

**UNIVERSIDAD DE (A CORUÑA/SANTIAGO DE COMPOSTELA/VIGO)
MÁSTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN QUÍMICA Y QUÍMICA
INDUSTRIAL**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
Curso académico 2019/2020
Orientación: Profesionalizante**

**MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE
PROTEÍNAS EN CEREALES: AMARANTO Y CEBADA**

Tutor en la empresa: José Manuel López Vilariño
Tutor Interno: Alatzne Carlosena Zubieta
Hijos de Rivera S.A.U. Laboratorio de I+D

Presentado por: María Isabel González Pérez

Julio, 2020

Las actividades desarrolladas por la alumna **María Isabel González Pérez** para la realización del Trabajo de Fin de Grado, dentro del Máster Interuniversitario en Investigación Química y Química Industrial, se han llevado de acuerdo al Real Decreto 463/2020, del 14 de marzo, por el que se declara el estado de alarma para la gestión de la situación de crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19, y ordena la suspensión de la actividad académica educativa presencial en todos los niveles académicos, incluida la enseñanza universitaria, y establece que durante el período de suspensión se mantendrán las actividades educativas a través de las modalidades a distancia y “on line”, siempre que sea posible. También se han seguido las directrices de la Resolución Rectoral del 20 de marzo de la Universidade da Coruña para adaptar las actividades académicas a la suspensión temporal de la Actividad Docente Presencial.

La empresa, Hijos de Rivera S.A.U., ha facilitado la adaptación de las actividades prácticas que estaban previstas desarrollar en su laboratorio a la modalidad no presencial, bajo la tutorización de D. José Manuel López Vilariño responsable de I+D de la compañía.

A Coruña, julio de 2020



Fdo. Alatzne Carlosena Zubieta

Profesora Titular Universidade da Coruña

Tutora académica

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. La Cerveza, Origen e historia	6
2.2. Materias primas.....	8
▪ La Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	8
▪ Cereales no malteados.....	9
▪ El Lúpulo (<i>Hummulus lupulus</i>).....	9
▪ La levadura.....	9
▪ El agua.....	9
2.3. El Amaranto.....	10
2.4. La Cebada	12
2.5. Las proteínas en los cereales: Cebada y Amaranto	14
2.5.1. Clasificación de proteínas en semillas	15
2.5.2. Propiedades funcionales de las proteínas	17
2.6. Proteínas en Cerveza.....	23
3. OBJETIVOS.....	26
4. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN CEREALES	27
4.1. Métodos de Extracción de proteínas.....	29
4.1.1. Extracción alcalina	29
4.1.2. Extracción enzimática	30
4.1.3. Extracción por micelización.....	31
4.1.4. Extracción asistida por ultrasonido (EAU).....	32
4.1.5. Extracción por microondas (MAE).....	33
4.2. Técnicas instrumentales para el análisis de proteínas.....	34
4.2.1. Electroforesis.....	34
4.2.2. Espectrometría de Masas.....	36
4.2.3. Cromatografía de Líquidos.....	39
4.2.4. Otras técnicas instrumentales.....	41
5. CONCLUSIONES.....	44
6. BIBLIOGRAFÍA.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 1 Clasificación de los aminoácidos (en negrita los esenciales) basada en su estructura fisicoquímica (adaptado de Hernández & Sastre, 1999).....	4
Figura. 2 Componentes de cerveza y de sus materias primas (Anderson, Santos, Hildenbrand, & Schug, 2019).	5
Figura. 3 Principales materias primas utilizada por Hijos de Rivera para la elaboración de cerveza	8
Figura. 4 Planta de Amaranto (amaranthum)	10
Figura. 5 Grano de Amaranto.....	11
Figura. 6 La Cebada.....	12
Figura. 7 Semilla de Cebada.....	13
Figura. 8 Perfil de solubilidad típico para las proteínas: A) de amaranto (API) al 1 % p/v (Shevkani, Singh, Rana, & Kaur, 2014); B) de cebada (CPI) al 0,1% p/v (Bilgi & Celik, 2004).....	18
Figura. 9 (A) Estructura de una espuma en un líquido. (B) Distribución de los polisacáridos hidrofílicos y de las proteínas hidrofóbicas en la espuma de la cerveza (Blasco, 2011).....	24
Figura. 10 Esquema general para el análisis proteómico de cereales [Alves y cols, 2019].....	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proporción de las fracciones de proteínas	16
Tabla 2 Composición de aminoácidos (g/100 g de proteína cruda)	17

1. RESUMEN

Actualmente en la industria alimentaria se requiere un uso cada vez mayor de proteínas vegetales para apoyar la producción de alimentos ricos en proteínas que puedan reemplazar las proteínas animales en la dieta humana. Desde un punto de vista nutricional, las proteínas vegetales pueden suministrar cantidades suficientes de aminoácidos esenciales para los requisitos de salud humana, haciendo aconsejable sustituir la proteína de la carne y pescado por otros productos que aporten esos nutrientes. Las semillas de amaranto y cebada contienen proteínas que tienen propiedades biológicas y funcionales que proporcionan beneficios nutricionales debido a su contenido de aminoácidos razonablemente equilibrado.

La cebada es la fuente de cereal más empleado en la producción de cerveza, principalmente malteada, aunque a veces también se añade en grano. Pero hoy en día, las nuevas técnicas cerveceras, así como el incremento de la industria artesana empuja a nuevos desarrollos y al empleo de nuevos ingredientes, entre los que el amaranto es un cereal de gran interés, dadas sus propiedades nutricionales y su elevado contenido en proteína.

Esta revisión bibliográfica abarca las principales metodologías analíticas empleadas para la determinación de proteínas en la cerveza, centrándose en concreto en dos cereales, la cebada y el amaranto, abarcando los métodos de tratamiento de este tipo de muestras para la extracción de las proteínas, así como las técnicas instrumentales para su análisis y cuantificación.

En general, se comprueba la necesidad de emplear una combinación de técnicas como son la separación cromatográfica y electroforética con técnicas de degradación enzimática o química y de espectrometría de masas para obtener una información fiable y completa sobre la identificación, caracterización y cuantificación de aminoácidos en este tipo de muestras.

ABSTRACT

In the food industry today, increasing use of vegetable proteins is required to support the production of protein-rich foods that can replace animal proteins in the human diet. From a nutritional point of view, vegetable proteins can supply sufficient amounts of essential amino acids for human health requirements, making it advisable to replace the protein in meat and fish with other products that provide these nutrients. Amaranth and barley seeds contain proteins that have biological and functional properties that provide nutritional benefits due to their reasonably balanced amino acid content.

Barley is the most widely used source of cereal in beer production, mainly malted, although sometimes it is also added as a grain. But nowadays, new brewing techniques, as well as the increase in the craft industry, are pushing new developments and the use of new ingredients, among which amaranth is a cereal of great interest, given its nutritional properties and its high content in protein.

This bibliographic review covers the main analytical methodologies used for protein determination in beer, focusing specifically on two cereals, barley and amaranth, covering the methods of treating this type of samples for the extraction of proteins, as well as instrumental techniques for analysis and quantification.

In general, the need to use a combination of techniques such as chromatographic and electrophoretic separation with enzymatic or chemical degradation techniques and mass spectrometry is verified to obtain reliable and complete information on the identification, characterization and quantification of amino acids in this type of sample.

2. INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una gran preocupación por garantizar el suministro de proteínas alimentarias y esta situación empeorará ya que la población mundial continúa aumentando. Como se necesitarán más fuentes de proteínas alimentarias, la investigación se ha centrado en nuevas fuentes de proteínas alternativas (López, Galante, Raimundo, Spelzini, & Boeris, 2019). Por ello, una de las tendencias de alimentación es la búsqueda de una mayor presencia de productos de origen vegetal en la dieta. Desde un punto de vista nutricional, las proteínas vegetales pueden suministrar cantidades suficientes de aminoácidos esenciales para los requisitos de salud humana, haciendo aconsejable sustituir la proteína de la carne y pescado por otros productos que aporten esos nutrientes (López, Galante, Robson, Boeris, & Spelzini, 2018).

Casi tan importante como que el alimento tenga un contenido en proteína elevado, es el hecho de que este alimento tenga diferentes tipologías de proteínas, para que así aporten un perfil de aminoácidos amplio cubriendo todas las necesidades de los aminoácidos esenciales. No siempre es así, ya que hay alimentos o productos alimenticios que, con un alto contenido en proteína, están compuestos prácticamente por una sola variedad, por lo que se pierde ese aporte diverso. En la Figura 1 se muestra la clasificación de los aminoácidos basada en su estructura fisicoquímica, indicando cuáles son los aminoácidos esenciales. Los nueve aminoácidos esenciales constituyen un grupo cuyo esqueleto carbonado no puede ser sintetizado a partir de moléculas simples por los seres humanos y, por lo tanto, deben proveerse con la dieta.

Los cereales, después de las leguminosas, son la principal fuente de proteínas de origen vegetal (Hernández & Sastre, 1999).

En esta memoria nos centraremos en el estudio de las proteínas presentes en semillas de amaranto y de cebada, ya que estos cereales contienen proteínas con propiedades biológicas y funcionales óptimas desde el punto de vista nutricional. Esto es así ya que poseen un contenido de aminoácidos razonablemente equilibrado. Los niveles de proteína de estos cereales son

similares a los de los huevos, que es tomado como referencia: Amaranto 15 % > Huevo 13 % > Cebada 12 %.

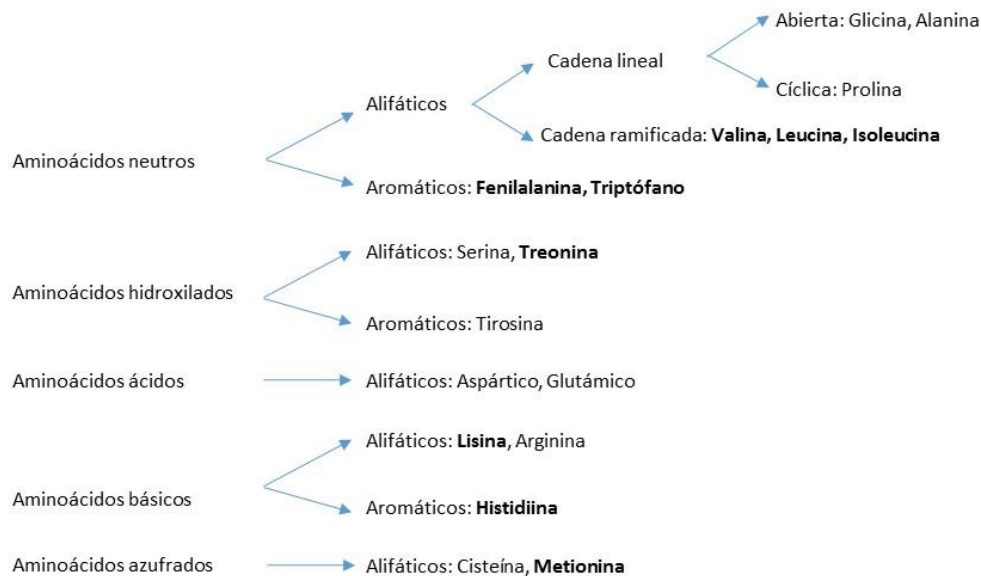


Figura. 1 Clasificación de los aminoácidos (en negrita los esenciales) basada en su estructura fisicoquímica (adaptado de Hernández & Sastre, 1999)

Desde el punto de vista de la industria cervecera, la cebada es una de las materias primas más importantes y el amaranto está siendo introducido en los últimos años en la fabricación de cerveza u otras bebidas por su gran potencial nutricional. El estudio de las proteínas presentes en las materias primas utilizadas en la fabricación de la cerveza tiene, además, una gran importancia debido a su influencia en la formación y calidad de la espuma, así como en el tiempo de estabilidad de la misma. Y también por el aporte de aminoácidos libres, que se liberan durante el proceso de cocimiento y fermentación, así como su influencia en las etapas de filtrado y estabilidad de producto final.

Recientemente se están incorporando al mercado nuevas fórmulas cerveceras sin alcohol, fundamentalmente artesanales, ricas en proteínas para ser consumidas como bebidas post-entrenamientos deportivos con un alto aporte en aminoácidos denominados del grupo BCAA. A él pertenecen los aminoácidos neutros alifáticos ramificados (Leucina, Isoleucina y Valina) los cuales forman parte de un tercio de la masa músculo esquelética y desarrollan un papel

fundamental en la síntesis proteica en nuestro organismo (González, De Lira, Carrizales, & Martínez, 2013).

En la Figura 2 se resumen los principales compuestos o grupos de compuestos presentes en las principales materias primas de la cerveza como en el producto final (Anderson, Santos, Hildenbrand, & Schug, 2019).

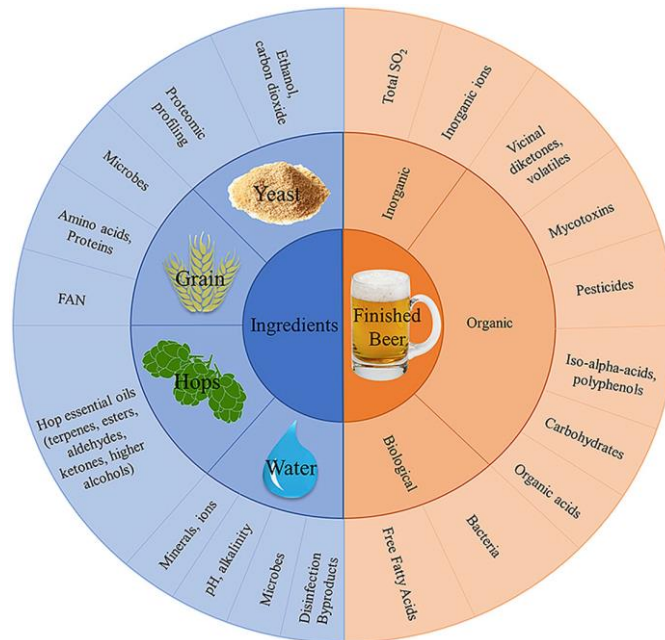


Figura. 2 Componentes de cerveza y de sus materias primas (Anderson, Santos, Hildenbrand, & Schug, 2019).

Las buenas propiedades nutritivas de estos cereales también se pueden aprovechar utilizando los residuos que se generan en la industria cervecera como alimento animal. El bagazo cervecero es el que se produce en mayor cantidad. El bagazo es el producto resultante del proceso de prensado y filtración del mosto obtenido tras la sacarificación del grano de cebada malteado, rico en proteína y fibra. Estudios han confirmado que aportan al ganado una ganancia diaria de peso similar a las de otros suplementos energéticos comúnmente utilizados por los productores, como es el caso del maíz y el sorgo, gracias a la alta concentración de proteína y cantidad de fibra que posee (Rivas, y otros, 2017). Lo cual favorece y potencia la valorización de estos residuos generados en la industria cervecera.

2.1. La Cerveza, Origen e historia

La cerveza es una de las bebidas con alcohol más antiguas y consumidas en todo el mundo (Limure & Sato, 2013). Es difícil definir con precisión el comienzo de la historia de la cerveza. Sin embargo, la evidencia arqueológica muestra que el nacimiento de la cerveza fue posterior al 3000 a.C (Li, Wang, & Liu, 2017), al encontrar una tableta de arcilla de esa época en la que estaba escrito un método para la producción de “pan de cerveza” mezclando y horneando harina de cebada con agua (Limure & Sato, 2013). Posteriormente, los griegos perfeccionaron aún más la técnica cervecera y la exportaron a la Galia, a España y a la costa del Adriático. Durante la Edad Media, los europeos, especialmente los monasterios católicos, no solo mantuvieron el conocimiento de la fabricación de la cerveza, sino que también le aplicaron los refinamientos de la ciencia moderna (Suárez, 2013).

La cerveza es la tercera bebida más popular en el mundo, detrás del agua y el té (Anderson, Santos, Hildenbrand, & Schug, 2019). Antiguamente, a medida que las poblaciones fueron creciendo también crecía, la contaminación del suministro del agua por lo que el consumo de cerveza aumentaba (Suárez, 2013).

Las cervezas en épocas anteriores eran muy diferentes de las cervezas de hoy en día. Un factor importante para este hecho era la ausencia de lúpulo. Su incorporación supuso, una gran contribución al sabor y estabilidad de la cerveza. Sin embargo, los cerveceros no usaron lúpulo hasta el año 1000 d.C. Para el año 1600, casi todas las cervezas se elaboraban con mosto de lúpulo (Li, Wang, & Liu, 2017). Uno de los principales motivos del éxito de la cerveza en esta época es el que la cerveza siempre ha tenido un importante consumo social y es una excelente fuente de calorías que, desde sus orígenes, complementaba muchas dietas generalmente pobres. Además, no contenía agentes infecciosos, como el agua o la leche, debido a su fermentación (Suárez, 2013).

En el siglo XVIII se produjo una importante innovación en la industria cervecera al introducirse la botella de cristal, que no solo significó el fácil transporte y

almacenamiento, sino también facilitaba en gran medida el consumo privado en los domicilios (Suárez, 2013).

La refrigeración fue sin duda un gran invento para el mundo y que benefició en gran medida a la industria cervecera. Antes de que se inventara la refrigeración, los cerveceros solo podían usar hielo para mantener baja la temperatura durante la fermentación. El hielo era recolectado de ríos o lagos congelados en el invierno. La dificultad de conservación fue el mayor problema en aquel entonces. Sin embargo, la refrigeración resolvió el problema perfectamente (Li, Wang, & Liu, 2017).

En la fabricación de la cerveza se utilizan diversos ingredientes, que una vez procesados pueden originar sustancias beneficiosas para la salud humana. Por esta razón se considera que la cerveza sin alcohol es una buena fuente de nutrientes y minerales esenciales entre los que se mencionan vitamina B, potasio, calcio, magnesio y silicio (López, Chevez, & Serrano, 2006).

Los beneficios del consumo de la cerveza sin alcohol son grandes, entre ellos se mencionan sus efectos protectores ante algunas enfermedades como las cardiovasculares. Pero también puede ser beneficiosa ante algunas enfermedades degenerativas. La cerveza, al ser un producto natural ofrece mayor diversidad de ingredientes que los refrescos de cola o gaseosas, destacando su aportación de vitaminas del grupo B. El consumo diario de un tercio de cerveza aporta alrededor de un 6.6 % de las necesidades diarias de calorías, un 10 % de fósforo, y vitaminas (riboflavina, piridoxina, niacina, folatos y ácido fólico, además de tiamina) (López, Chevez, & Serrano, 2006).

En Europa, América y Australia, se elabora tradicionalmente con cebada, en África con mijo, en Japón con arroz, en la América pre-colombiana se hacía de maíz (chica), mandioca y patata. También hay cervezas de centeno, de sorgo, de raíces de jengibre, de corazón de palma, de semillas de bambú, y en la zona de Ruanda y Uganda se conoce una cerveza fabricada a base de bananas verdes. En las recetas del pasado, se le añadían amapolas, champiñones, plantas aromáticas, miel, azúcar, laurel, mantequilla, migas de pan, etc. Por regla

general, en la actualidad “cerveza” es el nombre genérico que se da a toda bebida fermentada fabricada con malta, azúcar, lúpulo, agua y levadura (Suárez, 2013).

2.2. Materias primas

Los componentes que más importancia tienen en la fabricación de la cerveza son: Cereales malteados (generalmente la cebada, también puede utilizarse trigo, centeno, amaranto...), los cereales no malteados o crudos (maíz, trigo, arroz o avena), el lúpulo, la levadura y el agua.

En la Figura 3 se muestran las principales materias primas utilizadas por Hijos de Rivera para la elaboración de la cerveza.



Figura. 3 Principales materias primas utilizada por Hijos de Rivera para la elaboración de cerveza

- **La Cebada** (*Hordeum vulgare*) El grano más típicamente elegido es la cebada, el cual introduce carbohidratos, sacáridos, aminoácidos, proteínas y vitaminas en la cerveza. La combinación de todos ello afecta el sabor general, aroma y color final que tendrá la cerveza (Anderson, Santos, Hildenbrand, & Schug, 2019).
A la fábrica de Hijos de Rivera, la cebada llega ya malteada, cumpliendo las características específicas y se emplean al menos dos tipos de maltas de cebada: la malta Pilsen y la malta tostada.

- **Cereales no malteados**, también se añaden en la maceración ya que le pueden aportar a la cerveza una mayor textura e incluso mejorar la estabilidad de la espuma.

Como cereal adjunto, en la fábrica de Hijos de Rivera emplean el maíz. Llega a la fábrica en forma de grits, ya molido, sin grasa y sin germen. Se incorpora en la fase de cocimiento para aclarar el color, obteniendo una apariencia más dorada y reduciendo los componentes que incrementan la sensación de pesadez en la cerveza.

- **El Lúpulo** (*Humulus lupulus*) le da a la cerveza su sabor amargo y agradable aroma, que son las características más distinguibles de la bebida. La amargura se consigue mediante la isomerización de los α -ácidos (humulona, cohumolona y adhumulona), durante la ebullición del mosto, mientras el aroma de la cerveza proviene de una mezcla de compuestos volátiles derivados de los aceites esenciales de lúpulo (Urba, Dahlberg, Carroll, & Kaminsky, 2013). También aporta estabilidad a la espuma de cerveza y se ha demostrado que proporciona propiedades antimicóticas y antibióticas (Anderson, Santos, Hildenbrand, & Schug, 2019).

La fábrica de Hijos de Rivera utiliza tres variedades fundamentales de lúpulo siendo estas Nugget, Perle y Sladek.

- **La levadura** es la principal responsable de la producción de etanol y dióxido de carbono durante la fermentación. En función del tipo de levadura, *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces pastorianus*, se emplean diferentes tipos de fermentación, la fermentación alta (tipo ale) y la fermentación baja (tipo lager), respectivamente. Elegir una cepa de levadura adecuada es crucial para la calidad de la cerveza (Anderson, Santos, Hildenbrand, & Schug, 2019).

La fábrica Hijos de Rivera emplea una cepa exclusiva trasladada periódicamente desde Alemania, lo que permite obtener una cerveza con atributos homogéneos tal y como demanda un consumidor exigente.

- **El agua** constituye normalmente más del 95% del peso de la cerveza (Salgado-Albarrán, Herrera-Díaz, & Dinkova, 2015), lo que la convierte en

el componente más importante en la cerveza (Anderson, Santos, Hildenbrand, & Schug, 2019).

La fábrica de Hijos de Rivera situada en el polígono de A Grela dispone del suministro de agua de la ciudad de A Coruña, la cual tiene propiedades fisicoquímicas de alto valor cervecero para la producción de cervezas tipo lager, características de la compañía.

2.3. El Amaranto

El amaranto es una dicotiledónea de la familia Amaranthaceae. Pertenece al género *Amaranthus* que comprende aproximadamente 70 especies, existiendo una amplia variabilidad genética entre éstas. Es una planta anual, que alcanza una altura de 0,9 - 1,8 m y se cultiva principalmente a partir de sus semillas, las cuales son una fuente de harina y aceite. La planta crece rápidamente y puede usarse en sistemas de rotación de cultivos de granos. Es una planta no gramínea que produce semillas tipo granos que se parecen en composición y función a las de los verdaderos cereales, por lo que se le ha denominado pseudocereal (Matías, y otros, 2018).



Figura. 4 Planta de Amaranto (*Amaranthum*)

Posee proteínas con una composición de aminoácidos bien equilibrada, con un alto contenido de aminoácidos esenciales y con una alta biodisponibilidad. Además, como pseudocereal, es un producto sin gluten lo cual representa un avance significativo para asegurar una ingesta adecuada de nutrientes en personas con enfermedad celíaca (López, Galante, Robson, Boeris, & Spelzini,

2018). Por todo ello es una fuente no convencional de proteínas que se ha estudiado en los últimos años y que la FAO ha catalogado como un cultivo con la misma cantidad de nutrientes que la soja y con capacidad productiva. No obstante, su cultivo ya era popular en las civilizaciones inca, maya y azteca, donde se usaba como alimento básico FAO (FAO, 2018).

Se ha cultivado en regiones tropicales a subtropicales. Comercialmente se cultiva en México, Bolivia, Argentina, Ecuador, Guatemala y Perú (López, Galante, Robson, Boeris, & Spelzini, 2018).

El amaranto tiene múltiples usos tanto en la alimentación humana y animal como en la industria, medicina y en la ornamentación. Para la alimentación humana se usa tanto en grano como la hoja. El grano (Figura 5) se usa para hacer panes y pasteles, y los componentes de la planta se pueden usar en ensaladas o sopas (Chmelík, Snejdřlová, & Vrablík, 2019). El grano de amaranto es consumido principalmente en productos procesados, como lo son harinas, dulces, barras, suplementos alimenticios, entre otros. De manera general, todos los anteriores son productos tradicionales con poco atractivo comercial, por lo que la propuesta de nuevas alternativas de mercado con alto valor agregado, como la elaboración de cerveza, fomentaría el consumo de este grano. De esta manera, una cerveza, la cual incluya amaranto, es hoy en día una perspectiva interesante a estudiar.



Figura. 5 Grano de Amaranto

La característica más importante del amaranto es, sin duda, su alto valor nutritivo. Si bien la composición química del grano depende de la especie y variedad, así como de las condiciones climáticas. Pero en general, el grano tiene

un mayor contenido de proteínas en comparación con otros granos de cereales (15 %), pudiendo ser hasta del doble (Chmelík, Snejdřlová, & Vrablík, 2019). Además, en su composición química están presentes diversos compuestos como péptidos antimicrobianos, inhibidores de proteasas, lectinas y compuestos antioxidantes. Y destacar que se ha reportado la presencia de diversos péptidos con actividades antihipertensivas y anticancerígenas en proteínas del amaranto (Sani, Rahmat, Ismail, Rosli, & Endrini, 2004).

2.4. La Cebada

La cebada (Figura 6) es una planta que pertenece a la familia *Poaceae* y al género *Hordeum*, siendo la forma más común (*Hordeum vulgare*). Ha sido uno de los granos alimenticios más importantes desde la antigüedad y hoy en día representa uno de los usos industriales más importantes de los suelos de cultivo. Ocupa el cuarto lugar en cantidad producida y área de cultivo de cereales en el mundo (Arendt, 2013).



Figura. 6 La Cebada

La cebada tiene una larga historia como fuente de nutrición humana. Hay estudios arqueológicos que revelan el cultivo de cebada de dos hileras en Irán desde el 8000 a. C. y la cebada de seis hileras desde aproximadamente el 6000 a. C. (Arendt, 2013). Es sin duda la especie de grano de cereal más ampliamente adaptada, con producción en latitudes y altitudes más altas y más desérticas que cualquier otro cultivo de cereales (Byung-Kee & Steven, 2008).

Se usó primero como alimento humano y a lo largo de su historia se ha mantenido como una fuente importante de alimento para algunas culturas, principalmente en Asia y el norte de África (Byung-Kee & Steven, 2008). Fue evolucionando a la producción de alimentos malteados y la elaboración de granos forrajeros. En los últimos tiempos, aproximadamente dos tercios de la cosecha de cebada se utilizan para alimentación (con solo un 2 % para la alimentación directa) y un tercio para producir malta.

La drástica disminución del consumo humano de cebada se ha debido al uso creciente de trigo, arroz y maíz en la dieta humana. Por lo que actualmente su uso alimentario principal es en la elaboración de bebidas alcohólicas como la cerveza (Arendt, 2013).

La germinación de la semilla de cebada (Figura 7) es la base de la industria de la malta. Y décadas de investigación sobre la malta han significado que la cebada sea vista como un modelo de estudio para la germinación de semillas de cereales. La calidad de la semilla de cebada depende de propiedades genéticamente determinadas y de la composición de la semilla, pero también se ve afectada por las condiciones ambientales durante el crecimiento. Por lo tanto, existe un gran interés en cultivar variedades de cebada que ofrezcan un rendimiento mejorado, una mejor calidad del malteado y mayor resistencia al estrés biótico y abiótico; así como que se adapten a diferentes climas (Finnie & Svensson, 2009).



Figura. 7 Semilla de Cebada

La cebada es uno de los granos de cereales genéticamente más diversos. Además, se clasifica de diversas formas: en primavera o invierno, dos o seis hileras, sin cáscara o con cáscara, y por tipo de uso final, malteado o alimentación. La cebada de diferentes clases a menudo difiere ampliamente en características físicas y de composición y, en consecuencia, tienen diferentes propiedades de procesamiento y calidad de uso final (Byung-Kee & Steven, 2008).

La principal ventaja de incorporar la cebada en productos alimenticios para su consumo proviene de sus beneficios potenciales para la salud humana. La efectividad de los β -glucanos de la cebada para reducir el colesterol en sangre e índice glucémico ha sido reportado en numerosas publicaciones (Byung-Kee & Steven, 2008).

2.5. Las proteínas en los cereales: Cebada y Amaranto

Las proteínas del amaranto son de alta calidad ya que su composición de aminoácidos tiene una alta proporción de aminoácidos esenciales (como son la lisina y el triptófano). Se acerca a la calidad de las proteínas de origen animal, las cuales contienen los nueve aminoácidos esenciales. Otra característica de relevancia para su uso alimenticio es que debido a su bajo contenido de prolaminas y a la ausencia de α -gliadina en sus granos, la harina de amaranto es adecuada para pacientes con enfermedad celíaca, tal como se ha mencionado. Las alergias al amaranto también son muy raras debido a la baja estructura antigénica de las proteínas del amaranto (Chmelík, Snejdrlová, & Vrablík, 2019).

La composición total de proteína de grano de cebada varía de 8 % a 13 %, con diversos tejidos de grano de cebada enriquecidos con tipos específicos de proteína en diferentes niveles. Las proteínas principales en la cebada son la hordeína (35 - 45 %) y la glutelina (35 - 45 %), mientras que el salvado y el germen de cebada están enriquecidos en proteínas citoplasmáticas (principalmente albúmina y globulina) (Dhillon, Kaur, Oberoi, Spier, & Brar, 2016).

2.5.1. Clasificación de proteínas en semillas

Las proteínas de semillas se pueden clasificar en base a diferentes criterios, como la función y su solubilidad, entre otros. Una clasificación basada principalmente en la función de la proteína divide las proteínas de semillas en tres grupos: proteínas de "almacenamiento", "estructurales y metabólicas" y "protectoras".

Las proteínas de almacenamiento son aquellas proteínas que se establecen en una etapa del desarrollo para su uso futuro, con objeto de suministrar compuestos intermedios de nitrógeno para la biosíntesis en una etapa metabólica activa.

El bioquímico estadounidense T.B. Osborne desarrolló en 1907 el primer método de clasificación de las proteínas vegetales basado en la solubilidad diferencial de cada fracción protéica en diferentes disolventes acuosos y no acuosos. De tal manera que los usó para extraer, cuantificar y clasificar las proteínas de almacenamiento de los cereales. Osborne identificó cuatro fracciones:

- Albúminas: engloba las proteínas solubles en agua o en disoluciones salinas diluidas.
- Globulinas: esta fracción requiere concentraciones salinas más elevadas.
- Prolaminas, u hordeínas en el caso de la cebada: son la fracción soluble en alcohol.
- Glutelinas: son la fracción más difícil de solubilizar, siendo extraíbles con álcalis y ácidos débiles o soluciones detergentes diluidas.

Se han realizado mejoras de este método, pero básicamente sigue siendo el método físico más empleado para clasificar las proteínas por su rapidez y simplicidad (López, Galante, Robson, Boeris, & Spelzini, 2018).

En la Tabla 1 se recogen los contenidos de las diferentes fracciones protéicas referenciados para las proteínas de almacenamiento del amaranto y la cebada.

Tabla 1. Proporción de las fracciones de proteínas

Variedad / tipo / origen	Amaranto (g fracción/100 g de proteína cruda)		Cebada (%)
	Azteca	De cera	-
Albúminas	51	47,2	13
Globulinas	15,9	18,9	12
Prolaminas	2	0,7	52
Glutelinas	31,1	23,8	23
Referencia	(Segura-Nieto, y otros, 1992)	(Barba de la Rosa, Gueguen, Paredes-Lopez, & Viroben, 1992)	(Fontana & Buiatti, 2009)

Se observa una cierta variabilidad en los datos presentados en la Tabla 1 que puede deberse a que los disolventes utilizados en los diferentes trabajos no fueron los mismos. De hecho, las concentraciones de sal, el tipo de alcohol y los agentes desnaturizantes también fueron diferentes, lo cual provoca variaciones en la cantidad de proteína solubilizada en cada caso. Y en dichos estudios se han utilizado métodos diferentes para la cuantificación de las proteínas, como son el método Kjeldahl, ensayos colorimétricos, electroforesis o cromatografía.

En la Tabla 2 se muestra la composición en aminoácidos de las proteínas de las semillas de amaranto y cebada recogida en la bibliografía.

Tabla 2 Composición de aminoácidos (g/100 g de proteína cruda)

Aminoácido	Amaranto (López, Galante, Robson, Boeris, & Spelzini, 2018)	Cebada (Byung-Kee & Steven, 2008)
Alanina	4,3	4,4
Arginina	9,3	6,0
Ácido aspártico	7,7	7,1
Cisteína	-	2,8
Ácido glutámico	16,0	29,8
Glicina	5,9	4,2
Histidina	3,4	2,6
Isoleucina	3,8	4,3
Leucina	6,0	7,9
Lisina	6,1	4,1
Metionina	5,6	2,0
Fenilalanina	6,6	6,8
Prolina	4,8	13,2
Serina	5,6	5,4
Treonina	-	4,2
Triptófano	-	2,2
Tirosina	4,5	3,7
Valina	5,1	5,9

La composición de aminoácidos de la proteína de amaranto y la de cebada son bastante similares a la de otros granos de cereales. Los altos contenidos de ácido glutámico y cantidades relativamente bajas de aminoácidos básicos caracterizan este tipo de semilla.

2.5.2. Propiedades funcionales de las proteínas

Las propiedades funcionales de las proteínas denotan cualquier propiedad fisicoquímica que afecte el procesamiento y el comportamiento de las proteínas en los sistemas alimentarios. Ellos reflejan interacciones complejas entre la composición, estructura, conformación, propiedades fisicoquímicas de las proteínas, otros componentes alimenticios y la naturaleza del entorno en el que

estos están asociados o medidos (Bilgi & Celik, 2004). Las propiedades más importantes y que más influyen en su comportamiento en los sistemas alimentarios son: la solubilidad, la actividad emulsionante y la actividad espumante.

▪ Solubilidad

Entre las propiedades funcionales, la solubilidad es de gran importancia debido a su influencia significativa en las otras propiedades funcionales, siendo esta la primera propiedad determinada durante el desarrollo y prueba de nuevos ingredientes proteicos (Bilgi & Celik, 2004). En general, se requiere que las proteínas tengan una alta solubilidad en medios acuosos para proporcionar buenas características de emulsión, espuma, gelificación y batido (López, Galante, Raimundo, Spelzini, & Boeris, 2019). En la figura 8 se muestra un perfil de solubilidad típico para las proteínas de amaranto (API) (Shevkani, Singh, Rana, & Kaur, 2014) y de cebada (CPI) (Bilgi & Celik, 2004).

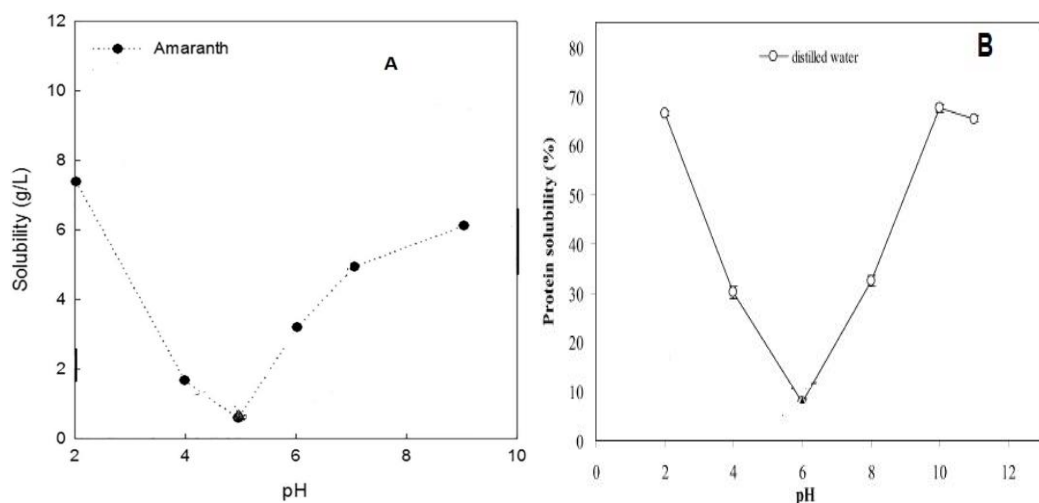


Figura. 8 Perfil de solubilidad típico para las proteínas: A) de amaranto (API) al 1 % p/v (Shevkani, Singh, Rana, & Kaur, 2014); B) de cebada (CPI) al 0,1% p/v (Bilgi & Celik, 2004).

Shevkani y cols. (2014) estudiaron la solubilidad de proteínas del aislado de proteína de amaranto (API) de seis cultivos diferentes en un rango de pH de 2 a 9. Los aislados se dispersaron al 1 % p/v y se determinó la

proteína soluble por el método Kjeldahl. La solubilidad mínima se observó a pH 5 y aumentó para valores mayores y menores de pH.

Suarez y Añón (2018) eligieron dos condiciones experimentales para obtener el aislado de proteínas de dos preparaciones de proteínas que tenían diferencias estructuralmente marcadas. Las muestras API se dispersaron en tampón fosfato a pH 2,0 y pH 6,3 y en condiciones de baja fuerza iónica. Los resultados indicaron que, en condiciones de baja fuerza iónica, las proteínas de almacenamiento de amaranto eran mucho más solubles a pH 2,0 que a pH 6,3 (Suarez & Añón, 2018).

Bolontrade y cols. (2013) también evaluaron el efecto de la fuerza iónica sobre la solubilidad de las proteínas. Obteniendo de igual manera que la solubilidad de las proteínas disminuyó a alta fuerza iónica, siendo este efecto mayor en medios ácidos (Bolontrade, Scilingo, & Añón, 2013).

La solubilidad de las proteínas de cebada (CPI) fue estudiada por Bilgi y Celik (2004) identificando los efectos del pH sobre el perfil de solubilidad del concentrado de proteína de cebada en agua destilada y varias concentraciones de sal, para las concentraciones de proteína de 0,1% y 0,5% (p/v). En todas las concentraciones de proteínas, la mayor solubilidad fue en agua destilada entre los disolventes estudiados. Observando una solubilidad mínima alrededor del pH 6, que está cerca del punto isoeléctrico de las proteínas de cebada. Para ambas muestras de concentrado de proteína de cebada, la solubilidad a valores de pH ácidos disminuyó hacia el punto isoeléctrico y luego aumentó hacia valores de pH básicos. Los resultados con respecto a los efectos de la concentración de NaCl y el pH sobre la solubilidad de las soluciones concentradas de proteína de cebada sugirieron que la presencia de NaCl disminuía considerablemente la solubilidad del concentrado de proteínas. Por lo que la solubilidad de los concentrados de proteínas generalmente se vio afectada negativamente por el aumento de la fuerza iónica.

Yalcin y Celi (2007) también estudiaron los efectos del pH sobre el perfil de solubilidad de proteínas, pero en harina de cebada, sin y con cáscara, en agua destilada y diversas concentraciones de sal. Obteniendo de igual manera una solubilidad mínima en agua destilada alrededor de pH 4. Los

resultados, con respecto a los efectos de la concentración de NaCl y el pH sobre la solubilidad de las proteínas de las soluciones de harina de cebada sin cáscara y con cáscara, generaron similares resultados, indicando que la solubilidad se vio afectada negativamente por el aumento de la fuerza iónica. Los cambios de pH y fuerza iónica del medio afectaron el comportamiento de solubilidad de proteínas de ambas harinas de cebada.

▪ **Actividad emulsionante**

Las propiedades emulsionantes de las proteínas se ven afectadas por la tasa de adsorción de proteínas en la interfaz aceite-agua, por la cantidad de proteína adsorbida, por el reordenamiento conformacional en la interfaz, por el grado de reducción de la tensión interfacial y por la formación de una película cohesiva. La actividad emulsionante (EA), la capacidad emulsionante (EC) y la estabilidad de la emulsión (ES) son índices comúnmente utilizados para evaluar las propiedades emulsionantes de las proteínas (Amagliani, O'Regan, Kelly, & O'Mahony, 2017).

La actividad emulsionante (EA) para el amaranto fue calculada como el porcentaje representado por el volumen de la capa emulsionada dentro de todo el contenido. La estabilidad emulsionante (ES) se expresó como el porcentaje del volumen de la capa emulsionada que quedaba de la emulsión original después de 30 minutos de tratamiento térmico y centrifugación. Estos aislamientos de proteínas mostraron un alto ES a pH 8, cerca del 100% (Mahajan & Dua, 2002), (Cordero, Osuna, Borodanenko, & Paredes, 2005).

Según Mahajan y Dua (2002), la adición de NaCl o NaHCO₃ a las emulsiones de proteínas de harina de amaranto no tuvo influencia en la EA, mientras que la ES se mejoró en presencia de estas sales. El índice de actividad emulsionante (EAI) y el índice de estabilidad de la emulsión (ESI) también se determinaron para API, de acuerdo con el método turbidimétrico propuesto por (Pearce & Kinsella, 1978). El EA más alto se obtuvo a pH 9 (de 20,7 a 52,7 m²/g) y el ES estuvo en el rango de 85,4 a

149,5 min para el API de los diferentes cultivos (Shevkani, Singh, Rana, & Kaur, 2014). Los valores más bajos de EA se obtuvieron a pH ácido. Para el caso de la proteína de cebada Bilgi y Celik (2004) estudiaron la capacidad emulsionante (EC) y estabilidad de la emulsión (ES) demostrando que los efectos del pH sobre la EC y la ES de diferentes concentraciones de concentrado de proteína de cebada generalmente se parecían a sus perfiles de solubilidad en agua. Obteniendo una correlación positiva entre la solubilidad y las propiedades emulsionantes de las proteínas. A todos los valores de pH, se observaron los valores más bajos de EC y ES para la concentración de proteína de 0,05%. A pH 4, los valores de EC y ES presentaron una fuerte dependencia de la concentración de proteína y aumentaron de casi cero para la concentración de proteína más baja al valor de 40% para el contenido de proteína más alto. Si bien los comportamientos emulsionantes a pH 8 fueron similares a los de pH 2, la dependencia de los valores de EC y ES de la concentración de proteína se detectó nuevamente a pH 10. Las propiedades emulsionantes alcanzaron su valor más bajo a pH 6. También se observó que un aumento en el tiempo de homogeneización de 60 s a 90 s causó un ligero aumento en las propiedades emulsionantes de los concentrados de proteínas.

- **Actividad espumante**

Las propiedades espumantes dependen de la capacidad de las proteínas para adsorberse rápidamente en la interfaz aire-agua, sufrir un rápido cambio conformacional y reorganización en la interfaz, y formar una película viscoelástica cohesiva en la interfaz a través de interacciones intermoleculares. La capacidad de espuma (FC) describe la cantidad de área interfacial que las proteínas pueden estabilizar por unidad de peso o concentración y la estabilidad de la espuma (FS) se refiere a la capacidad de las proteínas para estabilizar la espuma contra la gravedad y tensiones mecánicas (Amagliani, O'Regan, Kelly, & O'Mahony, 2017).

La FC, determinada como el aumento porcentual en el volumen después de la mezcla en suspensión, y la FS, determinada como el porcentaje del

volumen de espuma restante registrado después de 30 min; se han estudiado en función del pH para el API obtenido por precipitación isoeléctrica (Cordero, Osuna, Borodanenko, & Paredes, 2005) y derivado de diferentes cultivares (Shevkani, Singh, Rana, & Kaur, 2014). Además, se estudiaron los valores de FC y FS para las proteínas de la harina de amaranto (Mahajan & Dua, 2002). Los valores más altos de FC se encontraron a pH 2 (42,25%) y la FS registrada después de 30 minutos de formación de espuma fue de aproximadamente 100% para valores de pH desde 2 a 10 (Cordero, Osuna, Borodanenko, & Paredes, 2005).

El efecto de la adición de sal en las propiedades espumantes se estudió para las proteínas de la harina de amaranto. La adición de NaCl y NaHCO₃ disminuyeron la FC en todas las concentraciones estudiadas (hasta 1 M), mientras que la FS mejoró en todas las concentraciones de NaCl ensayadas (Mahajan & Dua, 2002).

La FC de API también ha sido estudiada por conductimetría obteniendo que las espumas más densas fueron las obtenidas a pH 2, independientemente de la fuerza iónica. La FS también ha sido estudiada para API por conductimetría obteniendo que, a alta fuerza iónica, las espumas (ajustadas a 0,5) preparadas a pH 2 fueron más estables que las de pH 8 (Bolontrade, Scilingo, & Añón, 2013). Los autores mencionaron que las espumas formadas por un bajo contenido de proteína insoluble favorecían la FS, mientras que aquellas con un alto contenido de proteína insoluble favorecían la desestabilización. Vale la pena resaltar que este hallazgo también fue informado por Shevkany y cols. (2014) en su estudio.

Houde y cols. (2018) estudiaron la capacidad espumante y la estabilidad de los concentrados de proteína de cebada a diferentes valores de pH de 3,0, 5,0 y 8,0. La FC del concentrado de proteína de cebada no varió significativamente dentro del mismo rango de pH, ya que disminuyó solo ligeramente de 88,7% a 75,3% al incrementar el pH de 3,0 a 8,0. Se descubrió que la capacidad espumante de las fracciones de proteína de cebada era mayor a pH 3,0 y pH 8,0 debido a su mayor solubilidad en agua y facilidad para migrar a la interfaz aire-agua. Después de 30

minutos de reposo a temperatura ambiente, la estabilidad de la espuma (FS) no varió mucho con el pH; fue de 64% a pH 3,0 y aumentó a 75% a valores de pH de 5.0 y 8.0 (Houde, Khodaei, Benkerroum, & Karboune, 2018). Por otro lado Yalcin y cols. (2007) obtuvieron una alta formación de espuma de aislados de proteína de cebada extraída con alcohol etílico al 1,0% (p / v) a pH 2,0 y pH 8,0. La menor capacidad de formación de espuma también se observó a pH 6,0, cerca del punto isoeléctrico, debido a las interacciones proteína-proteína.

2.6. Proteínas en Cerveza

La cerveza contiene aproximadamente 500 mg/L de material protéico, típicamente de un tamaño comprendido entre 5 y 100 kDa. Estos polipéptidos presentes en la cerveza tienen su origen principal en los granos de cereales utilizados en la elaboración de la cerveza, principalmente cebada y trigo, pero también en determinadas ocasiones otros cereales, según las variedades desarrolladas. En el caso de la cebada, el principal ingrediente de la cerveza, su contenido en proteína constituye aproximadamente el 12% de la masa total del grano, siendo las hordeínas las proteínas más abundantes (40-50% del total de proteína) (Colgrave, Goswami, Howitt, & Tanner, 2013). También es necesario destacar la presencia de una pequeña cantidad de proteínas derivadas de la rotura de la pared celular de la levadura empleada en la fermentación. Su presencia es claramente minoritaria, pero técnicamente en ocasiones puede ser de gran interés, ya que aporta diferentes péptidos y aminoácidos, que no están presente en los cereales.

En el curso del proceso de producción de cerveza, en una primera etapa (maceración), los granos de malta de cebada se rompen y la presencia de las enzimas endógenas (α -amilasas) degradan el almidón a azúcares. El impacto de la elección de una determinada variedad de cebada y en consecuencia de la calidad de su grano y de la malta resultante es crítica en las propiedades de la cerveza, siendo el lograr la mayor calidad posible uno de los mayores retos de la industria cervecera de todo el mundo. Junto con la proteína, los componentes más importantes del producto final, la cerveza, son los carbohidratos, lípidos y

los alfa-isoácidos del lúpulo, parámetros todos ellos influyentes en la estabilidad de la espuma, así como en las propiedades organolépticas del producto final.

Entre los distintos compuestos presentes en la composición de la cerveza, la proteína es el factor de mayor importancia a la hora de lograr una espuma adecuada (Figura 9). Las proteínas asociadas con la formación y la estabilidad de la espuma de cerveza son la proteína Z, las proteínas de transferencia de lípidos y los fragmentos de hordeína y glutelina. De ellos, la proteína Z ($M_r \sim 43$ kDa) y la proteína de transferencia de lípidos 1 (LTP1) de 9,6 kDa, ambas originarias de la cebada, son las predominantes en la cerveza. Estas proteínas muestran una alta estabilidad al calentamiento y a la proteólisis. Su resistencia a pH extremos, a las altas temperaturas y sus propiedades inhibitorias de la proteasa pueden explicar la supervivencia de estas proteínas durante los procesos de malteado y de elaboración de la cerveza (Petry-Podgórska, Zídková, Flodrová, & J., 2010) (Bobalova & Chmelik, 2007).

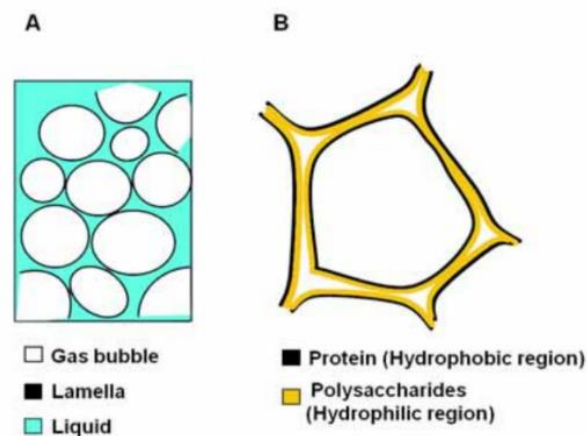


Figura. 9 (A) Estructura de una espuma en un líquido. (B) Distribución de los polisacáridos hidrofílicos y de las proteínas hidrofóbicas en la espuma de la cerveza (Blasco, 2011).

Tal y como se ha indicado, la presencia de estas proteínas es esencial para la formación de la espuma de cerveza. Lo que hace que estas proteínas de la cebada presenten tal actividad en la superficie de la cerveza es que estas proteínas de cebada experimentan una maduración estructural, que incluye la glicación, a través de la reacción de Maillard al maltear y en los procesos de

calentamiento durante la elaboración de la cerveza. En el caso de LTP1, otra modificación implica una acilación por un producto de la actividad de dos enzimas del embrión de cebada (es decir, lipoxigenasa y aleno óxido sintasa) en ácidos grasos poliinsaturados. Estas modificaciones estructurales aumentan el carácter anfifílico (o anfipático) de las proteínas y favorecen su propagación en las interfaces gas-líquido (Didier & Bénédicte, 2009).

3. OBJETIVOS

Las proteínas son uno de los principales macronutrientes claves para la alimentación humana, por lo que siempre han sido objeto de estudio, pero en los últimos años, los desarrollos de la proteómica, así como en la búsqueda de las mejoras funcionales que éstas pueden aportar, han provocado un creciente interés dentro de la industria y la tecnología alimentaria. Sumado al interés nutricional, dentro de la industria cervecera estas proteínas cobran una mayor importancia debido a las propiedades que aportan al producto, especialmente en lo referente a la formación y calidad de la espuma, así como en el tiempo de estabilidad de ésta, pero también por el aporte que suponen de aminoácidos libres, que se liberan durante el proceso de cocimiento y fermentación, así como su influencia en las etapas de filtrado y estabilidad de producto final.

Por este motivo, el objetivo principal del presente trabajo de fin de máster se centra en la revisión bibliográfica de las principales metodologías analíticas empleadas para la determinación de proteínas en los cereales que se emplean en su producción de la cerveza, abarcando los métodos de tratamiento de este tipo de muestras para la extracción de las proteínas, así como las técnicas instrumentales para su análisis y cuantificación.

Este estudio se ha centrado en concreto en dos cereales, la cebada y el amaranto. La cebada es la fuente de cereal más empleado en la producción de cerveza, principalmente malteada, aunque a veces también se añade en grano. Pero hoy en día, las nuevas técnicas cerveceras, así como el incremento de la industria artesana empuja a nuevos desarrollos y al empleo de nuevos ingredientes, entre los que el amaranto es un cereal de gran interés, dadas sus propiedades nutricionales y su elevado contenido en proteína. Este estudio de la proteína dentro de la industria cervecera cobra un mayor interés hoy en día, por la tendencia existente a reducir el peso de los productos de origen animal en la alimentación, por lo que para conseguir una dieta equilibrada resultarán necesarios nuevos aportes de proteína y aminoácidos de origen vegetal, donde la cerveza 0,0 será sin duda un recurso sabroso y saludable.

4. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN CEREALES

Los estudios encaminados a relacionar la cantidad, composición y estructura de las proteínas del cereal con las propiedades de uso del producto final han tenido un gran interés en la industria alimenticia. Para ello, en algunos casos conocer el nivel de proteína total de un cereal dado puede proporcionar información útil, pero los avances en proteómica han permitido fraccionar o separar las proteínas aportando un mayor conocimiento sobre estos procesos.

Durante muchos años, el contenido protéico de los alimentos se ha determinado en función del contenido de nitrógeno total. Para ello el método Kjeldahl es el universalmente empleado (AOAC, 2000). Una vez determinado dicho contenido, se multiplica por un factor para obtener el contenido de proteínas. Por lo que ello implica que los carbohidratos y las grasas del alimento no contienen nitrógeno, y que casi todo el nitrógeno está presente como aminoácidos en las proteínas. Teniendo esto en consideración, se determinó que el contenido medio de nitrógeno (N) de las proteínas era de alrededor del 16 por ciento, lo que llevó a utilizar el cálculo $N \times 6,25$ ($1/0,16 = 6,25$) para convertir el contenido de nitrógeno en contenido de proteínas.

Una limitación de esta aproximación es que no todo el nitrógeno de los alimentos se encuentra en las proteínas. También está contenido en cantidades variables de otros compuestos, como aminoácidos libres, nucleótidos, creatina y colina, y que se denomina nitrógeno no proteico. Sólo una pequeña parte de este nitrógeno está disponible para la síntesis de aminoácidos (no esenciales). En segundo lugar, el contenido de nitrógeno de determinados aminoácidos (en porcentaje del peso) varía en función del peso molecular del aminoácido y del número de átomos de nitrógeno que contiene (de uno a cuatro, según el aminoácido de que se trate). Por todo ello, se ha comprobado que el contenido de nitrógeno de las proteínas varía en realidad entre un 13 y un 19 por ciento, que darían factores de conversión de 7,69 y 5,26, respectivamente.

Dado que las proteínas están formadas por cadenas de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, pueden ser hidrolizadas a los aminoácidos que las componen, los cuales pueden ser medidos mediante técnicas cromatográficas de intercambio iónico, de líquidos o gas-líquido. De tal manera que la suma de los aminoácidos representará el contenido de proteínas (en peso) del alimento, y suele denominarse como "proteína verdadera". Su desventaja es que requiere un equipo más sofisticado que el método Kjeldahl pero que hoy en día están cada vez más implementados en los laboratorios.

Teniendo en cuenta que no existe un método oficial para la determinación de los aminoácidos en los alimentos, la (FAO, 2003) recomienda que las proteínas se midan como la suma de los residuos de aminoácidos individuales (el peso molecular de cada aminoácido menos el peso molecular del agua) más los aminoácidos libres, siempre que sea posible.

Alves y cols. (2019) recogen en su trabajo las principales etapas analíticas para la proteómica de los cereales y que se presenta en la Figura 10. En primer lugar es fundamental llevar a cabo una extracción adecuada de las proteínas teniendo en cuenta su solubilidad, tal como se ha comentado. Para ello, normalmente se requiere el uso de agentes reductores y desnaturalizantes (Alves, D'Almeida, Scherf, & Ferreira, 2019). La digestión enzimática es muy importante ya que la sensibilidad de los métodos depende del tamaño óptimo de los péptidos, teniendo en cuenta la capacidad de ser ionizados y fragmentados, a partir de los cuales se asignarán las proteínas. Después, los péptidos pueden ser separados por electroforesis o cromatografía líquida y posteriormente identificados.

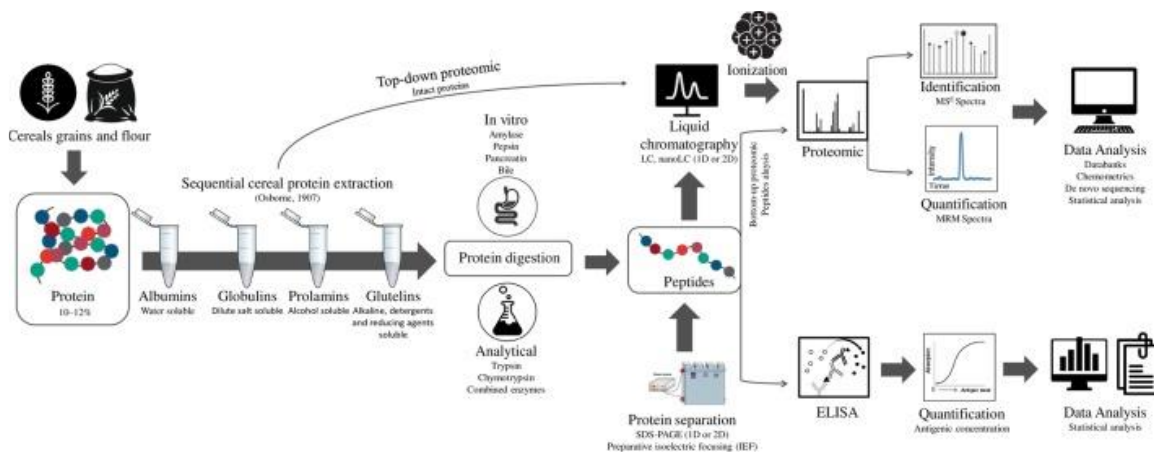


Figura. 10 Esquema general para el análisis proteómico de cereales [Alves y cols, 2019].

En este apartado se presentan los principales métodos de tratamiento de muestras recogidos en la bibliografía para la extracción de proteínas de cereales, centrándonos en la cebada y amaranto, así como las técnicas analíticas instrumentales empleadas para su determinación y cuantificación.

4.1. Métodos de Extracción de proteínas

La extracción se ha considerado uno de los pasos más importantes en el enfoque de la recuperación de bioactivos. Por esa razón, se han evaluado muchos procesos de extracción diferentes hacia la recuperación de los compuestos objetivo. La extracción con disolvente convencional ha sido la metodología más empleada para la recuperación de estos compuestos. Sin embargo, se está llevando a cabo una búsqueda de metodologías sostenibles, seguras y de bajo costo operativo para superar las desventajas de los métodos convencionales (Houde, Khodaei, Benkerroum, & Karboune, 2018).

A continuación, se abordan tantos métodos convencionales de extracción como las nuevas metodologías verdes.

4.1.1. Extracción alcalina

Es el método tradicional y más utilizado para extraer proteínas de las semillas. Este procedimiento de extracción de proteínas se realiza a partir de harina de

semilla desgrasada y consiste principalmente en la solubilización de proteínas en álcali diluido seguido de su precipitación isoelectrica en ácido diluido (López, Galante, Robson, Boeris, & Spelzini, 2018).

Se ha aplicado este tipo de extracción el aislamiento de las proteínas de amaranto y cebada. Así, Salcedo y cols. (2002) han llevado a cabo la optimización de la precipitación isoelectrica para obtener aislados de proteína de amaranto (API). La extracción se realizó en el rango de pH de 7,8 a 9,2, mientras que la precipitación ácida se realizó en el rango de 4,3 a 5,7. La solubilización demostró ser óptima a pH 8 o 9,2, mientras que el mejor pH de precipitación fue 5,7 (Salcedo, Osuna, Guevara, Domínguez, & Paredes, 2002).

Otros estudios encontraron que las proteínas de amaranto se solubilizaron a pH 9 u 11 a partir de harina desgrasada, y luego se precipitaron a pH 5. Los aislamientos obtenidos a pH 11 fueron menos solubles que los obtenidos a pH 9 (Avanza & Añón, 2007).

Houde y cols. (2018) realizaron la extracción alcalina convencional de la proteína de cebada a pH 11 y posteriormente la precipitación acida se realizó a pH 4,5. Alcanzaron un rendimiento de recuperación del concentrado del 51,4% con un contenido de proteínas del 68,9% (Houde, Khodaei, Benkerroum, & Karboune, 2018)

Wang y cols. (2010) realizaron la extracción alcalina de proteínas de cebada. Los resultados obtenidos demuestran que el nivel de pH desempeñó un papel importante en la determinación de la eficiencia y el contenido de extracción de proteínas; utilizando una disolución alcalina de pH 11,5, los contenidos de proteínas fueron del 70 al 75% (Wang, y otros, 2010).

4.1.2. Extracción enzimática

La aplicación de la extracción de proteínas asistida por enzimas se basa en la alteración de la integridad de las paredes celulares causada por la acción de enzimas específicas que degradan las celulosas, hemicelulosas y/o pectina, los componentes principales de las paredes celulares de las plantas y la fibra, así

como proteasas para hidrolizar parte de la proteína para aumentar su solubilidad (Pojić, Mišan, & Tiwari, 2018).

Para realizar la extracción enzimática Kurek y cols. (2018) utilizaron harina de amaranto y semilla entera, mezclando suavemente 10 g de este con 80 ml de tampón fosfato (20 mM, pH 6,8), luego se introdujo en la suspensión al 1% de Termamyl SC. La incubación a 75 °C se realizó en un baño de agua con agitación hasta la prueba negativa de yodo. Luego, la suspensión se enfrió a 60 °C y se ajustó a pH 7,5. Se añadieron 200 µl de proteasa a la suspensión para digerir la proteína y se dejó durante 30 minutos en un baño de agua con agitación. La suspensión se centrifugó, el sedimento se secó al vacío. Obteniendo como rendimiento de extracción 41,77% para la harina de amaranto y 42,22% para la semilla entera (Kurek, Karp, Wyrwisz, & Niu, 2018).

Mokrejs y cols. (2011) estudiaron los concentrados de proteínas a partir de harina de cebada desgrasada (*Hordeum vulgare L*) utilizando tratamientos enzimáticos. Los más suaves incluyeron un método bi-enzimático que involucra el uso de enzimas hidrolizantes de almidón, y un método tri-enzimático que usa el tratamiento bi-enzimático anterior seguido de digestión con glucanasa. El tratamiento bi-enzimático produjo un concentrado de proteína con el mayor contenido de proteína (49,0%), mientras que los obtenidos por el tratamiento tri-enzimático seguido de una etapa de precipitación isoeléctrica dieron el mayor rendimiento de recuperación de proteína (78,3%) (Mokrejs, Janacova, Kolomaznik, & Svoboda, 2011).

4.1.3. Extracción por micelización

Otro método, conocido como micelización, se basa en la capacidad de las proteínas para formar aglomerados con una estructura micelar. Esto tiene lugar disminuyendo la fuerza iónica de la solución en la que se solubilizan (López, Galante, Robson, Boeris, & Spelzini, 2018)

Cordero y cols. (2005) realizaron un estudio comparativo donde se ha aplicado la extracción por micelización para el amaranto. Las proteínas se extrajeron de la muestra desgrasada con NaCl 0,8 M a pH 7, durante 2 h a 35°C. Después de

la centrifugación, el sobrenadante se concentró por ultrafiltración, y luego se diluyó 1:12 con agua destilada. El concentrado se agitó durante 2 h a 25 °C. Las proteínas se recuperaron por centrifugación y luego se liofilizaron. Por otro lado, la precipitación isoeléctrica se realizó a partir de una suspensión de harina desgrasada de amaranto en agua, a pH 9. Después de agitar a 25 °C durante 2 h, la suspensión se centrifugó a 4 °C, y el sobrenadante se precipitó a pH 4,5. El precipitado se resuspendió en agua, se ajustó a pH 7 y se liofilizó. Los autores concluyeron que el aislamiento de proteínas por esta metodología de micelización condujo a un contenido y rendimientos más bajos de proteínas, siendo menos solubles que los obtenidos por precipitación isoeléctrica. Sin embargo, se ha resaltado una menor desnaturalización de las proteínas como una ventaja del procedimiento de micelización (Cordero, Osuna, Borodanenko, & Paredes, 2005).

4.1.4. Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

La extracción asistida por ultrasonido (EAU) es otra técnica ampliamente utilizada, y es relativamente fácil de usar, versátil y requiere una inversión baja en comparación con otras técnicas de extracción. Los fenómenos de cavitación acústica producidos por los efectos de la radiación de ultrasonidos y la mezcla mecánica son los principales mecanismos en la EAU. La cavitación implica mecanismos independientes o combinados entre fragmentación, erosión, capilaridad, detexturación y sonoporación. Todos estos procesos causan disrupción celular, alta penetración de disolventes y reducción del tamaño de partícula, aumentando la eficiencia de extracción y reduciendo el tiempo de extracción (Peña & Tobiszewski, 2017). Los efectos físicos del ultrasonido están asociados con frecuencias más bajas (20–100 kHz), mientras que los efectos químicos dominan las frecuencias más altas (200–500 kHz) (Tiwari, 2015).

La actividad biológica de los compuestos bioactivos depende en gran medida de las condiciones de la EAU, como son la temperatura, el tipo de disolvente y el tiempo de extracción (Carrillo, Aguilar, Vernon, Jiménez, & Cruz, 2017). Esta técnica se ha empleado con éxito para la extracción de diferentes compuestos.

Para la extracción por ultrasonido Kurek y cols. (2018) utilizaron harina de amaranto y semilla entera, mezclando suavemente 10 g de esta con 80 ml de tampón fosfato (20 mM, pH 6,8). Luego, la mezcla se sometió a ultrasonidos a 50°C durante 7 minutos en un baño de agua. El poder de la ultrasonicación fue de 150 W a una frecuencia de 37 kHz. Luego, la suspensión se centrifugó, el sedimento se secó al vacío. Obteniendo como rendimiento de extracción 25,28% para la harina de amaranto y 32,21% para la semilla entera (Kurek, Karp, Wyrwicz, & Niu, 2018).

Xijuan y cols. (2013) estudiaron las condiciones de extracción de proteínas de la cebada sin cáscara, empleando EAU. Aplicaron un diseño de experiencias ortogonal para la optimización. Los resultados mostraron que las condiciones óptimas de extracción fueron las siguientes: proporción sólido-líquido 1: 22, pH 10,5, potencia ultrasónica 550 W, tiempo de extracción ultrasónica 20 min a temperatura ambiente. Con estas condiciones, el rendimiento y la pureza de la proteína alcanzaron valores hasta 93,15% y 78,67%, respectivamente (Xijuan, Bin, Kunlun, Dezhao, & Xinhong, 2013)

4.1.5. Extracción por microondas (MAE)

La extracción por microondas (MAE) es una metodología adecuada para extraer bioactivos de matrices alimentarias. Esta técnica utiliza directamente la energía de la radiación de microondas para calentar las moléculas dentro de la estructura del material, aumentando la presión interna y facilitando la división de los analitos de la muestra en el disolvente. En comparación con las técnicas de extracción tradicionales, se puede obtener una reducción significativa en el tiempo de extracción. El agua, el etanol, el metanol o una combinación de estos disolventes se usan generalmente como extractantes (Etxabide, Garrido, Uranga, Guerrero, & Caba, 2018).

Esta metodología ha sido aplicada para la extracción de aminoácidos de semillas de amaranto (y otros pseudocereales). Los autores digieren una pequeña cantidad de muestra (30 mg) con 1 mL de HCl 6N (conteniendo 0,5 % de fenol), en un tiempo total de digestión de 30 min a una temperatura máxima de 160 °C.

Los autores destacan que este método de microondas utilizado crea un medio inerte y anaeróbico (atmósfera de vacío en un medio de nitrógeno) que impide la oxidación y degradación de los aminoácidos, especialmente en el caso de la cisteína y la metionina (Mota, y otros, 2016).

4.2. Técnicas instrumentales para el análisis de proteínas

Conocer el nivel de proteína total de un cereal dado puede proporcionar información útil, pero se puede aprender mucho más fraccionando o separando las proteínas que están presentes. Esto se puede hacer mediante una extracción selectiva de las proteínas empleando diversos disolventes. Para las proteínas de cereales, prácticamente todos los esquemas de separación se basan en el trabajo pionero de Osborne (Bean & Lookhart, 2000).

Si bien es ampliamente utilizado y, en su mayor parte, es un esquema de clasificación útil de las proteínas, hoy en día se reconoce que generalmente se produce una superposición considerable entre las clases de proteínas Osborne. Debido a esto, se han desarrollado esquemas de separación alternativos para muchos cereales.

No obstante, aunque la extracción selectiva con disolventes puede proporcionar respuestas útiles, a menudo no produce clases de proteínas “puras” y solo proporciona información cuantitativa limitada. Por lo que es necesario emplear técnicas de mayor resolución, que incluso permiten determinar cambios en la composición de proteínas en diversos procesos biológicos y tecnológicos.

A continuación, se comentan las principales técnicas empleadas.

4.2.1. Electroforesis

La electroforesis es un método importante utilizado para la caracterización de las proteínas de almacenamiento de semillas. Independientemente de los métodos de extracción que se utilicen, los posteriores análisis por electroforesis son inevitables para identificar diferentes clases de proteínas y su patrón de peso molecular. Estos análisis no solo ayudan a identificar las fracciones de proteínas

a nivel individual, sino que también a dilucidar la complejidad y el solapamiento entre varias fracciones de proteínas, su tamaño y solubilidad (Sunilkumar & Tareke, 2019).

Inicialmente, el método estándar para estudiar el proteoma de una célula, tejido u organismo era mediante el uso de electroforesis bidimensional (2-DE). La primera dimensión implica el enfoque isoeléctrico; las proteínas permanecen cargadas en todos los valores de pH que no sean su punto isoeléctrico (pI) y cuando se aplica un potencial eléctrico al gel, que normalmente contiene un gradiente de pH inmovilizado (una tira de IPG), las proteínas migran a su punto isoeléctrico (Colgrave, Goswami, Howitt, & Tanner, 2013).

La segunda dimensión implica la electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE). Se introdujo por primera vez para la separación de proteínas de trigo por Bietz y Wall. Desde ese momento, SDS-PAGE se ha utilizado ampliamente para la separación de proteínas de todos los cereales. SDS-PAGE proporciona un método de alto rendimiento y coste relativamente bajo para analizar proteínas de cereales (Bean & Lookhart, 2000). El resultado final es un mapa bidimensional de manchas de proteínas, con cada proteína resuelta a un conjunto particular de coordenadas, que dependen del punto isoeléctrico (pI) y el peso molecular (MW). La ubicación de la proteína se visualiza mediante la tinción de las proteínas con una variedad de colorantes reactivos de proteínas, tales como azul de Coomassie o iones plata. Las manchas de proteínas en geles se pueden detectar y eliminar automáticamente del gel para su posterior análisis basado en espectrometría de masas (MS) de alto rendimiento (Colgrave, Goswami, Howitt, & Tanner, 2013).

Acosta y cols. (2016) realizaron la SDS-PAGE del aislado de proteína de amaranto usando un gel de poli(acrilamida) al 4-12% en un sistema de electroforesis (Acosta, Carpio, Vilcacundo, & Carrillo, 2016). Las bandas de polipéptidos se tiñeron en azul brillante Coomassie R-250 durante 12 h. Las masas moleculares relativas de proteína se determinaron mediante una comparación con marcadores de peso molecular (MW) y el software de Chemidoc. Como resultado obtuvieron que las globulinas y albúminas son las

principales fracciones proteicas en las semillas de amaranto. Las proteínas de almacenamiento predominante son las globulinas 7S y 11S. Las 7S presentan peso molecular de 41-45 kDa y la globulina 11S tiene dos subunidades que consisten en un polipéptido ácido (AS) (33-36 kDa) y un polipéptido básico (AB) (16-19 kDa). Las albúminas 2S se han descrito como una banda de bajo MW cerca de 6-10 kDa (Acosta, Carpio, Vilcacundo, & Carrillo, 2016).

Extractos de proteínas de semilla de cebada han sido analizados mediante electroforesis (SDS-PAGE) para establecer la distribución del peso molecular (Houde, Khodaei, Benkerroum, & Karboune, 2018). La electroforesis se realizó a 120 mV utilizando los marcadores de peso molecular de amplio rango. Los geles se tiñeron durante 2 h en una solución de Coomassie Blue R250 y el análisis cuantitativo de banda se realizó con el software AlphaView SA. Los resultados muestran que las proteínas de cebada extraídas por el método alcalino estaban dominadas en gran medida (~70%) por la fracción de bajo peso molecular con valores < 20 kDa. No obstante, la extracción de proteínas de alto peso molecular (por ejemplo, hordeínas) en cantidades más altas en comparación con proteínas de bajo peso molecular (por ejemplo, globulina y albúmina) por medio de métodos alcalinos que ya se había obtenido con anterioridad (Bilgi & Celik, 2004).

Los patrones electroforéticos de las diferentes fracciones de proteína de las semillas de amaranto se obtuvieron en condiciones de desnaturalización mediante esta técnica, encontrando que la fracción de albúmina era la principal fracción de las proteínas del amaranto (Barba de la Rosa, y otros, 2009)

4.2.2. Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas es una técnica ampliamente utilizada para caracterización y cuantificación de las proteínas, que se está implementando en las industrias de alimentos y bebidas. Los análisis de proteínas mediante espectrometría de masas pueden hacerse con un enfoque no selectivo y selectivo. Los enfoques no selectivos tienen por objeto establecer un perfil completo del proteoma de la muestra y el análisis selectivo permite seleccionar

y estudiar moléculas específicas en la muestra (Saghatelian & Cravatt, 2005). En esta técnica se requiere una fuente para ionizar la muestra e introducirla en el sistema. Los iones son separados mediante un analizador de masas de acuerdo con su relación masa-carga (m/z) y posteriormente detectados.

La fuente de ionización influye considerablemente en el análisis, ya que existen muchas técnicas de ionización y cada una de ellas tiene sus ventajas y aplicaciones ideales. La selección de la técnica de ionización ideal debe hacerse sobre la base de la estructura del analito de interés, así como de la aplicación deseada. Se han utilizado varias técnicas de ionización con la espectrometría de masas, entre ellas la ionización por electrospray (ESI), la ionización química a presión atmosférica (APCI), la fotoionización a presión atmosférica (APPI) y la ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI). Para la fuente de iones, es importante ser eficiente, pero al mismo tiempo sensible y "suave", para evitar la destrucción del analito por fragmentación no deseada en la fuente (Lovric, 2011). De éstas, las técnicas más utilizadas en proteómica son ESI y MALDI ya que en ambos casos se obtiene una ionización suave que mantiene intacto el analito desde la ionización hasta su conversión a fase gaseosa.

Brevemente, MALDI es un método en el que un rayo láser desorbe e ioniza las muestras en presencia de la matriz. Las moléculas de la matriz rodean las moléculas del analito y absorben la máxima energía láser, transformándola en energía de excitación para la muestra y transfiriendo así suavemente esta energía a la muestra. Se minimizan los daños en la muestra y la fragmentación de los iones. Esta técnica surgió como una alternativa para caracterizar las proteínas de almacenamiento de trigo debido a su robustez y capacidad para ionizar proteínas intactas y tolerar la presencia de contaminantes, como los detergentes (SDS) utilizados comúnmente para la extracción de proteínas (Ferreira, y otros, 2014). Sin embargo, esta técnica no se puede asociar directamente a la cromatografía de líquidos.

En el ESI, los iones se transfieren de la solución a la fase gaseosa mediante energía eléctrica, generando una fina niebla de iones que se pulveriza en un espectrómetro de masas. Esta técnica ioniza las moléculas directamente de la

solución y por lo tanto puede ser fácilmente interconectada con los métodos de separación por cromatografía de líquidos. De esta forma la ESI es una técnica poderosa para el análisis de mezclas complejas de proteínas y péptidos que se benefician de la separación cromatográfica, que se comentará en el siguiente apartado.

Después de la ionización, los iones entran en el analizador de masa. Las combinaciones más comunes de las técnicas de ionización con analizadores de masa son el Tiempo de Vuelo (TOF) acoplado a MALDI y el triple cuadrupolo (QQQ), cuadrupolo -TOF (Q-TOF) o trampa de iones (IT) acoplado a ESI. Los analizadores de resonancia ciclotrónica de iones por transformada de Fourier (FTICR) pueden combinarse con fuentes de iones tanto de MALDI como de ESI. Los analizadores de masa difieren en sensibilidad, resolución, exactitud de la masa y la capacidad de fragmentar los iones peptídicos (Laštovičková & Bobálová, 2012).

El analizador comúnmente usado es el TOF, que mide el tiempo de vuelo de los iones desde que son acelerados, por la fuente, hasta que impactan en el detector. El detector de masas recepta los iones y se produce un espectro, específico para cada analito que se compara con una base de datos (Salplachta & Bobalova, 2009). Esta técnica permite determinar la masa de los péptidos resultantes de la digestión enzimática de proteínas en gel, generando un espectro denominado huella dactilar peptídica de masas. Las prolaminas de gluten intactas en los alimentos se caracterizaron y cuantificaron por primera vez utilizando espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización por láser asistida en matriz (MALDI-TOF-MS) (Mendez, 1995).

También se utiliza la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Esta técnica combina dos espectrómetros de masas y al final de la segunda espectrometría se obtienen iones que son producto de un precursor originario de la primera espectrometría. Se suele emplear cuando la identificación MALDI-TOF-MS no permite obtener secuencias similares a las conocidas. Esto ocurre con muestras complejas, en las que los péptidos identificados se seleccionan y se someten a fragmentación para descifrar la secuencia de aminoácidos, lo que permite la

identificación de secuencias que difieren entre sí por un solo aminoácido (Graves & Haystead, 2002).

La aplicación de la técnica MALDI-TOF-MS a la proteómica, junto con la disponibilidad de bases de datos y el desarrollo de herramientas informáticas ha supuesto un gran avance en la identificación de proteínas. En este sentido, diversas instituciones y organismos, como son el Instituto Suizo de Bioinformática (SIB), el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) y el grupo de Recursos de Información sobre Proteínas (PIR), con el fin de proporcionar a la comunidad científica una base de conocimientos de alta calidad sobre las proteínas han creado el consorcio UniProt en 2002 (Uniprot, 2002).

4.2.3. Cromatografía de Líquidos

La cromatografía se ha utilizado para el aislamiento y caracterización de las proteínas de los cereales desde la década de 1960. A principios de 1980 se desarrollaron métodos cromatográficos que proporcionaron separaciones superiores a las alcanzadas anteriormente. Las propiedades de carga, el tamaño y las diferencias de PI de las proteínas se han utilizado con éxito para la separación mediante métodos cromatográficos (Sunilkumar & Tareke, 2019). La separación por el fraccionamiento de Osborne es muy utilizada en la cromatografía en columna, por ser una separación secuencial a través de disolventes afines con las proteínas.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una de las principales técnicas instrumentales empleadas para la caracterización de las proteínas en general (Sunilkumar & Tareke, 2019). Una de las principales ventajas es su resolución en comparación con la cromatografía en columna y la electroforesis convencional. Se puede obtener una excelente reproducibilidad y recuperación de los analitos de interés gracias al riguroso control y precisión del sistema.

Barba de la Rosa y cols. (2009) determinaron los aminoácidos en harina de semillas de amaranto mediante HPLC de fase reversa, empleando un detector de fluorescencia (Barba de la Rosa, y otros, 2009). También se ha llevado a cabo la determinación de aminoácidos en semillas de amaranto en un sistema UPLC

(cromatografía de líquidos con ultra alta resolución) con detector de matriz de fotodiodos, alcanzando la separación de 77 aminoácidos, con una buena resolución, en 10 min. Normalmente serían necesarios 60 min empleando HPLC (Mota, y otros, 2016).

Hoy en día la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) es una de las herramientas más importante para la identificación y cuantificación de las proteínas de los cereales (Alves, D'Almeida, & Ferreira, Determination of Gluten Peptides Associated with Celiac Disease by Mass Spectrometry, 2017). La aplicación de los métodos de LC-MS permite identificar la especie del cereal, la subunidad de la proteína, y cuantificar miles de péptidos y proteínas en el mismo experimento. La ventaja de esta técnica sobre otras, es que el análisis de aminoácidos no requiere una derivatización previa. Además, esta técnica híbrida aumenta la velocidad de los análisis, lo que permite analizar un gran número de muestras en un corto período de tiempo.

Nimbalkar y cols. (2012) llevaron a cabo el primer estudio de los aminoácidos libres en semillas de amaranto mediante LC-MS/MS, obteniendo una contribución de 18 aminoácidos incluyendo 8 aminoácidos esenciales. También pudieron constatar que esta semilla es rica en lisina y en aminoácidos que contiene azufre (Nimbalkar, Pai, Pawar, Oulkar, & Dixit, 2012).

Jira y Münch (2019) utilizaron LC-ESI-MS/MS para la detección simultánea de EM de las seis especies de granos más importantes (cebada, maíz, avena, arroz, centeno y trigo) en productos cárnicos basados en péptidos marcadores (Jira & Münch, 2019). Una versión miniaturizada de ESI, denominada nanospray, se ha convertido en el método preferido para introducir péptidos grandes en el espectrómetro de masas en caso de que se sospeche que el contenido de péptidos es bajo o muy bajo. El nanoLC-ESI-MS/MS fue eficiente para identificar 29 péptidos inmunogénicos de la harina de trigo que llevan un alto número de epítomos (Alves, D'Almeida, Scherf, & Ferreira, 2019). Las gotas producidas a partir del nanoESI son más pequeñas que en la ESI convencional (del orden de unos pocos cientos de nanómetros), lo que mejora enormemente la sensibilidad y explica el predominio de esta técnica en la proteómica cuantitativa a gran

escala. Empleando este sistema, Salvado-Albarrán y cols. (2015) han demostrado que el uso de digestión con tripsina es adecuada para distinguir hordeínas β y γ en malta de cebada, mientras que el uso de digestión secuencial con quimotripsina y tripsina favoreció la identificación de hordeínas C en semilla seca (Salgado-Albarrán, Herrera-Díaz, & Dinkova, 2015).

Por último, hay que destacar como señalan Sunilkumara y Tarekealos (2019), los métodos analíticos desarrollados para el análisis de proteínas y aminoácidos necesitan una validación más completa usando enfoques moleculares y biotecnológicos. Por lo que cada vez es más necesario combinar técnicas analíticas sofisticadas con la ciencia y tecnología de los cereales para poder alcanzar una mayor armonización de los métodos de determinación de las proteínas de cereales. De esta manera se conseguirá, además, un aumento de la sensibilidad analítica (Sunilkumar & Tareke, 2019).

4.2.4. Otras técnicas instrumentales

Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

El análisis mediante espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) se emplea de forma complementaria y confirmatoria en el estudio de proteínas. Este método ha demostrado ser el mejor para la comparación de estudios y para vigilar el cambio de las estructuras secundarias (Sunilkumar & Tareke, 2019).

El análisis de estructura secundaria de proteína de cebada ha sido realizada mediante FTIR (Houde, Khodaei, Benkerroum, & Karboune, 2018). Los autores concluyeron que la composición de la estructura secundaria de los concentrados de proteína de cebada era variable dependiendo del tipo de cebada y de los métodos de extracción. Por ejemplo, el concentrado de proteína de cebada sin cáscara obtenido mediante la adición de celulosa y aplicando calor estaba compuesto por un 45% de láminas β , 20% de hélice α y 35% de giros β .

Espectroscopía de fluorescencia

Existen numerosas referencias sobre el uso de la espectroscopía de fluorescencia para estudiar la estructura de las proteínas. La aplicación de esta técnica se basa en que hay tres residuos de aminoácidos, Fenilalanina (Phe), Tirosina (Tyr) y Triptófano (Trp), que contribuyen a la fluorescencia UV de las proteínas. Sin embargo, Trp domina la emisión en las proteínas, ya que absorbe a la longitud de onda más larga y muestra el mayor coeficiente de extinción. Además, la energía absorbida por Phe y Tyr generalmente se transfiere a los residuos Trp de la misma proteína. En la mayoría de los estudios, la fluorescencia de proteínas a menudo se excita cerca de 280 nm o en longitudes de onda más largas y, como resultado, Phe no se excita (López, Galante, Robson, Boeris, & Spelzini, 2018).

La estructura de la fracción soluble de proteínas de amaranto se estudió por espectroscopía de fluorescencia (obtenido por solubilización a pH 9 y precipitación a pH 5) a pH 7,5, excitada a 290 nm, y mostró su longitud de onda de emisión máxima a 345 nm (Ventureira, Martínez, & Añón, 2012). La desnaturalización ácida de este aislado de amaranto dio como resultado una disminución en la emisión de fluorescencia y un desplazamiento hacia el rojo en la longitud de onda máxima (a 353 nm).

El efecto del pH sobre las proteínas de amaranto solubilizadas a pH 9 y 11 también se ha analizado mediante espectroscopía de fluorescencia (Abugoch, Romero, Tapia, Silva, & Rivera, 2008). La intensidad de fluorescencia aumentó con el aumento del pH en ambas muestras. Los autores establecieron que esto podría deberse a cambios conformacionales o a la solubilización de nuevas especies de proteínas. Solo en el caso de proteínas solubilizadas a pH 9, se observó un cambio significativo en el rojo de la mayor longitud de onda de emisión a pH ácido, que se atribuye a una mayor exposición de Trp al disolvente.

Para el caso de la cebada Houde y cols. (2018) realizaron el análisis de la estructura terciaria utilizando también la espectroscopia de fluorescencia. Los resultados sobre el comportamiento del concentrado de cebada en la extracción

alcalina registraron valores de intensidad bajos, que oscilaron entre 462 nm y 1476 nm. Para el rango de longitudes de onda estudiadas se observaron efectos opuestos tras la exposición a alta presión o desnaturalización térmica. El tratamiento a alta presión causó una disminución en la intensidad de fluorescencia, que, por el contrario, aumentó con el tratamiento térmico. En comparación con las muestras nativas, la intensidad de fluorescencia máxima se redujo en un 46,3% en muestras tratadas con alta presión, y aumentó en un 71,6% en las muestras desnaturalizadas térmicamente (Houde, Khodaei, Benkerroum, & Karboune, 2018).

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencia de barrido (DSC) es una técnica termoanalítica empleada para estudiar la estabilidad de las proteínas en su forma nativa y observar los cambios que se producen en las proteínas cuando se calientan. Los cambios en el ancho del pico en las medidas DSC debido a un aumento o disminución de la temperatura son suficientes para comprender si la proteína precalentada ha asumido una estructura con mayor estabilidad térmica o no. Es muy adecuada para la caracterización de las proteínas vegetales que no son fácilmente solubles en tampones acuosos (Sunilkumar & Tareke, 2019).

En los últimos años se ha estudiado la extracción de proteína para el amaranto con calorimetría diferencial de barrido (DS) analizando su efecto sobre la estabilidad térmica de las fracciones de proteínas. Se han encontrado dos picos endotérmicos para API, de aproximadamente 75 °C, y cerca de 100 °C, sin observarse diferencias significativas entre las temperaturas máximas de desnaturalización. La fracción de albúmina mostró un pico a 64 °C; sin embargo, este valor, que es la fracción principal, no es representativo del comportamiento del aislado de proteína (Ventureira, Martínez, & Añón, 2012), (Condés, Speroni, Mauri, & Añón, 2012), (Bolontrade, Scilingo, & Añón, 2013).

5. CONCLUSIONES

Esta revisión bibliográfica proporciona una descripción general de la investigación publicada recientemente sobre las principales metodologías analíticas empleadas para la determinación de proteínas en la cebada y el amaranto, abarcando los métodos de tratamiento de este tipo de muestras para la extracción de las proteínas, así como las técnicas instrumentales para su análisis y cuantificación.

Los granos de amaranto contienen mayores cantidades de aminoácidos esenciales que los granos de cebada; sin embargo, se ha encontrado una variabilidad significativa en el perfil de aminoácidos así como en los productos de fraccionamiento de las proteínas entre los artículos revisados.

El método más ampliamente estudiado para el aislamiento de proteínas es la extracción alcalina seguida de precipitación isoelectrica. Además, se han ensayado varias condiciones (pH, fuerza iónica y sales) en el aislamiento de proteínas de amaranto y cebada. Sin embargo, se está llevando a cabo una búsqueda de metodologías sostenibles, seguras y de bajo costo operativo para superar las desventajas de los métodos convencionales.

En la literatura, la electroforesis es ampliamente utilizada para establecer los patrones de los aminoácidos. La cromatografía líquida se utiliza principalmente para el análisis simultáneo de aminoácidos y aminos en semillas de cereales, independientemente del método de extracción utilizado. Y hoy en día destaca el empleo de la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) como una de las herramientas más importante para la identificación y cuantificación de las proteínas de los cereales.

Además, la mayoría de los estudios de proteómica se basan en una combinación de separación cromatográfica y electroforética con técnicas de degradación enzimática o química y de espectrometría de masas. Por lo que en la revisión realizada se comprueba la necesidad de emplear esta combinación de técnicas para obtener una información fiable y completa sobre la identificación, caracterización y cuantificación de aminoácidos en este tipo de muestras.

CONCLUSIONS

This literature review provides an overview of the recently published research on the main analytical methodologies used for the determination of proteins in barley and amaranth, including methods of processing such samples for protein extraction, as well as instrumental techniques for their analysis and quantification.

Amaranth grains contain higher amounts of essential amino acids than barley grains; however, significant variability has been found in the amino acid profile as well as in protein fractionation products among the revised articles.

The most widely studied method for protein isolation is alkaline extraction followed by isoelectric precipitation. In addition, several conditions (pH, ionic strength and salts) have been tested in the isolation of amaranth and barley proteins. However, a search for sustainable, safe and low-cost operating methodologies is under way to overcome the disadvantages of conventional methods.

In the literature, electrophoresis is widely used to establish amino acid patterns. Liquid chromatography is mainly used for the simultaneous analysis of amino acids and amines in cereal seeds, regardless of the extraction method used. Today, the use of liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) stands out as one of the most important tools for the identification and quantification of cereal proteins.

In addition, most proteomics studies are based on a combination of chromatographic and electrophoretic separation with enzymatic or chemical degradation techniques and mass spectrometry. Therefore, the review shows the need to use this combination of techniques to obtain reliable and complete information on the identification, characterization and quantification of amino acids in this type of samples.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abugoch, L., Romero, N., Tapia, C., Silva, J., & Rivera, M. (2008). Study of some physicochemical and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) protein isolates. *J. Agric. Food Chem.*, *56* (12), 4745-4750.
- Acosta, C., Carpio, C., Vilcacundo, R., & Carrillo, W. (2016). Identification of proteins isolate from amaranth (*amaranthus caudatus*) by sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis with water and NaCl 0,1 M solvents. *Asian Journal of Pharmaceutical and clinical research*, Vol. 9, 331-334.
- Alves, T., D'Almeida, C., Scherf, K., & Ferreira, M. (2019). Modern Approaches in the Identification and Quantification of Immunogenic Peptides in Cereals by LC-MS/MS. *Front Plant Sci.* *10*, 1470, 1-13.
- Alves, T., D'Almeida, C., & Ferreira, M. (2017). Determination of Gluten Peptides Associated with Celiac Disease by Mass Spectrometry. *Celiac Disease and Non-Celiac Gluten Sensitivity*, 43-58.
- Amagliani, O'Regan, Kelly, & O'Mahony. (2017). The composition, extraction, functionality and applications of rice proteins: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 1-12.
- Anderson, E., Santos, I., Hildenbrand, Z., & Schug, K. (2019). A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control. *Analytica Chimica Acta*, *1085*, 1-20.
- AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis*. Gaithersburg, Maryland, USA.: 17th ed.
- Arendt, E. (2013). Cereal Grains for the Food and Beverage Industries || Barley. *Woodhead Publishing Limited*, 155-200.
- Avanza, & Añón. (2007). Effect of thermal treatment on the proteins of amaranth isolates. *J. Sci. Food Agric*, 616-623.
- Barba de la Rosa, A., Fomsgaard, I., Laursen, B., Mortensen, A., Olvera-Martínez, L., Silva-Sánchez, C., . . . León-Rodríguez, A. (2009). Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science*, *49*, 1, 117-121.
- Barba de la Rosa, A., Gueguen, J., Paredes-Lopez, O., & Viroben, G. (1992). Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins. *J. Agric. Food Chem*, *40*, 931-936.
- Bean, S., & Lookhart, G. (2000). Electrophoresis of cereal storage proteins. *Journal of Chromatography A*, *881*, 23-36.

- Bilgi, & Celik. (2004). Solubility and emulsifying properties of barley protein concentrate. *Eur Food Res Technol*, 437-441.
- Bobalova, J., & Chmelik, J. (2007). Proteomic identification of technologically modified proteins in malt by combination of protein fractionation using convective interaction media and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1163, 80-85.
- Bolontrade, Scilingo, & Añón. (2013). Amaranth proteins foaming properties: Adsorption kinetics and foam formation—Part 1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 319-327.
- Boutaoui, Zaiter, Benayache, Carradori, Cesa, Giusti, . . . Innosa. (2018). Qualitative and quantitative phytochemical analysis of different extracts from *Thymus algeriensis* aerial parts. *Molecules*, 463.
- Byung-Kee, B., & Steven, E. (2008). Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of Cereal Science*, 48, 233-242.
- Carrillo, Aguilar, Vernon, Jiménez, & Cruz. (2017). Extraction of phenolic compounds from *Satureja macrostema* using microwave-ultrasound assisted and reflux methods and evaluation of their antioxidant activity and cytotoxicity. *Industrial Crops and Products*, 213-221.
- Chmelík, Z., Snejdřlová, M., & Vrablík, M. (2019). Amaranth as a potential dietary adjunct of lifestyle modification to improve cardiovascular risk profile. *Nutrition Research*, 72, 36-45.
- Colgrave, M., Goswami, H., Howitt, C., & Tanner, G. (2013). Proteomics as a tool to understand the complexity of beer. *Food Research International*, 54, 1001-1012.
- Condés, M., Speroni, F., Mauri, A., & Añón, M. (2012). Physicochemical and structural properties of amaranth protein isolates treated with high pressure. *Innov. Food Science Emerg. Technology*, 14, 11-17.
- Cordero, Osuna, Borodanenko, & Paredes. (2005). Physicochemical and functional characterisation of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates obtained by isoelectric precipitation and micellisation. *Food Science and Technology International*, 269-280.
- Dhillon, G., Kaur, S., Oberoi, H., Spier, M., & Brar, S. (2016). Agricultural-Based Protein By-Products: Characterization and Applications. *Protein Byproducts*, 21-36.
- Didier, & Bénédicte. (2009). Soluble Proteins of Beer. *Beer in Health and Disease Prevention*, 265-271.

- Etxabide, Garrido, Uranga, Guerrero, & Caba, d. I. (2018). Extraction and incorporation of bioactives into protein formulations for food and biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2094-2105.
- FAO. (2003). Obtenido de Food and Agriculture organization of the United Nations, Rome.: <http://www.fao.org/3/Y5022E/y5022e03.htm>
- FAO. (2018). Obtenido de Food and Agriculture organization of the United Nations, Rome.: <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro01/Cap1.htm>
- Ferreira, M., Mangavel, C., Rogniaux, H., Bonicel, J., Samson, M., Morel, & M. (2014). A MALDI-TOF based study of the in-vivo assembly of glutenin polymers of durum wheat. *Food Res. Int.* 63, 89-99.
- Finnie, C., & Svensson, B. (2009). Barley seed proteomics from spots to structures. *Journal of Proteomics*, 72, 315-324.
- Fontana, M., & Buiatti, S. (2009). Amino Acids in Beer. *Beer in Health and Disease Prevention*, 273-284.
- González, J., De Lira, R., Carrizales, R., & Martínez, J. (2013). PERSPECTIVAS DE NUEVOS PRODUCTOS A BASE DE AMARANTO: CERVEZA ARTESANAL DE AMARANTO. *Revista Académica de Investigación*. No. 14.
- Graves, P., & Haystead, T. (2002). Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 (1), 39-63.
- Hernández, M., & Sastre, A. (1999). *Tratado de Nutrición*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- Houde, Khodaei, Benkerroum, & Karboune. (2018). Barley protein concentrates: Extraction, structural and functional properties. *Food Chemistry*, 367-376.
- Jira, W., & Münch, S. (2019). A sensitive HPLC-MS/MS screening method for the simultaneous detection of barley, maize, oats, rice, rye and wheat proteins in meat products. *Food Chem.* 275, 214-223.
- Kurek, M., Karp, S., Wyrwicz, J., & Niu, Y. (2018). Physicochemical properties of dietary fibers extracted from gluten-free sources: quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthus caudatus*) and millet (*Panicum miliaceum*). *Food Hydrocolloids*, 85, 321-330.
- Laštovičková, M., & Bobálová, J. (2012). MS based proteomic approaches for analysis of barley malt. *Journal of Cereal Science*, 56, 3, 519-530.
- Li, Q., Wang, J., & Liu, C. (2017). Beers. *Jiangnan University*, 305-351.
- Limure, T., & Sato, K. (2013). Beer proteomics analysis for beer quality control and malting barley breeding. *Food Research International*, 54, 1-8.

- López, D., Galante, M., Raimundo, G., Spelzini, D., & Boeris, V. (2019). Functional properties of amaranth, quinoa and chia proteins and the biological activities of their hydrolyzates. *Food Research International*, 116, 419-429.
- López, D., Galante, M., Robson, M., Boeris, V., & Spelzini, D. (2018). Amaranth, quinoa and chia protein isolates: Physicochemical and structural properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 152-159.
- López, S., Chevez, M., & Serrano, P. (2006). *Estudio Preliminar de parámetros físicoquímicos de cervezas de consumo nacional*. León: Universidad nacional autónoma de Nicaragua-León.
- Lovric, J. (2011). Introducing proteomics: from concepts to sample separation mass spectrometry and data analysis. *John Wiley & Sons*. 296.
- Mahajan, & Dua. (2002). Salts and pH induced changes in functional properties of amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) seed meal. *Cereal Chemistry*, 834-837.
- Matías, G., Hernández, B., Peña, V., Torres, N., Espinoza, V., & Ramírez, L. (2018). Usos actuales y potenciales del Amaranto (*Amaranthus* spp.). *JONNPR*, 3, 423-436.
- Mendez, E. e. (1995). Direct Identification of Wheat Gliadins and Related Cereal Prolamins by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom*, S123-S128.
- Mokrejs, Janacova, Kolomaznik, & Svoboda. (2011). Modeling isolation of Amaranth protein by enzymatic breakdown of polysaccharides. *Rasayan J. Chem*, 180-188.
- Mota, C., Santos, M., Mauro, R., Samman, N., Matos, S., Torres, D., & Castanheira, I. (2016). Protein content and amino acids profile of pseudocereals. *Food Chemistry*, 193, 55-61.
- Nimbalkar, M., Pai, S., Pawar, N., Oulkar, D., & Dixit, G. (2012). Free amino acid profiling in grain Amaranth using LC-MS/MS. *Food chemistry*, 134, 4, 2565-2569.
- Pearce, & Kinsella. (1978). Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of agricultural and food chemistry*, 716-723.
- Peña, & Tobiszewski. (2017). The Application of Green Solvents in Separation Processes. *Elsevier*.
- Petry-Podgórska, I., Zídková, J., Flodrová, D., & J., B. (2010). 2D-HPLC and MALDI-TOF/TOF analysis of barley proteins glycosylated during brewing. *Journal of Chromatography B*, 878, 3143-3148.

- Pojjić, Mišan, & Tiwari. (2018). Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. *Trends in Food Science & Technology*, 93-104.
- Rivas, M., Herrera-Medina, R., Santos-Díaz, R., Herrera-Corredor, A., Escalera-Valente, F., & Martínez-González, S. (2017). Bagazo húmedo de cervecería como sustituto de cereales en la suplementación de ovinos. *Abanico Veterinario*, vol.7 no.3.
- Saghatelian, A., & Cravatt, B. (2005). Global strategies to integrate the proteome and metabolome. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9 (1), 62-68.
- Salcedo, Osuna, Guevara, Domínguez, & Paredes. (2002). Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds. *J. Agric. Food Chem*, 6515-6520.
- Salgado-Albarrán, M., Herrera-Díaz, J., & Dinkova, T. (2015). Caracterización de patrones de Hordeínas en variedades Mexicanas de Cebada maltera. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 43-51.
- Salplachta, J., & Bobalova, J. (2009). MALDI-TOF mass spectrometry of hordeins: rapid approach for identification of malting barley varieties. *J. Mass Spectrom*, 44, 1287-1292.
- Sani, H., Rahmat, A., Ismail, M., Rosli, R., & Endrini, S. (2004). Potential anticancer effect of red spinach (*Amaranthus gangengitus*) extract. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13, 396-400.
- Segura-Nieto, M., Vazquez-Sanchez, N., Rubio-Velazquez, H., Olguin-Martinez, L., Rodriguez-Nester, C., & Herrera-Estrella, L. (1992). Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. *J. Agric. Food Chem*, 40, 1553-1558.
- Shevkani, Singh, Rana, & Kaur. (2014). Relationship between physicochemical and functional properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates. *International Journal of Food Science and Technology*, 541-550.
- Suarez, & Añón. (2018). Comparative behaviour of solutions and dispersions of amaranth proteins on their emulsifying properties. *Food Hydrocolloids*, 115-123.
- Suárez, M. (2013). *Cerveza: Componentes y propiedades*. Oviedo. España: Universidad de Oviedo.
- Sunilkumar, B., & Tareke, E. (2019). Review of analytical methods for measurement of oat proteins: The need for standardized methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 59, No. 9, 1467-1485.
- Tiwari. (2015). Ultrasound: a clean, green extraction technology. *TrAC Trends Analytical Chemistry*, 100-109.

- Uniprot*. (2002). Obtenido de www.uniprot.org
- Urba, J., Dahlberg, C., Carroll, B., & Kaminsky, W. (2013). Absolute Configuration of Beer's Bitter Compounds. *Angewandte Communications*, 1553-1555.
- Ventureira, J., Martínez, E., & Añón, M. (2012). Effect of acid treatment on structural and foaming properties of soy amaranth protein mixtures. *Food Hydrocolloids*, 29 (2), 272-279.
- Wang, Tian, Chen, Temelli, Liu, & Wang. (2010). Functionality of Barley Proteins Extracted and Fractionated by Alkaline and Alcohol Methods. *Cereal Chem*, 597-606.
- Xijuan, Bin, Kunlun, Dezhao, & Xinhong. (2013). Study on Functional Properties and Hulless Barley Protein by Ultrasonic-Assisted Extraction. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*.
- Yalcın, & Celik. (2007). Solubility properties of barley flour, protein isolates and hydrolysates. *Food Chemistry*, 1641-1647.
- Yalcın, Celik, & Ibanoglu. (2007). Foaming properties of barley protein isolates and hydrolysates. *European Food Research and Technology*, 967.