		0,5816 (0,0114)	0,1025 (0,7057)	0,1688 (0,5319)	-0,5140 (0,0291)
FS	-0,1095 (0,6654)	-0,0720 (0,7766)	-0,1689 (0,5029)	0,5816 (0,0114)		-0,0380 (0,8889)	0,0459 (0,8659)	-0,3343 (0,1751)
EC	0,2381 (0,3745)	0,3599 (0,1709)	0,3066 (0,2480)	0,1025 (0,7057)	-0,0380 (0,8889)		0,3535 (0,1792)	0,2010 (0,4554)
ES	-0,3075 (0,2466)	-0,2930 (0,2708)	-0,3216 (0,2245)	0,1688 (0,5319)	0,0459 (0,8659)	0,3535 (0,1792)		0,1485 (0,5832)
D[4_3]	0,1926 (0,4439)	0,0853 (0,7366)	0,2346 (0,3488)	-0,5140 (0,0291)	-0,3343 (0,1751)	0,2010 (0,4554)	0,1485 (0,5832)	

El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables. El número entre paréntesis es un valor-P que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas. Valores-P por debajo de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%.

4. Conclusiones

En ánimo de efectuar un análisis comparativo para reflejar los comportamientos de una serie de proteínas de diversos orígenes sobre unos parámetros de caracterización básicos seleccionados, se obtiene unos resultados que revelan la posible respuesta de las proteínas como ingrediente funcional de un sistema alimentario. Esta información no es completa, ya que los ensayos no incluyen los comportamientos que un sistema alimentario complejo manifiesta, donde ingredientes de distinta naturaleza pueden interactuar para provocar sinergias o ser contraproducente en la funcionalidad buscada. Los efectos inducidos por los ensayos en general confirman los datos de aplicación y uso proporcionados por los fabricantes en su ficha técnica, por ejemplo, los resultados de hidratación obtenidos por las proteínas cárnicas los circunscriben a asociarse con salmueras en la preparación de productos cárnicos cocidos, proporcionando jugosidad y firmeza a su textura. Con la misma aptitud se presenta el aislado de soja, cuyas propiedades mostradas en hidratación, lo asemejan en comportamiento a las cárnicas. Las proteínas de guisante mostraron unos valores considerables en todos los ensayos realizados, lo que confiere a esta proteína de la característica de versatilidad para adaptarse funcionalmente a la matriz que se requiera, aunque ciertas proteínas, como especifica el fabricante, optimizan su rendimiento en diversas propiedades tecnológicas (F85F y F85G por ejemplo como agentes emulgentes). Los ensayos de hidratación sobre los aislados de suero y de leche, manifestaron un alto grado de solubilidad y de dispersión, sobre todo WPI, para el que el fabricante aconseja su uso para incorporar a alimentos y bebidas que requieran ser fortalecidas nutricionalmente. Los valores obtenidos para MPI reflejan una alta aptitud sobre propiedades espumantes, por lo que podría ser válido su uso para incorporar a productos como cremas batidas o helados. El resto de productos lácteos manifestaron en los ensayos una solubilidad limitada, con lo que podría condicionar su incorporación a ciertas matrices en situaciones especiales, por ejemplo el uso del caseinato de sodio como agente estabilizante en las emulsiones de cremas al licor, dónde parámetros como la temperatura y la presencia de alcohol son determinantes. La proteína de clara de huevo destacó en los ensayos de espumado, por lo que su incorporación a productos cuya base sea espuma (merengues, helados) podría ser efectiva, al igual que las proteínas de patata. La proteína de gluten hidrolizado, aunque mostró buenas condiciones en el parámetro de capacidad espumante, no lo fue tanto en la estabilidad de la espuma, además el fabricante aconseja su aplicación sobre alimentos preparados, productos de cereales o lácteos

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

para fortificar nutricionalmente un producto dónde su adición no va a variar su reología. En cuanto a los productos de texturizado, los ensayos de hidratación que se efectuaron mostraron valores positivos. Este tipo de productos necesitan de rehidratarse para su manejabilidad en la composición por ejemplo de análogos de carne, por lo que cierta capacidad de hidratación es necesaria.

5. Agradecimientos

El autor agradece el apoyo recibido por la Universidad de Valladolid para la elaboración de este trabajo fin de máster

También agradecer a los proveedores y fabricantes de las proteínas evaluadas por su aportación de las fichas técnicas correspondientes vía comunicación interna.

6. Bibliografía

- Agboola, S.; Darren, N. and Mills, D. (2005). Characterization and functional properties of Australian rice protein isolates. *Journal of Cereal Science*, 41: 283-290.
- Arntfield S.D., Maskus H.D., (2011) Chapter 9 Peas and other legume proteins. *Handbook of Food Proteins Cambridge, Woodhead Publishing Limited.*
- Badui S., *Química de los alimentos* (2006). Capítulo 3, Proteínas, cuarta edición. Naucalpan de Juárez (México), Pearson Educación.
- Becher P. (1965). *Emulsions: Theory and Practice*. Reinhold Publishing Corporation.
- Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P (2009). *Food Chemistry*, Fourth edition, Springer.
- BHJ, Fichas Técnicas. *Essentia Proteins Solutions*, Dinamarca.
- Boland M. (2011) Chapter 3 Whey proteins. *Handbook of Food Proteins Cambridge, Woodhead Publishing Limited.*
- Carrera Sanchez C., Rodriguez Patino J.M., (2004) Interfacial, foaming and emulsifying characteristics of sodium caseinate as influenced by protein concentration in solution. *Food Hydrocolloids Volume 19, Issue 3, Pages 407–416.*
- Chandi, G. K. and Sogi, D. S. (2007). Functional properties of rice bran protein concentrates. *Journal of Food Engineering*; 79: 592-597.
- Cheftel, J.; Cuq, J. and Lorient, D. (1989). *Proteínas alimentarias*. Editorial Acribia, Zaragoza, España. Cap. 4: 49-100.

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

- Chou, D. and C.U. Morr, (1979). Protein-water interactions and functional properties. *Journal of the American Oil Chemist Society*; 56: 53-58.
- Codex Stan 290-1995. Norma para los productos a base de caseína alimentaria.
- Cserhalmi Z, Czukor B and Gajzato-Schuster I. (1998), 'Emulsifying properties, surface hydrophobicity and thermal denaturation of pea protein fractions', *Acta Aliment 27*, 357–363.
- Culbertson, J. (2006). Food Protein Functionality. Chapter 7, Handbook of food science, Technology, and Engineering volume 1. Boca Ratón (Florida, United States), CRC Press
- Damodaran, S. (1994). Structure-function relationship of food proteins. In: Hettiarachchy, N.S. and Ziegler, G.R. (eds) *Protein Functionality in Food Systems*. New York: Marcel Dekker. pp. 1–37.
- Damodaran, Srinivasan (2008). Amino acids, Peptides and Proteins. Chapter 5, Fennema's Food Chemistry, Fourth edition. Boca Ratón (Florida, United States), CRC Press.
- Day L. (2011).Chapter 10 Wheat gluten: production, properties and application. Handbook of food proteins, Woodhead Publishing Limited,
- Day, L., Batey, I.L., Wrigley, C.W., and Augustin, M.A. (2006). Gluten uses and food industry needs. *Trends in Food Science and Technology* 17:82–90.
- Dissanayake M. (2011). Modulation of Functional Properties of Whey Proteins by Microparticulation. PhD thesis, Victoria University, Melbourne (Australia).
- Farkye N. Y., Shah N. (2015) Applied Food Protein Chemistry, Ustunol Z, Chapter 16 Milk Proteins. Michigan (United States), John Wiley & Sons, Ltd.
- Freixanet Ll. director general de Metalquimia, artículo web "Aditivos e ingredientes en la fabricación de productos cárnicos cocidos de músculo entero". Disponible en: <http://es.metalquimia.com/upload/document/article-es-12.pdf> Fecha desconocida.
- Hansen, J. R. (1978). Hydration of soybean protein. 2. Effect of isolation method and various other parameters on hydration, *J Agric. Food Chem.*, 26(2): 301
- Huppertz (2010). Foaming properties of milk: A review of the influence of composition and processing. *International Journal of Dairy Technology*. Volume 63, Issue 4, pages 477–488.
- Ivey, F. J. , N. B. Webb and V. A. Jones. (1970). The effect of disperse phase droplet size and interfacial film thickness on the emulsifying capacity and stability of meat emulsions. *Food Technol.* 24:379-382.
- Juhász A., Békés F., C.W. Wrigley. (2015) Applied Food Protein Chemistry, Ustunol Z, Chapter 11 Wheat Proteins. Michigan (United States), John Wiley & Sons, Ltd.

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

- Mine, Y. (2002). Recent advances in egg protein functionality in the food system. *World Poultry Sci. J.* 58:31–39.
- Mohri, M. and Matsushita, S. (1984). Improvement of water absorption of soybean protein by treatment with bromelain, *J Agric. Food Chem.*, 32: 486
- Naczki, M., Rubin, L. J., and Shahidi, F. (1986). Functional properties and phytate content of pea protein preparations, *J. Food Sci.*, 51: 1245
- Nakai, S., E. C. Y. Li-Chan, and G. E. Argeta. (1996). Measurement of surface hydrophobicity. Pages 226–256 in *Methods of Testing Protein Functionality*. G. M. Hall, ed. Chapman & Hall, London, UK.
- Nicolai T., Britten M., Schmitt C., (2011). β -Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. *Food Hydrocolloids* Volume 25, Issue 8. Pages 1945–1962.
- Nutralys, Ficha Técnica. Roquette, Francia.
- O’Kennedy B. T. (2011) Chapter 2 Caseins. *Handbook of Food Proteins* Cambridge, Woodhead Publishing Limited.
- Partsia Z., Kiosseoglou V. (2001) Foaming properties of potato proteins recovered by complexation with carboxymethylcellulose. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 69-74
- Petsko, G. A., Ringe, D. (2004). *Protein Structure and Function*. Marston Book Ltd, Abingdon, OX.
- PHH, Ficha Técnica. Proveedora Hispano Holandesa, España.
- Phillips G.O., (2011). Introduction To Food Proteins. Chapter 1, *Handbook of Food Proteins*. Cambridge, Woodhead Publishing Limited.
- Pincioli M. (2010) Proteínas de arroz: propiedades estructurales y funcionales, Programa Arroz. PhD thesis. Universidad Nacional de La Plata.
- Prabhu G (2002), ‘Utilizing functional meat-based proteins in processed meat applications’, in *Proceedings of the 55th Reciprocal Meat Conference*, Savoy, IL, American Meat Science Association, 29–34.
- Ralet M-C., Gueguén J. (2001) Properties of potato raw proteins and isolated fractions, *Food Science and Technology*, 266-269.
- Remy, Ficha Técnica. Remy Industries, (2007) Bélgica.
- Riaz M. N. (2011) Chapter 15 Texturized vegetable proteins *Handbook of Food Proteins* Cambridge, Woodhead Publishing Limited.
- Sathe SK and Salunkhe DK (1981), ‘Functional properties of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: Emulsion, foaming, viscosity and gelation properties’, *J Food Sci* 46, 71–81

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DE USO ALIMENTARIO

- Sgarbieri V. C., Roman J. A. (2006) The hydrophilic, foaming and emulsifying properties of casein concentrates produced by various methods. *International Journal of Food Science & Technology* Volume 41, Issue 6, pages 609–617.
- Sikorski Z. E. (2001) *Chemical and Functional Properties of Food Proteins*. CRC Press.
- Sinha R., Radha C., Prakash J., Kaul P. (2007). Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chemistry* Volume 101, Issue 4, Pages 1484–1491.
- Sosulski, F. W. and McCurdy, A. R. (1987). Functionality of flours, protein fractions and isolates from field peas and faba bean, *J. Food Sci.*,52: 1010
- Ustunol Z. (2015) *Applied Food Protein Chemistry Chapter 3 Amino Acids, Peptides and Protein*. Michigan (United States), John Wiley & Sons, Ltd.
- Van Koningsveld, G.A., Walstra, P., Gruppen, H., Wijngaards, G., Van Boekel, M.A., Voragen, A.G.J. (2002) Formation and stability of foam made with various potato protein preparations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 7651–7659.
- Van Koningsveld, G.G., Walstra, P., Voragen, A.G.J., Kuijpers, I.J., Van Boekel, M.A.J.S., Gruppen, H. (2006) Effects of protein composition and enzymatic activity on formation and properties of potato protein stabilized emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 6419–6427.
- Verdú, J.M. (2015) *Nutrición y Alimentación Humana*. Vol 1 Nutrientes y alimentos. Capítulo 5 proteínas. Madrid. Ed. Ergón.
- Wagner, J. R. and Anon, M. C. (1990). Influence of denaturation, hydrophobicity, and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolates, *J Food Sci.*, 55: 765
- Wagner, J. R. (2000). Capítulo III. Propiedades superficiales. *In: Pílosos A. M. R. y Bartholomai G.B. Caracterización funcional y estructural de proteínas*. Ed. CYTED-EUDEBA: 41-74.
- Wang, J. C. and Kinsella, J. E. (1976). Functional properties of novel proteins: alfalfa leaf proteins. *Journal of Food Science*; 41: 286.
- Were, L.; Hettiarachchy, N. S. and Kalapathy, U. (1997). Modified soy proteins with improved foaming and water hydration properties. *Journal of Food Science*; 62 (4): 821-823 y 850.
- Wijerante, W. B. (2005). *Propiedades funcionales de las proteínas de soja en un sistema de alimentos*. México D.F. Alfa editores Técnicos.
- Zayas, Joseph F.(2012) *Functionality of Proteins in Food*. Springer Science & Business Media, Kansas (United States).