



Sceni, Paula

# Ingredientes multicomponentes a partir de levadura. Estudio de sus propiedades interfaciales y su aplicación en alimentos



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.  
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

*Cita recomendada:*

Sceni, P. (2021). *Ingredientes multicomponentes a partir de levadura. Estudio de sus propiedades interfaciales y su aplicación en alimentos. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2947>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

## **Ingredientes multicomponentes a partir de levadura. Estudio de sus propiedades interfaciales y su aplicación en alimentos**

*TESIS DOCTORAL*

**Paula Sceni**

paula.sceni@gmail.com

### **Resumen**

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo ampliamente utilizado en la industria de alimentos debido a su poder fermentativo y propiedades nutricionales. La homogeneización a alta presión de las células de levadura produce la ruptura celular y micronización de la pared celular. Se encontró que la presión de homogeneización óptima es 1250 bar. Los componentes intracelulares y de pared de las dispersiones homogeneizadas tienen elevada capacidad de retención de agua y moderada capacidad emulsionante. Sin embargo, las partículas insolubles sedimentan durante el almacenamiento y las emulsiones además se desestabilizan por cremado y coalescencia. Adicionalmente, las enzimas presentes en la levadura no se inactivan durante la homogeneización y producen cambios no deseados en las dispersiones de levadura.

Para inhibir la actividad enzimática se realizó un tratamiento térmico a 90 °C combinado o no con homogeneización a 1250 bar y se obtuvieron las muestras T, TH, HT y HTH, donde la sigla indica el tipo y orden de tratamiento aplicado (T: térmico, H: homogeneización). Se demostró que las diferentes combinaciones de tratamientos modifican las características y propiedades funcionales de las dispersiones. Las dispersiones HT y HTH presentaron mayor viscosidad y estabilidad frente a la sedimentación. Asimismo, las emulsiones preparadas con estas dos dispersiones, aunque se desestabilizan por cremado, no sedimentan y forman una fase crema hidratada y estable a la coalescencia. Por lo tanto, estas dispersiones tienen un potencial uso como ingrediente para alimentos emulsionados.



# **Ingredientes multicomponentes a partir de levadura. Estudio de sus propiedades interfaciales y su aplicación en alimentos**

## **Tesis Doctoral**

**Ing. Paula Sceni**

**Director: Dr. Jorge Ricardo Wagner**

**Codirectora: Dra. Mercedes Ana Peltzer**

**Marzo de 2021**

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctora en Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Funcionalidad y Tecnología de Alimentos del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes, bajo la dirección del Dr. Jorge Wagner y la codirección de la Dra. Mercedes Peltzer

***Dedicado a Chochi y a Lito***

## AGRADECIMIENTOS

***"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor,  
la electricidad y la energía atómica:  
la voluntad"***  
**Albert Einstein**

- A la Universidad Nacional de Quilmes, por brindarme una educación de grado y posgrado de excelencia.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haber financiado este trabajo.
- A Jorge Wagner y Mercedes Peltzer, por su acompañamiento y aportes en esta tesis.
- A mis amigos de la vida; Anahí, Natalia, Susana, Sara, Pablo, Damián y Martín
- A mis amigos de la UNQ, que de alguna manera hicieron que esto fuera posible, en especial a Mariana R., Darío, Andrés M., Gonzalo, Cecilia, Juan, Sebastián, Yeisson, Alfonsina, Vanesa y Andrés S.
- A Dani, por su gran ayuda y por recordarme escribir todas las semanas.
- A los "dires", en especial a Ale, Mariana, Damián, Mariano y Silvia.
- A Mabel Rembado, por ser mi guía en la docencia.
- A mi familia, en especial a mi prima Verito y a mi tía Marta, que siempre están conmigo.

## ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS.....	9
LISTADO DE TABLAS.....	12
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....	15
1.1. Antecedentes históricos de la levadura .....	15
1.2. Estructuras celulares de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	16
1.2.1. Pared celular .....	17
1.2.2. Membrana plasmática .....	19
1.2.3. Citoplasma y citoesqueleto.....	19
1.2.4. Núcleo y organelas.....	20
1.3. Aplicaciones de levadura en la industria de alimentos .....	20
1.3.1. Levadura activa .....	20
1.3.2. Levadura nutricional .....	22
1.3.3. Derivados de levadura .....	24
1.4. Ruptura celular.....	26
1.4.1. Métodos mecánicos .....	27
1.4.2. Métodos no mecánicos .....	30
1.4.3. Combinación de métodos.....	32
1.5. Obtención de derivados de levadura .....	33
1.5.1. $\beta$ -Glucanos.....	33
1.5.2. Mananoproteínas .....	34
1.5.3. Aislados y concentrados proteicos .....	35
1.5.4. Extractos .....	35
1.6. Emulsiones .....	36
1.6.1. Clasificación .....	36
1.6.2. Formación de emulsiones .....	37
1.6.3. Dispositivos de homogeneización .....	37
1.6.4. Concentración de fase dispersa .....	39
1.6.5. Estabilidad cinética y termodinámica.....	39
1.6.6. Procesos de desestabilización de emulsiones.....	41
1.6.7. Emulsionantes.....	44
1.6.8. Estabilizantes .....	48
1.7. Objetivos.....	50
1.7.1. Objetivo general .....	50
1.7.2. Objetivos específicos .....	50

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y METODOS .....	52
2.1. Materiales .....	52
2.2. Preparación de dispersiones .....	52
2.2.1. Muestra control (L) .....	52
2.2.2. Muestras homogeneizadas (H <sub>750</sub> , H <sub>1000</sub> , H <sub>1250</sub> , H <sub>1500</sub> ) .....	52
2.2.3. Muestras homogeneizadas y/o tratadas térmicamente (H, T, HT, HTH, TH) ..	54
2.2.4. Muestras autolizadas .....	55
2.3. Fraccionamiento de las dispersiones .....	55
2.4. Composición química .....	56
2.4.1. Extracto seco .....	56
2.4.2. Ácidos nucleicos .....	56
2.4.3. Proteínas .....	57
2.4.4. Hidratos de carbono totales .....	59
2.4.5. Lípidos .....	60
2.4.6. Índices de dispersabilidad .....	60
2.5. Recuento microbiológico .....	61
2.6. Espectroscopía UV - Visible .....	61
2.6.1. Fundamentos teóricos .....	61
2.6.2. Condiciones experimentales .....	62
2.7. Capacidad de retención de agua (CRA) .....	62
2.8. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) .....	62
2.8.1. Fundamentos teóricos .....	62
2.8.2. Condiciones experimentales .....	63
2.9. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) .....	63
2.9.1. Fundamentos teóricos .....	63
2.9.2. Condiciones experimentales .....	64
2.10. Reología .....	64
2.10.1. Fundamentos teóricos .....	64
2.10.2. Condiciones experimentales .....	66
2.11. Preparación de emulsiones .....	66
2.12. Determinación de tamaño de partícula de dispersiones de levadura y emulsiones.	67
2.12.1. Fundamentos teóricos .....	67
2.12.2. Condiciones experimentales .....	70
2.13. Estabilidad de dispersiones de levadura y emulsiones determinado con un	
analizador óptico vertical (Quick Scan) .....	70
2.13.1. Fundamentos teóricos .....	70
2.13.2. Condiciones experimentales .....	71
2.14. Microscopía óptica .....	72

2.15. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) .....	72
2.16. Tensiometría .....	72
2.16.1. Fundamentos teóricos .....	72
2.16.2. Condiciones experimentales .....	73
2.17. Análisis de datos .....	73
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN. RUPTURA CELULAR POR HOMOGENEIZACIÓN A ALTA PRESIÓN .....</b>	<b>74</b>
3.1. Homogeneización a diferentes presiones de la dispersión de levadura.....	75
3.2. Recuento microbiológico y análisis microscópico .....	76
3.3. Comportamiento térmico y grado de desnaturalización de las proteínas.....	78
3.4. Actividad enzimática .....	80
3.5 Separación de sedimentos y sobrenadante por centrifugación .....	82
3.6. Distribución de tamaño de partícula .....	84
3.7. Determinación de absorbancia a 280 nm y a 550 nm.....	90
3.8. Caracterización química.....	91
3.8.1. Composición de la célula entera.....	91
3.8.2. Dispersabilidad de los componentes celulares .....	91
3.8.3. Composición de los sedimentos .....	93
3.8.4. Caracterización de las fracciones por espectroscopía infrarroja .....	94
3.9. Capacidad de retención de agua de la fracción insoluble.....	97
3.10. Estabilidad de las dispersiones de levadura entera y homogeneizada frente a la sedimentación.....	98
3.11. Resumen de resultados y conclusiones parciales .....	105
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN. EMULSIONES CON LEVADURA HOMOGENEIZADA A ALTA PRESIÓN .....</b>	<b>108</b>
4.1. Distribución de tamaño de partícula de las emulsiones recién preparadas .....	108
4.2. Estabilidad física de las emulsiones .....	112
4.2.1. Sedimentación .....	115
4.2.2. Cremado .....	115
4.2.3. Coalescencia y floculación .....	119
4.3. Efecto de la concentración de aceite y de levadura en la estabilidad de emulsiones.....	120
4.4. Resumen de resultados y conclusiones parciales .....	122
<b>CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN. EFECTO COMBINADO DE TRATAMIENTO TÉRMICO Y HOMOGENEIZACIÓN A ALTA PRESIÓN .....</b>	<b>124</b>
5.1. Tratamientos de las muestras .....	124
5.2. Análisis de las dispersiones con microscopio óptico .....	125
5.3. Análisis de las dispersiones por microscopía electrónica de transmisión (TEM) .	126
5.4. Distribución de tamaño de partícula .....	128
5.5. Separación de sedimentos y sobrenadante por centrifugación.....	130

5.6. Determinación de absorbancia a 280 nm y a 550 nm.....	131
5.7. Caracterización química.....	133
5.7.1. Dispersabilidad de los componentes celulares .....	133
5.7.2. Composición de los sedimentos .....	135
5.7.3. Caracterización de las fracciones por espectroscopía infrarroja. ....	136
5.8. Capacidad de retención de agua de la fracción insoluble.....	137
5.9. Estabilidad frente a la sedimentación .....	139
5.10. Reología .....	141
5.11. Resumen de resultados y conclusiones parciales .....	145
<b>CAPÍTULO 6: RESULTADOS Y DISCUSIÓN. EMULSIONES CON LEVADURA TRATADA TÉRMICAMENTE Y/U HOMOGENEIZADA A ALTA PRESIÓN .....</b>	<b>148</b>
6.1. Tensión interfacial.....	148
6.2. Microscopía óptica de las emulsiones .....	150
6.3. Distribución de tamaño de partícula .....	152
6.4. Estabilidad física de las emulsiones .....	155
6.4.1. Sedimentación .....	161
6.4.2. Cremado y coalescencia .....	161
6.5. Resumen de resultados y conclusiones parciales .....	166
<b>CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>168</b>
Bibliografía.....	174

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Esquema de célula de levadura.....	16
<b>Figura 1.2.</b> Estructura de la pared celular de levadura.....	17
<b>Figura 1.3.</b> Clasificación de métodos de ruptura celular.....	26
<b>Figura 1.4.</b> Diagrama del funcionamiento del homogeneizador a alta presión...	27
<b>Figura 1.5.</b> Diagrama del funcionamiento del microfluidizador .....	28
<b>Figura 1.6.</b> Diagrama del funcionamiento del molino a bolas .....	29
<b>Figura 1.7.</b> Diagrama del funcionamiento de un sonicador.....	30
<b>Figura 1.8.</b> Clasificación de emulsiones.....	37
<b>Figura 1.9.</b> Homogeneización primaria y secundaria.....	37
<b>Figura 1.10.</b> Demostración esquemática de la diferencia entre estabilidad cinética y termodinámica.....	40
<b>Figura 1.11.</b> Esquema de los diferentes mecanismos de desestabilización de emulsiones.....	41
<b>Figura 1.12.</b> Diagrama esquemático de los distintos tipos de flóculos: a) flóculo compacto, b) flóculo abierto.....	43
<b>Figura 1.13.</b> Diferencias en el modo de adsorción de a) proteína flexible, b) proteína globular rígida, c) lípidos polares.....	45
<b>Figura 1.14.</b> Polímeros de igual peso molecular rotando con agua hidrodinámicamente atrapada. a) polímero lineal, b) polímero ramificado.....	48
<b>Figura 1.15.</b> Tipos de estructuras de gel de biopolímeros. a) gel particulado, b) gel filamentosos.....	49
<b>Figura 2.1.</b> Fotografía de las partes externas del homogeneizador.....	53
<b>Figura 2.2.</b> Preparación de dispersiones homogeneizadas y/o tratadas térmicamente.....	55
<b>Figura 2.3.</b> Distribuciones de tamaño de partícula en volumen, en superficie y en número de una dispersión polidispersa.....	68
<b>Figura 2.4.</b> Esquema del analizador de barrido vertical (Quick Scan).....	71
<b>Figura 3.1.</b> Esquema simplificado del proceso de ruptura celular. a) célula entera, b) célula dañada que conserva la forma original, c) célula con la pared micronizada.....	76
<b>Figura 3.2.</b> Micrografías ópticas de las muestras H <sub>750</sub> , H <sub>1000</sub> , H <sub>1250</sub> y H <sub>1500</sub> (x1000).....	72
<b>Figura 3.3.</b> Termogramas DSC de las muestras L, H <sub>750</sub> , H <sub>1000</sub> , H <sub>1250</sub> y H <sub>1500</sub> .....	79
<b>Figura 3.4.</b> Autólisis a 50 °C de las muestras L y H <sub>1250</sub> , a) sólidos insolubles, b) cambio de pH.....	82

<b>Figura 3.5.</b> Fracciones obtenidas por centrifugación de las muestra L, H <sub>750</sub> , H <sub>1000</sub> , H <sub>1250</sub> y H <sub>1500</sub> . a) vista de frente, b) vista de perfil.....	83
<b>Figura 3.6.</b> Distribuciones en volumen (izquierda) y en número (derecha) de las muestras L, H <sub>750</sub> y H <sub>1250</sub> (IR 1,40 y 1,52).....	85
<b>Figura 3.7.</b> Esquema de la distribución de tamaño de partícula de una muestra y su relación con el tipo de partícula de cada población.....	88
<b>Figura 3.8.</b> Distribución de tamaño de partícula en número y en volumen de las fracciones de las muestras H <sub>750</sub> y H <sub>1250</sub> (IR 1,52) .....	89
<b>Figura 3.9.</b> Dispersabilidad de los componentes celulares de las muestras H <sub>750</sub> , H <sub>1000</sub> , H <sub>1250</sub> y H <sub>1500</sub> .....	92
<b>Figura 3.10.</b> Composición porcentual de los sedimentos de las muestras H <sub>750</sub> , H <sub>1000</sub> , H <sub>1250</sub> y H <sub>1500</sub> . .....	93
<b>Figura 3.11.</b> Espectros de FTIR de las fracciones de la muestra H <sub>750</sub> .....	95
<b>Figura 3.12.</b> Espectros de FTIR de las fracciones de las muestras H <sub>750</sub> , H <sub>1000</sub> , H <sub>1250</sub> y H <sub>1500</sub> . a) sobrenadante, b) sedimento I, c) sedimento II.....	96
<b>Figura 3.13.</b> Capacidad de retención de agua de las muestras L, H <sub>750</sub> , H <sub>1000</sub> , H <sub>1250</sub> y H <sub>1500</sub> .....	97
<b>Figura 3.14.</b> Perfil de %T y %BS en función del tiempo de la muestra L.....	99
<b>Figura 3.15.</b> Perfiles de %BS de las muestras H <sub>750</sub> , H <sub>1000</sub> , H <sub>1250</sub> y H <sub>1500</sub> .....	101
<b>Figura 3.16.</b> Perfiles de %BS de las muestras H <sub>750</sub> , H <sub>1000</sub> , H <sub>1250</sub> y H <sub>1500</sub> en la zona baja del tubo, luego de 1 y 24 horas de sedimentación.....	102
<b>Figura 3.17.</b> Cinética de sedimentación de las muestras L, H <sub>750</sub> , H <sub>1000</sub> , H <sub>1250</sub> y H <sub>1500</sub> . a) área bajo el perfil de la curva en la zona baja del tubo, b) porcentaje de disminución de %BS en la zona alta del tubo.....	103
<b>Figura 4.1.</b> Distribuciones de tamaño de partícula de las muestras E <sub>L</sub> , E <sub>H750</sub> y E <sub>H1250</sub> .....	109
<b>Figura 4.2.</b> Fotografía de las muestras E <sub>L</sub> y E <sub>H1250</sub> almacenadas 24 horas.....	112
<b>Figura 4.3.</b> Perfil de a) %T y b) %BS en función del tiempo de la muestra E <sub>L</sub> ...	113
<b>Figura 4.4.</b> Perfil %BS en función del tiempo de las muestras E <sub>H750</sub> , E <sub>H1000</sub> , E <sub>H1250</sub> y E <sub>H1500</sub> .....	114
<b>Figura 4.5.</b> Cinética de cremado de las muestras a) E <sub>L</sub> , E <sub>H750</sub> , E <sub>H1000</sub> , E <sub>H1250</sub> y E <sub>H1500</sub> , b) E <sub>H1250</sub> , E <sub>H1250sol</sub> y E <sub>H1250ins</sub> .....	118
<b>Figura 4.6.</b> Cinética de cremado de a) muestras con diferentes concentraciones de levadura y b) diferentes $\phi_m$ .....	121
<b>Figura 5.1.</b> Micrografías ópticas de las muestras L, H, HT, HTH, T y TH (x1000).....	126
<b>Figura 5.2.</b> Micrografías TEM de las muestras L, H, HT, HTH, T y TH (x35000).....	127
<b>Figura 5.3.</b> Distribución de tamaño de partícula en volumen y en número de las muestras L, H, HT, HTH, T y TH.....	129
<b>Figura 5.4.</b> Fotografía de las muestras centrifugadas L, H, HT, HTH, T y TH....	131

<b>Figura 5.5.</b> Dispersabilidad de los componentes celulares de las muestras H, HT, HTH, T y TH.....	133
<b>Figura 5.6.</b> Composición porcentual de los sedimentos de las muestras H, HT, HTH, T y TH.....	135
<b>Figura 5.7.</b> Espectros de FTIR de las fracciones de las muestras L, H, HT, TH, T y TH a) sobrenadante, b) sedimento, .....	137
<b>Figura 5.8.</b> Capacidad de retención de agua de las muestras L, H, HT, HTH, T y TH.....	138
<b>Figura 5.9.</b> Perfiles de %BS de las muestras T, TH, HT y HTH.....	139
<b>Figura 5.10.</b> Cinética de sedimentación de las muestras L, H, HT, HTH, T y TH.....	141
<b>Figura 5.11.</b> Curvas de comportamiento de flujo a) muestras L, H, T y TH, b) muestras H, HT y HTH.....	142
<b>Figura 6.1.</b> Micrografías ópticas de las muestras E <sub>L</sub> , E <sub>H</sub> , E <sub>HT</sub> , E <sub>HTH</sub> , E <sub>T</sub> y E <sub>TH</sub> .....	151
<b>Figura 6.2.</b> Distribuciones de tamaño de partícula en superficie y en volumen de las muestras E <sub>T</sub> , E <sub>HT</sub> , E <sub>TH</sub> y E <sub>HTH</sub> .....	153
<b>Figura 6.3.</b> Fotografía de las emulsiones E <sub>L</sub> , E <sub>H</sub> , E <sub>T</sub> , E <sub>HT</sub> , E <sub>TH</sub> y E <sub>HTH</sub> . a) recién preparadas, b) almacenadas durante 24 horas .....	156
<b>Figura 6.4.</b> Perfiles %BS y %T en función del tiempo de la muestra E <sub>T</sub> .....	157
<b>Figura 6.5.</b> Perfil %BS en función del tiempo de la muestra E <sub>TH</sub> .....	158
<b>Figura 6.6.</b> Perfiles de %BS y %T en función del tiempo de la muestra E <sub>HT</sub> .....	159
<b>Figura 6.7.</b> Perfiles de %BS y %T en función del tiempo de la muestra E <sub>HTH</sub> ....	160
<b>Figura 6.8.</b> Cinética de cremado de las muestras E <sub>L</sub> , E <sub>H</sub> , E <sub>HT</sub> , E <sub>HTH</sub> , E <sub>T</sub> y E <sub>TH</sub> ....	163
<b>Figura 6.9.</b> Estabilidad de la fase crema de las muestras E <sub>L</sub> , E <sub>H</sub> , E <sub>HT</sub> , E <sub>HTH</sub> , E <sub>T</sub> y E <sub>TH</sub> .....	164

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Composición de la pared celular.....	18
<b>Tabla 1.2.</b> Comparación de diferentes tipos de homogeneizadores.....	38
<b>Tabla 3.1.</b> Porcentaje de disminución del recuento microbiológico de células viables de levadura en las muestras homogeneizadas, respecto de la muestra L.....	77
<b>Tabla 3.2.</b> Valores de pico de temperatura, entalpía de desnaturalización y porcentaje de desnaturalización de muestras L y homogeneizadas.....	80
<b>Tabla 3.3.</b> Valores promedios $D_{4,3}$ y $D_{1,0}$ , y <i>span</i> de las muestras L, $H_{750}$ , $H_{1000}$ , $H_{1250}$ y $H_{1500}$ , medidos con un IR de 1,52.....	86
<b>Tabla 3.4.</b> Valores de absorbancia a 550 nm (turbidez) de las dispersiones y sobrenadantes, y de absorbancia a 280 nm de los sobrenadantes de las muestras L, $H_{750}$ , $H_{1000}$ , $H_{1250}$ y $H_{1500}$ .....	91
<b>Tabla 4.1.</b> Porcentaje de fase crema a las 24 h de las muestras $E_{H750}$ , $E_{H1000}$ , $E_{H1250}$ y $E_{H1500}$ .....	117
<b>Tabla 4.2.</b> Porcentaje de coalescencia determinado a partir del $D_{4,3}$ y del %BS de las muestras $E_{H750}$ , $E_{H1000}$ , $E_{H1250}$ y $E_{H1500}$ .....	119
<b>Tabla 5.1.</b> Valores de absorbancia a 550 nm (turbidez) de las dispersiones y sobrenadantes, y de absorbancia a 280 nm de los sobrenadantes de las muestras L, H, HT, HTH, T y TH.....	132
<b>Tabla 5.2.</b> Parámetros del modelo de Herschel – Bulkley y viscosidad relativa de las muestras L, H, HT, HTH, T y TH.....	142
<b>Tabla 6.1.</b> Valores de presión interfacial de las muestras L, H, HT, HTH, T y TH.....	150
<b>Tabla 6.2.</b> Porcentaje de fase crema a las 24 h de las muestras $E_H$ , $E_{HT}$ , $E_{HTH}$ , $E_T$ y $E_{TH}$ .....	162



# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN**

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes históricos de la levadura

Los productos fermentados forman parte de la alimentación humana desde el periodo Neolítico (8500 – 4000 A.C.). Hay evidencias arqueológicas que demuestran que en China, desde el año 7000 A.C. preparaban una bebida fermentada a base arroz, miel y frutas, mientras que en Egipto desde el año 5000 A.C. elaboraban cerveza y pan. En otras regiones del mundo también hay evidencias del consumo de alimentos fermentados a base de diversos cereales, soja y vegetales. Como muchos de los alimentos que conocemos hoy en día, estos productos surgieron probablemente por casualidad [1–3].

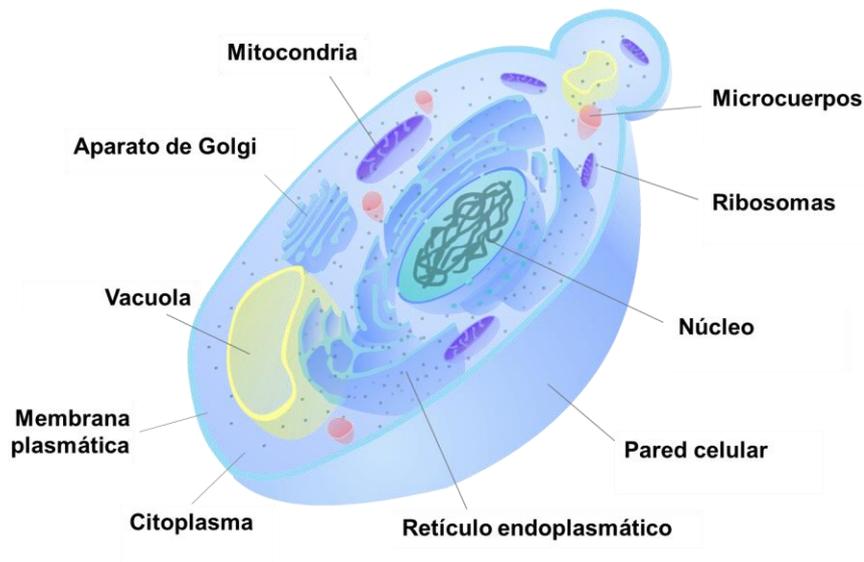
La primera persona que realmente vio una célula de levadura fue el holandés Antonie van Leewenhoek (1632-1723), con un microscopio rudimentario que el mismo construyó. Un siglo después, Erxleben (Francia, 1818) y Schwann y Kützing (Alemania, 1837) descubrieron que las levaduras son la causa del proceso de fermentación. En 1875 Louis Pasteur formuló su teoría “*vitalista*” como explicación de los mecanismos básicos de la fermentación y demostró que este proceso era anaeróbico. Por el mismo tiempo y durante 30 años, Hansen en Dinamarca, investigó la naturaleza de las levaduras de cervecería y panadería; hizo numerosos aislamientos de cultivos puros de levaduras del género *Saccharomyces* y estudió sus características morfológicas y fisiológicas [4].

Las levaduras son microorganismos unicelulares que no constituyen un grupo taxonómico propio sino que se clasifican dentro de 3 grupos de hongos: Ascomicetos, Basidiomicetos y Deuteromicetos [5,6]. En la actualidad, se conocen en detalles las características morfológicas, fisiológicas, inmunológicas y moleculares de un gran número de levaduras. Ya se han descrito más de 700 especies, aunque este número solo representa una pequeña fracción de la biodiversidad en el planeta [7–9]. Muchas de estas levaduras son patógenas para el hombre o causan deterioros en los alimentos, y solo unas pocas especies son aprovechadas en la industria de alimentos y farmacéutica. La más

extensamente utilizada es *Saccharomyces cerevisiae*, aunque también se emplean otras especies de *Saccharomyces* como *S. bayanus* y otros géneros como por ejemplo *Zygosaccharomyces* spp., *Kluyveromyces* spp. y *Candida* spp. [1].

## 1.2. Estructuras celulares de *Saccharomyces cerevisiae*

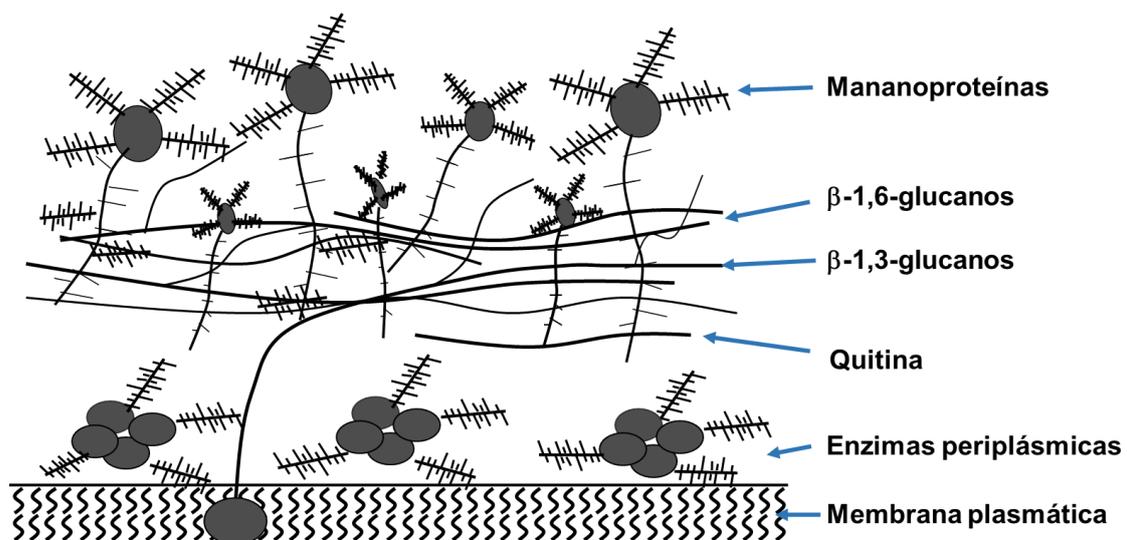
Las células de levadura *S. cerevisiae* tienen generalmente forma elipsoidal con un tamaño promedio de 5  $\mu\text{m}$  [10,11]. Están cubiertas por una pared celular y una membrana celular que rodean y contienen al citoplasma y cumplen un papel fundamental en la permeabilidad y control osmótico de la célula. Dentro de la célula se encuentra el citoplasma y el citoesqueleto, que contienen al núcleo y a las organelas (**Figura 1.1**). La compartimentación que presenta la célula de levadura le permite desarrollar actividades celulares específicas y funcionar eficientemente a pesar de su gran tamaño (cerca de cientos de veces mayor que el volumen de las bacterias) [12].



**Figura 1.1.** Esquema de célula de levadura.

### 1.2.1. Pared celular

La pared celular representa entre el 20 y 30% en base seca (b.s.) de la célula y está compuesta por un 85% de hidratos de carbono y 15% de proteínas [13]. Está constituida por dos capas y se ubica afuera de la membrana plasmática. La capa interna provee la resistencia a la célula y está formada por  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6-glucanos, que se unen a moléculas de quitina. La capa externa consiste en mananoproteínas que determinan las propiedades de superficie de la célula y la respuesta a antígenos. La mayor parte de las mananoproteínas se unen covalentemente a los  $\beta$ -glucanos. Entre la capa de  $\beta$ -glucanos y la membrana celular, está el espacio periplasmático, donde quedan retenidas algunas enzimas [14–16] (**Figura 1.2**).



**Figura 1.2.** Estructura de la pared celular de levadura. Adaptado de Schreuder [17].

Las mananoproteínas constituyen entre el 35 y 40% b.s. de la pared y se dividen en dos grupos; uno posee función estructural y el otro grupo posee función enzimática. Las que poseen función estructural son las más abundantes y se ubican en la capa más externa de la pared. Están compuestas por 10% de proteínas y 90% de mananos, los cuales son polímeros ramificados formados por 40 a 100 unidades de manosa, unidas mediante enlace  $\alpha$ 1-6 y ramificaciones con enlaces  $\alpha$ 1-2 y  $\alpha$ 1-3. Estas cadenas pueden estar

fosforiladas. Las mananoproteínas con función enzimática contienen entre un 30 y 50% de proteínas y se ubican en el espacio periplasmático, entre la pared celular y la membrana plasmática [18].

Los  $\beta$ -glucanos son polímeros de glucosa, el monómero más abundante de la pared celular (80-90%). Los  $\beta$ -1,3-glucanos constituyen alrededor del 50% b.s. de la pared y tienen un grado de polimerización de 1500 unidades, que forman una estructura tridimensional responsable de darle rigidez y forma a la célula. Son solubles en medio alcalino fuerte, pero unidos a la quitina se insolubilizan en este medio. Los  $\beta$ -1,6-glucanos representan entre el 5 y 10% b.s. de la pared celular, son polímeros muy ramificados, solubles en agua y contienen aproximadamente 140 unidades de glucosa. Tienen una función fundamental en la estructura de la pared celular ya que se proveen un lugar de anclaje para las mananoproteínas y además se une covalentemente con los  $\beta$ -1,3-glucanos y con la quitina [13,19,20].

La quitina es un polímero lineal de N-acetilglucosamina y es el componente minoritario de la pared ya que solamente representa entre el 1 y 2% b.s. [9,13].

En la **Tabla 1.1** se muestra la composición en base seca de la pared celular.

**Tabla 1.1.** Composición de la pared celular [21].

Macromolécula	Porcentaje de la pared celular (b.s)	Estructura
Mananoproteínas	35-40	Cadena proteica unida a polímero muy ramificado de manosa. Puede estar fosforilado.
$\beta$ -1,6-glucanos	5-10	Polímero muy ramificado de glucosa
$\beta$ -1,3-glucanos	50-55	Polímero moderadamente ramificado de glucosa
Quitina	1-2	Polímero lineal de N-acetilglucosamina

### 1.2.2. Membrana plasmática

La membrana plasmática es una bicapa lipídica con proteínas globulares intercaladas en su estructura. En *S. cerevisiae* tiene un espesor de 7,5 nm con invaginaciones que se extienden hasta el citoplasma. La porción lipídica está compuesta por fosfolípidos (principalmente fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) y esteroides (principalmente ergosterol y zimosterol). Probablemente los fosfolípidos confieran la fluidez y los esteroides la rigidez a la bicapa. Las proteínas, representan alrededor del 50% del peso de la membrana y cumplen diversas funciones tales como transporte de solutos, biosíntesis de componentes de pared celular, transducción de señal a través de la membrana y proteínas de anclaje del citoesqueleto [9,12].

### 1.2.3. Citoplasma y citoesqueleto

El citoplasma es un fluido coloidal con un pH aproximado de 5,5. Contiene compuestos de peso molecular bajo e intermedio, proteínas solubles, glucógeno y otras macromoléculas. Además contiene en suspensión, microcuerpos delimitados por membrana y agregados macromoleculares como ribosomas, proteosomas y partículas lipídicas [9].

El citoesqueleto consiste en filamentos proteicos que se extienden por el citoplasma de las células eucarióticas y están entrelazados entre sí y unidos a organelas subcelulares y a la membrana plasmática. Está compuesto por tres tipos de filamentos principales: actina (7 nm de diámetro), filamentos intermedios (10 nm de diámetro) y microtúbulos (25 nm de diámetro) [9]. Los filamentos de actina son las estructuras proteicas principales en el citoplasma. Están organizados en estructuras de orden superior, que forman paquetes o cadenas tridimensionales con las propiedades de geles semisólidos. Al igual que los microtúbulos, son estructuras dinámicas que experimentan ensamblajes y desacoplamiento continuos dentro de la célula y determinan la forma celular e intervienen

en los movimientos celulares. Los filamentos intermedios en cambio tienen como función principal aportar la fuerza mecánica a las células [22].

#### 1.2.4. Núcleo y organelas

El núcleo tiene un diámetro aproximado de 1  $\mu\text{m}$ . Al igual que las organelas, son subestructuras celulares rodeadas por membrana, que cumplen funciones específicas. Las organelas más importantes son el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, mitocondrias, lisosomas, peroxisomas y vacuolas [1,9,12].

### 1.3. Aplicaciones de levadura en la industria de alimentos

La levadura *S. cerevisiae* es un microorganismo considerado GRAS (*Generally Recognize As Safe*) por la FDA (*Food and Drug Administration*) [23]. Aunque su principal uso es como agente fermentador, la levadura *S. cerevisiae* también se emplea en forma inactiva como complemento nutricional y sirve como materia prima para la obtención de derivados de alto valor agregado para la industria de alimentos y farmacéutica. A continuación se describirán sus principales aplicaciones.

#### 1.3.1. Levadura activa

La levadura *S. cerevisiae* activa tiene la capacidad de fermentar azúcares simples como glucosa, galactosa, manosa y fructosa, pero no puede fermentar a la lactosa. Como productos de la fermentación se obtienen etanol y dióxido de carbono. Los principales alimentos fermentados por este tipo de levaduras son:

##### 1.3.1.1. Pan y productos de panadería

Se utiliza la especie *S. cerevisiae* activa, que se comercializa fresca o deshidratada. La actividad de la levadura es esencial no solo para la producción del dióxido de carbono

responsable del alveolado de la masa, sino también porque durante la fermentación se generan compuestos como alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres que contribuyen al flavor del pan [24]. Además, los alcoholes y ácidos formados, desnaturalizan a las proteínas del gluten y junto con la acción de las proteasas, modifican la reología de la masa [25].

#### 1.3.1.2. Cerveza

Se utilizan distintas especies de *Saccharomyces*, según el tipo de fermentación y de cerveza. La fermentación alta se realiza con la especie *S. cerevisiae*, en un proceso que se lleva a cabo a temperaturas relativamente elevadas (15 a 20 °C) durante cuatro a seis días. La levadura residual se recoge de la superficie del fermentador. Algunas cervezas típicas son: Kölsch, Weißbier, Weizenbier y Ale. En la fermentación baja, se utilizan especies como *S. pastorianus* y *S. carlsbergensis*. Este proceso se lleva a cabo a una temperatura entre 4 y 9 °C, durante alrededor de ocho días. Al término de este proceso la levadura se deposita en el fondo del fermentador. Algunos tipos de cervezas obtenidas con este proceso son la Pilsen, Lager y Bock. Aunque la levadura de cerveza puede ser reutilizada entre 4 y 6 veces, la biomasa residual es el segundo subproducto más importante de la industria cervecera, luego de los granos de cebada residuales [26–28].

#### 1.3.1.3. Sidra

La sidra se obtiene por fermentación de los azúcares de manzanas. Las principales levaduras involucradas en el proceso son *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, aunque también se encuentran otros géneros como *Dekkera*, *Lachancea*, *Candida*, entre otros. Los factores que determinan la diversidad de microorganismos presentes son el clima, la variedad de manzanas, la ubicación geográfica y la tecnología utilizada [29].

#### 1.3.1.4. Vino

La especie de levadura empleada en la elaboración del vino es *S. cerevisiae*. Sin embargo, también se emplean especies como *S. bayanus* y otras levaduras no-*Saccharomyces*, que aunque no fermentan completamente el mosto, pueden mejorar la calidad del vino fermentado con *S. cerevisiae* [30]. A diferencia del proceso de producción de cerveza, estas levaduras no se recuperan al final del proceso [26].

#### 1.3.1.5. Otros alimentos fermentados

Las levaduras también tienen un rol fundamental en la fermentación de muchos otros alimentos, como cacao y café. En otros alimentos como kéfir, carnes, vegetales y cereales, la fermentación principal es producida por bacterias lácticas, pero las levaduras juegan un papel secundario en el flavor y la madurez del producto [1].

#### 1.3.2. Levadura nutricional

La levadura nutricional debe estar inactiva. De lo contrario, su capacidad para fermentar carbohidratos produciendo dióxido de carbono puede causar trastornos gastrointestinales. Además, puede remover del organismo vitaminas, principalmente B1 y B2, provocando un efecto contrario al deseado. Este alimento es capaz de producir efectos metabólicos y fisiológicos favorables, como la disminución de la glucemia, profilaxis del cáncer de próstata, potenciador del sistema inmunológico, etc. Las especies más utilizadas son *S. cerevisiae* y *Candida utilis* y se encuentran en el mercado en distintas presentaciones. Por ejemplo, se puede consumir en polvo, mezclada con sopas, yogures, ensaladas, fideos y otras preparaciones, o en cápsulas o pastillas [27,31].

Las proteínas representan entre el 40 y 50% b.s. de la levadura y tienen un valor nutritivo comparable al de la caseína, siendo una buena fuente proteica en la dieta humana y animal. Además, contienen todos los aminoácidos esenciales en exceso con respecto a

la recomendación de la FAO (*Food and Agriculture Organization*) y la WHO (*World Health Organization*). El alto contenido en lisina permite complementar las proteínas de levadura con la de cereales, en los cuales este aminoácido es limitante [23,31–33]. Desde hace casi un siglo las levaduras se utilizan como suplemento proteico en la alimentación animal. Sin embargo, la mayor limitante en el uso de levaduras en la alimentación humana es el elevado contenido de ácidos nucleicos (entre un 5 y 13%), especialmente de ácido ribonucleico (ARN) [34,35]. Estudios realizados demostraron que ingestas de levadura con un contenido de ARN de 2 g puede conducir a altos niveles de ácido úrico plasmático que superan lo aceptable para un buen estado de salud (4 a 7 mg de ácido úrico/100 mL plasma). Estos niveles pueden generar con el tiempo la aparición de gota artrítica y tofos, por deposición de este compuesto en los tejidos blandos y en las articulaciones [34,36,37]. Otra limitante en el uso de levadura con fines nutricionales es la baja digestibilidad de sus proteínas, debido a la dificultad del sistema digestivo para degradar la pared celular. Sin embargo, la digestibilidad puede aumentar significativamente mediante una ruptura celular [34,38].

La cantidad de hidratos de carbono está en el orden del 30 al 35% b.s., principalmente son de reserva (glucógeno y trehalosa) y estructurales ( $\beta$ -glucanos y mananos). Estos últimos son muy poco asimilables por el hombre, constituyendo la fibra dietaria [39].

Se ha demostrado que los  $\beta$ -glucanos son compuestos bioactivos, con múltiples beneficios para la salud. Actúan estimulando al sistema inmune, tienen efecto antiinflamatorio, antimicrobiano, antiviral, antitumoral, reducen el colesterol y aceleran la cicatrización de heridas [20,23,40–42]. Asimismo, las mananoproteínas actúan como prebióticos, favoreciendo el desarrollo de bacterias lácticas e inhibiendo el desarrollo de patógenos en la microbiota intestinal [43,44].

El contenido de lípidos de las levaduras puede variar entre 1 y 7% b.s. según las especies o cepas utilizadas. La especie *S. cerevisiae* contiene una cantidad considerable

de ácidos grasos insaturados, considerados muy importante desde el punto de vista nutricional. Además posee esteroides y fosfolípidos [31].

La levadura además es rica en vitaminas del complejo B (excepto B12) y contiene entre 4 y 5% de cenizas, que refleja el elevado contenido de minerales, dentro de los cuales se destacan el calcio, magnesio, potasio, manganeso, zinc y cobre. El contenido de sodio por el contrario, es muy bajo [23,32,45].

### **1.3.3. Derivados de levadura**

Las células de levadura entera, debido a la organización estructural que poseen las proteínas, polisacáridos y fosfolípidos, no presentan buenas propiedades funcionales: forman dispersiones de baja viscosidad, tienen poca capacidad de emulsionar o espumar y además aportan generalmente sabor y color poco agradables. Estas características limitan la utilización de levadura como ingrediente alimentario, excepto como se mencionó anteriormente, cuando se la utiliza en forma activa por su poder fermentativo o en forma inactiva con fines nutricionales [7]. Sin embargo, cuando la pared celular se rompe, los componentes celulares se liberan. Con un adecuado proceso de fraccionamiento y purificación, pueden obtenerse derivados de alto valor agregado, que además de las propiedades nutricionales mencionadas anteriormente, poseen buenas propiedades tecnofuncionales y pueden utilizarse como ingredientes en la industria de alimentos [1,46,47]. A continuación se detallan los principales derivados de levadura y sus propiedades tecnofuncionales.

#### **1.3.3.1. $\beta$ -glucanos**

Los  $\beta$ -glucanos son polisacáridos con elevada capacidad para retener agua. Gracias a esta propiedad pueden utilizarse como espesantes, como estabilizante en emulsiones o como sustituto de materia grasa en alimentos reducidos en lípidos. Si bien

estos polisacáridos están presentes en muchas bacterias, hongos, algas y plantas superiores como avena y cebada, la pared de levadura es una buena fuente de  $\beta$ -glucanos ya que representa entre 55 y 65% b.s. de esta levadura [39,48–50].

### **1.3.3.2. Mananoproteínas**

Las mananoproteínas debido a su estructura anfifílica, presentan buenas propiedades emulsionantes y estabilizantes en un rango de pH 6-9, que es comparable con la actividad emulsionante de lecitinas comerciales. Además, su uso en alimentos no modifica el aroma y sabor del producto [18,51,52]. Adicionalmente, tienen un efecto positivo en la calidad de vinos. Se ha demostrado que reducen la turbidez, previenen la precipitación de sales de tartrato, influyen en la intensidad del aroma, mejoran el color y reducen la astringencia [53–55].

### **1.3.3.3. Aislados y concentrados proteicos**

Los concentrados proteicos presentan buena capacidad de retención de agua y pueden formar geles a concentraciones superiores al 4%. La fracción soluble de proteínas poseen una elevada capacidad de hidratación, que es dependiente de la concentración y comparable con la de las caseínas [44]. Se ha demostrado además que la fosforilación de los concentrados proteicos aumenta su hidrofiliidad, mejorando sus propiedades de hidratación y emulsionantes [56,57]. Los concentrados con una fosforilación del 1% presentan buena capacidad emulsionante y estabilizan emulsiones sin diferencias significativas respecto de un aislado comercial de soja [32].

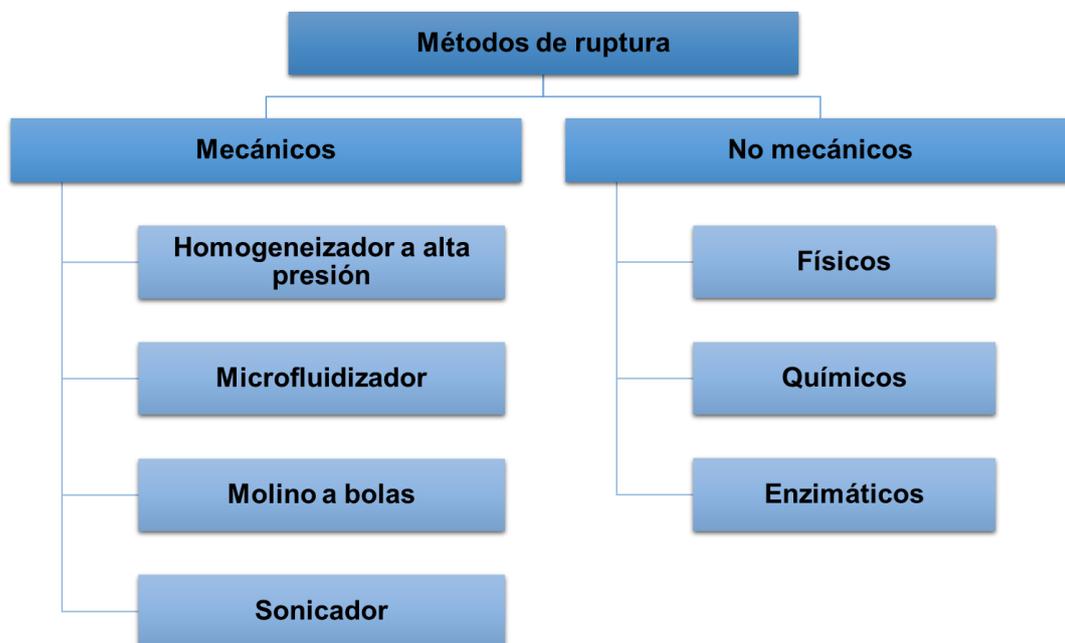
#### 1.3.3.4. Extractos de levadura

Los extractos de levadura se utilizan en la industria de alimentos como resaltadores del sabor en productos como salsas, sopas, snacks y alimentos enlatados. También se utilizan extractos en la industria microbiológica como fuente de nitrógeno en los medios de cultivos [27,45,58,59].

En la siguiente sección se detallarán los principales procesos de ruptura celular utilizados para la obtención de derivados de levadura.

#### 1.4. Ruptura celular

Existen actualmente diversos métodos para provocar la ruptura celular, ya sea de forma mecánica como no mecánica, como se muestra en la **Figura 1.3**. A escala industrial, los equipos más utilizados son el homogeneizador de alta presión, el microfluidizador y el molino a bolas, mientras que a escala de laboratorio además de estos equipos también se emplea la ultrasonicación. Los métodos no mecánicos se dividen en químicos, físicos y enzimáticos y son en general más específicos que los mecánicos [60–62].

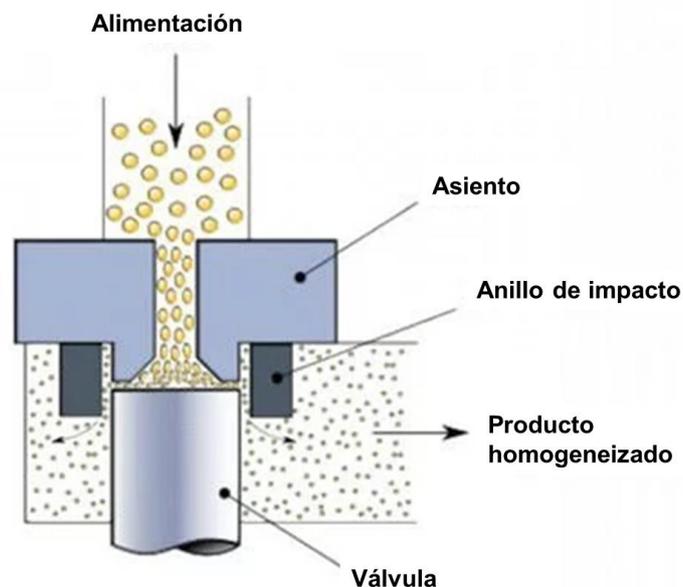


**Figura 1.3.** Clasificación de métodos de ruptura celular.

### 1.4.1. Métodos mecánicos

#### 1.4.1.1. Homogeneizadores a válvula de alta presión

La homogeneización de alta presión es un método ampliamente utilizado desde hace varias décadas, para obtener enzimas y proteínas celulares a partir de levaduras. [61–63]. En el mercado se encuentran equipos a escala laboratorio y a escala industrial. En la **Figura 1.4** se muestra un diagrama del funcionamiento del homogeneizador de alta presión. El diseño básico consiste en una bomba de desplazamiento positivo que fuerza a la suspensión de células a pasar por una válvula ajustable con un orificio de salida restringido. La presión se controla ajustando la fuerza de la válvula con un resorte o hidrodinámicamente. Cerca de la entrada de la válvula, la muestra adquiere una velocidad radial muy alta (en el orden de 200 a 300 m/s) y choca contra un anillo de impacto. Cuando la suspensión sale de la válvula puede pasar hacia otra válvula o hacia la descarga. Dentro de la válvula, las células son sometidas a turbulencia, cavitación y esfuerzos de corte. La fuerza de choque contra el anillo es la principal causa de ruptura celular [60,62,64,65].

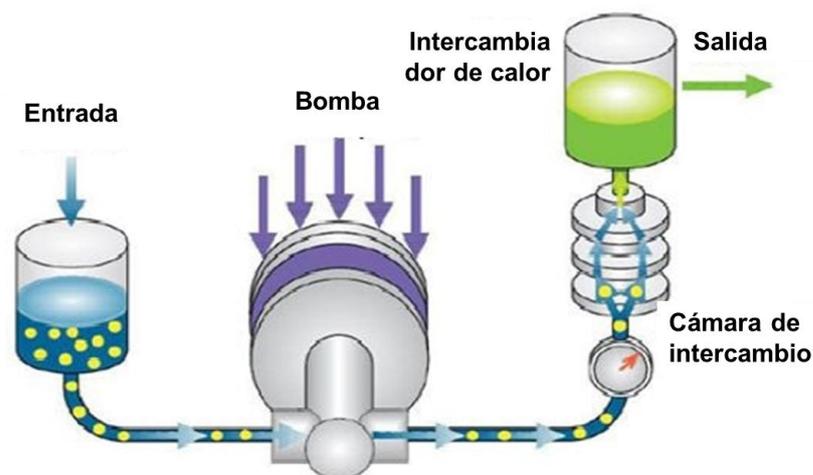


**Figura 1.4.** Diagrama del funcionamiento del homogeneizador de alta presión (Cortesía de Hommak).

El rango de presión en el que opera la bomba del homogeneizador oscila entre 100 y 1500 bar. El grado de ruptura aumenta con el incremento de la presión de homogeneización y con la cantidad de ciclos [66]. Sin embargo, como consecuencia de la compresión adiabática, el aumento de presión provoca un incremento de la temperatura, del orden de 2 °C por cada 100 bar que aumenta la presión. En muestras que no son afectadas por este aumento de temperatura, la eficiencia de ruptura aumenta. En cambio, en muestras termosensibles como las proteínas, es necesario refrigerar la suspensión para evitar su desnaturalización [60,67].

#### 1.4.1.2. Microfluidizador

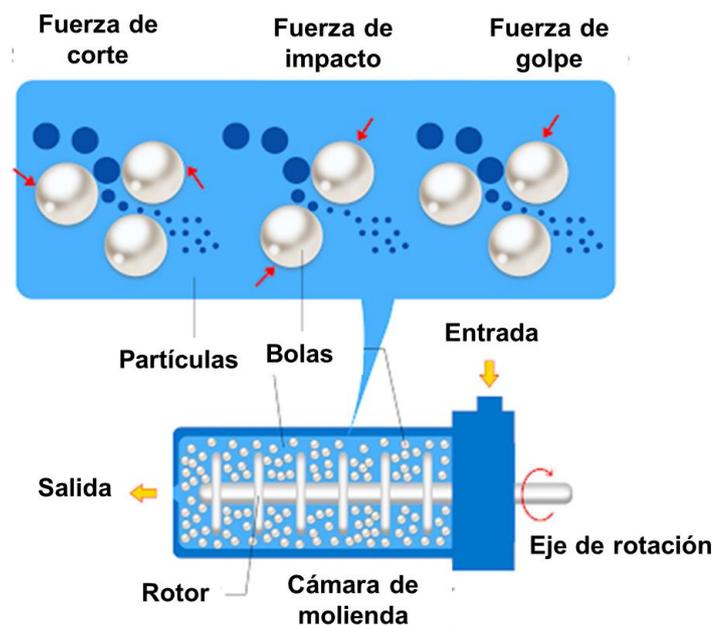
El equipo funciona con un principio diferente al homogeneizador de alta presión. En la **Figura 1.5** se muestra un diagrama de un microfluidizador. La muestra se coloca en el reservorio de entrada y una bomba genera una presión elevada, que conduce a la muestra hasta la cámara de interacción. En esta cámara, la corriente impacta a alta velocidad contra una superficie estacionaria. La energía entregada se disipa casi inmediatamente en el punto de impacto, provocando la ruptura celular. La presión de operación es función de la velocidad de flujo y de la unidad de ruptura. La eficiencia de la ruptura depende del tipo de célula, de su concentración y del número de pasajes a través del equipo [61,62].



**Figura 1.5.** Diagrama del funcionamiento del microfluidizador (Cortesía de Azo Materials).

### 1.4.1.3. Molino a bolas

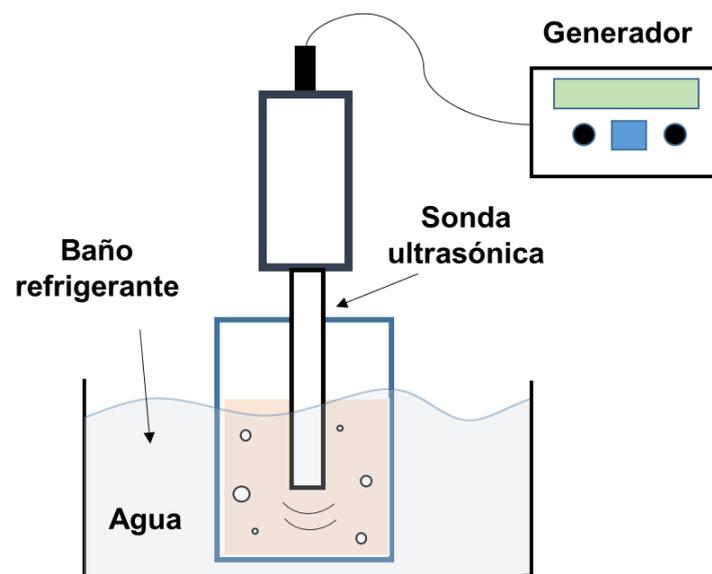
Existen varios modelos disponibles a escala de laboratorio e industrial. El equipo se basa en un tambor que contiene en su interior un eje con discos centrados o descentrados y pequeñas bolitas de acero o de vidrio. Los agitadores imparten energía cinética a las pequeñas bolitas, forzándolas a chocar entre ellas. La compactación y la acción de corte ejercida sobre las células, provoca su ruptura. Las bolitas (generalmente <math><1,5\text{ mm}</math> de diámetro) son retenidas dentro del tambor con un tamiz. Además, el tambor debe contar con una camisa refrigerante para absorber el calor que se disipa durante la ruptura (**Figura 1.6**). La eficiencia de este método depende de varios factores. Las condiciones más favorables se encontraron con una alta carga de bolitas (80-90% del espacio libre en el tambor) y de diámetro pequeño (0,5 mm), alta velocidad de agitación y una concentración de células moderada (40-50% base húmeda). Por otro lado, la obtención de pared celular de un tamaño muy pequeño y una ruptura no selectiva resulta en un incremento de los costos de purificación. Por lo tanto, este método no es eficiente para la recuperación de compuestos específicos [62,64,65].



**Figura 1.6.** Diagrama del funcionamiento del molino a bolas (Cortesía de ELE®).

#### 1.4.1.4. Sonicación

Este método se utiliza a escala de laboratorio y se basa en la ruptura celular causada por la gran fuerza de corte producida por el ultrasonido de alta frecuencia. Las ondas ultrasónicas causan la reducción local de la presión, generando la formación de millones de burbujas. Inmediatamente después de su formación, se produce el colapso de las burbujas con la consecuente liberación de una gran cantidad de energía mecánica que provoca la ruptura celular. Al igual que en la homogeneización a alta presión, la sonicación aumenta la temperatura de la muestra. Por este motivo, en dispersiones sensibles como las dispersiones de levadura, es necesario utilizar un baño refrigerante [46,65,68]. En la **Figura 1.7** se muestra un esquema de un sonicador.



**Figura 1.7.** Diagrama del funcionamiento de un sonicador.

#### 1.4.2. Métodos no mecánicos

##### 1.4.2.1. Métodos físicos

La ruptura celular y la liberación de componentes se pueden realizar por tratamiento térmico a temperaturas superiores a 120 °C [20,40,46,69]. A estas temperaturas se liberan mananoproteínas y  $\beta$ -glucanos de la pared celular y se produce la desnaturalización

proteica e inactivación de las enzimas. El rendimiento de este método es bajo. Otro método físico es la descompresión, en el cual una suspensión de células se mezcla con gas presurizado por un tiempo específico. El gas entra en la célula y se expande, causando la ruptura celular por la presión ejercida. Esta técnica tiene la ventaja de ser extremadamente suave, dejando fragmentos de pared de gran tamaño que se separan del sobrenadante por centrifugación con mayor facilidad. Desafortunadamente la eficiencia es baja. Otro método es el shock osmótico, en el cual la célula se equilibra en un medio con alta presión osmótica, y luego es rápidamente diluida. Esto provoca que el agua entre rápidamente a la célula, aumentando la presión interna y causando la lisis. Sin embargo, esta técnica solamente se puede aplicar en células con una pared frágil, resultando inapropiado para levaduras [62].

#### 1.4.2.2. Métodos químicos

La pared celular de los microorganismos puede ser permeabilizada por una gran cantidad de compuestos químicos como antibióticos, detergentes y solventes que poseen diferentes selectividad y eficiencia para cada especie de microorganismos. De esta manera se pueden extraer componentes solubles, como enzimas y nucleótidos. Por otro lado, el uso de ácidos o álcalis, o la combinación de ambos, permite obtener  $\beta$ -glucanos de pared, debido a que parte de ellos se solubilizan junto con las mananoproteínas. Sin embargo, el rendimiento de este método es bajo. Los métodos químicos en general no resultan adecuados para alimentos debido a que muchos de los reactivos utilizados no son de grado alimenticio. Además contaminan el sistema, dificultando los posteriores procesos de purificación de los componentes deseados [40,60,61,65]. Adicionalmente, el uso de reactivos químicos, especialmente ácidos y bases, pueden modificar la estructura de los componentes celulares, modificando sus propiedades funcionales o su actividad biológica [70].

### 1.4.2.3. Métodos enzimáticos

Los métodos enzimáticos son más “limpios” que los químicos y más selectivos. Para degradar la pared celular se pueden utilizar enzimas hidrolíticas que degradan al complejo de mananoproteínas y a las cadenas de  $\beta$ -glucanos. Las principales enzimas comerciales que se pueden utilizar son glicosidasas, glucanasas, peptidasas y lipasas [65].

Otro método basado en la lisis celular, pero en este caso con enzimas endógenas, es la autólisis, que consiste en la autodigestión de las células que se produce cuando escasean ciertos nutrientes, principalmente compuestos nitrogenados e hidratos de carbono. En estas condiciones las enzimas endógenas (glucanasas, proteasas y nucleasas) se activan y degradan macromoléculas insolubles como  $\beta$ -glucanos, proteínas y ácidos nucleicos, para producir productos solubles (monosacáridos, oligosacáridos, péptidos, aminoácidos y nucleótidos). El grado de autólisis y los productos obtenidos dependen principalmente del pH (entre 4 y 8,5), del tiempo (entre 1 hora y varios días), de la temperatura (entre 40 y 60 °C) y de la presencia de promotores (cloruro de sodio y acetato de etilo, entre otros) [20,27,59,71].

### 1.4.3. Combinación de métodos

Como se describió anteriormente, los distintos métodos de ruptura celular se basan en diferentes mecanismos de acción. La combinación de métodos tiene un efecto sinérgico en la ruptura celular, aumentando el rendimiento respecto de los métodos simples. Muchos métodos combinados se basan en la combinación de métodos mecánicos con métodos no mecánicos. Por ejemplo, se aprovecha la selectividad de los métodos químicos o enzimáticos, para realizar un pretratamiento y facilitar la ruptura mecánica posterior, o pueden aplicarse estos métodos no mecánicos para purificar compuestos luego de una ruptura mecánica [46,62,65]. En la próxima sección, se detallarán algunos métodos combinados que fueron utilizados para la obtención de diferentes derivados de levadura.

## 1.5. Obtención de derivados de levadura

Las condiciones de ruptura celular determinan las operaciones siguientes de fraccionamiento y purificación de los compuestos de interés. Los métodos mecánicos producen en general un mayor grado de ruptura celular, que dificultan la separación entre el contenido intracelular y los pequeños fragmentos de pared celular. Por el contrario, los métodos no mecánicos son más suaves, no producen una ruptura celular completa, lo cual facilita la purificación de compuestos solubles [65]. Existe actualmente abundante bibliografía sobre la obtención de componentes celulares de interés comercial, ya sea por sus usos nutricionales o por sus propiedades funcionales. A continuación se describen algunos métodos de obtención de los principales derivados de levadura.

### 1.5.1. $\beta$ -Glucanos

Existen numerosos trabajos sobre obtención y purificación de  $\beta$ -glucanos. Freimund y col. (2003) utilizaron métodos combinados de tratamiento térmico (125 °C, 5 horas), seguido de una separación por centrifugación. Al residuo sólido obtenido le aplicaron un tratamiento alcalino suave y con proteasas para eliminar proteínas y luego un lavado con acetona y etanol para extraer los lípidos. Con la combinación de estos métodos obtuvieron  $\beta$ -glucanos con un rendimiento del 87% y una pureza superior al 92% [40]. Por otro lado, Suphantharika y col. (2003) demostraron que también es posible obtener  $\beta$ -glucanos a partir de levadura residual. En primer lugar realizaron una autólisis con un posterior tratamiento alcalino en caliente del sedimento y un lavado con agua. El producto obtenido tuvo una pureza del 51% [72]. Asimismo, Thammakiti y col. (2004) también obtuvieron pared celular por autólisis y posterior homogeneización a alta presión de la levadura residual. Los  $\beta$ -glucanos obtenidos fueron aislados por extracción en caliente en medio alcalino y ácido y finalmente lavados con agua. En este caso, la pureza aumentó al 59% [39]. Por otro lado, Liu y col. (2008) desarrollaron otro método para obtener  $\beta$ -glucanos a partir de levadura residual, en un proceso de 5 etapas; autólisis (55 °C, 24 horas),

extracción con agua caliente (121 °C, 4 horas), homogeneización (40 – 80 MPa), extracción con solvente orgánico al residuo sólido obtenido e hidrólisis con proteasas. Esta combinación de métodos tiene la ventaja de no provocar la degradación de  $\beta$ -glucanos, tiene un alto rendimiento y el producto obtenido tiene una elevada pureza (93%) [20]. Basados en este trabajo, Magnani y col. (2009) y da Silva y col. (2014) siguieron el mismo protocolo, reemplazando la etapa de homogeneización a alta presión por sonicación (20 kHz, 150 W, 2 a 6 min). El producto obtenido tuvo un alto rendimiento y grado de pureza [51,73]. Por otro lado, Borchani y col. (2014), combinaron un tratamiento térmico en agua (125 °C, 5 horas) con un posterior tratamiento enzimático con proteasas y lipasas (45 °C, 5 horas). El producto obtenido tuvo un rendimiento del 18% y una pureza del 79% de  $\beta$ -glucanos. Aunque el rendimiento fue bajo comparado con otros métodos, el tratamiento con agua y enzimas no daña la estructura original de las cadenas del polisacárido, preservando sus propiedades [41]. Por otro lado, Dimopoulos y col. (2020), obtuvieron  $\beta$ -glucanos combinando un proceso de homogeneización a alta presión seguido de autólisis y demostraron que la combinación de ambos métodos aumenta el rendimiento y la pureza de los  $\beta$ -glucanos obtenidos [74].

### 1.5.2. Mananoproteínas

Al igual que en la extracción de  $\beta$ -glucanos, para obtener mananoproteínas es necesario romper la pared celular. Muchos de los métodos explicados anteriormente para la obtención de  $\beta$ -glucanos, dan como subproducto una fracción soluble rica en mananoproteínas que puede ser aislada y purificada. Por ejemplo, da Silva y col. (2014), precipitaron las mananoproteínas del sobrenadante obtenido luego del proceso de autólisis, con alcohol absoluto (3:1) a 4 °C [51]. Freimund y col. (2003) también obtuvieron mananoproteínas por precipitación con etanol del sobrenadante obtenido luego del tratamiento térmico a 121 °C [40].

Las mananoproteínas también pueden ser extraídas de la pared celular en medio alcalino, ya que son solubles en este medio. Sin embargo, en estas condiciones también se solubilizan otras proteínas, sales, algunos  $\beta$ -glucanos álcali-solubles y se dispersan lípidos de la membrana celular [45,75].

Otros métodos como el de Li y col. (2018), se basan en un tratamiento térmico para romper la pared, separación de la fracción soluble rica en mananoproteínas y posterior tratamiento enzimático con glucanasas comerciales a la fracción soluble, para eliminar restos de  $\beta$ -glucanos [52].

### 1.5.3. Aislados y concentrados proteicos

Los aislados y concentrados proteicos se pueden obtener por ruptura celular mecánica y posterior precipitación ácida de las proteínas del sobrenadante llevándolas a su punto isoeléctrico (pH 4) y luego resuspendiéndolas a pH neutro [33,76]. Para disminuir el contenido de ácidos nucleicos se pueden utilizar métodos químicos o enzimáticos. La mayoría de los métodos químicos se basan en la hidrólisis de los ácidos nucleicos en medio alcalino que permite extraer a los nucleótidos solubles. Sin embargo, el aumento de pH puede desnaturalizar a las proteínas modificando sus propiedades funcionales, a la vez que aumenta la cantidad de mananoproteínas de la pared celular que se solubilizan y pasan a formar parte del aislado obtenido. Los métodos enzimáticos se basan en el uso de nucleasas exógenas que hidrolizan a los ácidos nucleicos o la activación de las nucleasas endógenas mediante choque térmico (50-65 °C), iniciando un proceso de autólisis. La temperatura y el pH deben optimizarse para disminuir las pérdidas de proteínas por acción de las proteasas endógenas [7].

### 1.5.4. Extractos

Los extractos de levadura son concentrados de los componentes solubles de las células de levadura, entre los que se encuentran aminoácidos, péptidos, mononucleótidos

(50-guanosina monofosfato y 50-inosina monofosfato) y otros componentes solubles de la célula. Se pueden obtener por ruptura celular mediante un proceso de autólisis y posterior centrifugación y filtrado para eliminar los restos insolubles. Los principales parámetros que determinan el perfil de flavor del extracto y su rendimiento son la temperatura y duración de la autólisis, el pH y la presencia de promotores como cloruro de sodio, acetato de etilo o acetato de amilo [27,59,71]. El agregado de enzimas exógenas como proteasas, aumenta el rendimiento, facilita la separación del extracto de los componentes insolubles y presenta menor riesgo a la contaminación microbiana debido a que el proceso se lleva a cabo en menos tiempo [58]. También es posible obtener extractos a partir de otros métodos como termólisis (calentamiento a 100 °C), plasmólisis (altas concentraciones de sales a temperaturas moderadas) y desintegración mecánica (homogeneización a alta presión) [45].

## 1.6. Emulsiones

### 1.6.1. Clasificación

Las emulsiones son sistemas heterogéneos formados por dos o más fases inmiscibles. En el caso más simple de un sistema de dos fases, una de ellas está dividida en pequeñas gotas dispersas en la otra fase, continua o dispersante. Si la fase dispersa es lipídica y la continua es acuosa (ejemplo: crema de leche y mayonesa), la emulsión se denomina aceite en agua (o/w). Por el contrario, si la fase dispersa es acuosa y la continua lipídica (ejemplo: manteca y margarina), la emulsión se llama agua en aceite (w/o) [77]. También es posible encontrar en alimentos sistemas más complejos, como emulsiones múltiples y emulsiones espumadas. Las emulsiones múltiples pueden ser agua en aceite en agua (w/o/w) o aceite en agua en aceite (o/w/o). Por ejemplo una emulsión w/o/w consiste en gotas de agua dispersas dentro de grandes gotas de aceites las cuales a su vez están dispersas en una fase acuosa [78] **(Figura 1.8)**.

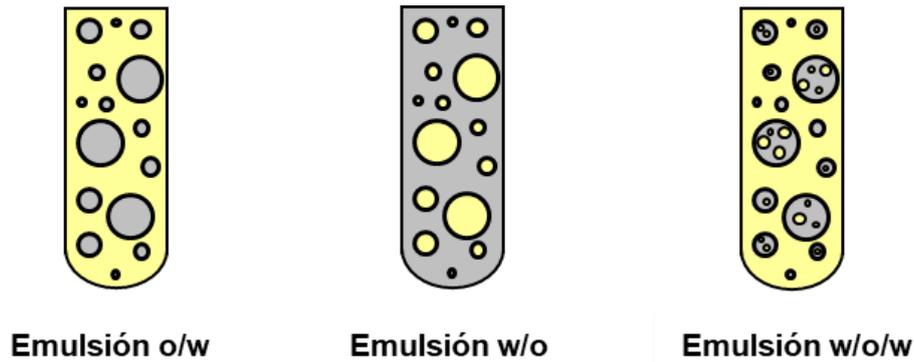


Figura 1.8. Clasificación de emulsiones.

### 1.6.2. Formación de emulsiones

El proceso en el cual se forma una emulsión se llama homogeneización y puede clasificarse en primaria y secundaria. La homogeneización primaria es la creación de una emulsión a partir de dos líquidos inmiscibles, mientras que la homogeneización secundaria es la reducción del tamaño de gotas de una emulsión ya existente, como ocurre en la reducción de tamaño de los glóbulos grasos en la leche (**Figura 1.9**) [79].

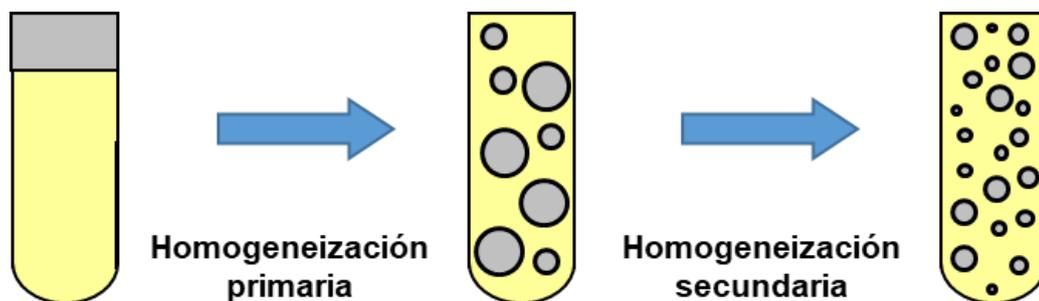


Figura 1.9. Homogeneización primaria y secundaria.

### 1.6.3. Dispositivos de homogeneización

Existen en la actualidad muchos tipos de homogeneizadores a escala industrial o de laboratorio, que se diferencian entre ellos en la potencia de homogeneización, el modo de operación (continuo o discontinuo), el tamaño de gota que puede generar, el volumen

de muestra necesario y la viscosidad de la muestra. En la **Tabla 1.2** se muestran las características principales de algunos de ellos [79].

**Tabla 1.2.** Comparación de diferentes tipos de homogeneizadores [79].

Homogeneizador	Modo de operación	Tamaño de gota ( $\mu\text{m}$ )	Viscosidad de la muestra
Homogeneizador de alta velocidad	Batch	2	Baja - media
Molino coloidal	Continuo	1	Media - alta
Homogeneizador de membrana	Batch / Continuo	0,3	Baja - media
Homogeneizador a válvula de alta presión	Batch / Continuo	0,1	Baja - media
Sonda ultrasónica	Batch / Continuo	0,1	Baja - media
Microfluidizador	Continuo	<0,1	Baja-media

Los homogeneizadores de alta velocidad como el Ultraturrax® o el Polytron®, tienen un sistema de rotor estator y pueden alcanzar velocidades de hasta 25000 rpm. Estos homogeneizadores se utilizan para preparar emulsiones primarias [80].

Los molinos coloidales son más eficaces para realizar una homogeneización secundaria. Comercialmente se encuentra una gran variedad de equipos, pero en todos ellos la pre-emulsión ingresa a través de un pequeño orificio entre dos discos: el rotor (disco móvil) y el estator (disco inmóvil). La rotación a alta velocidad del rotor genera un esfuerzo de corte que divide las gotas grandes en otras más pequeñas [79].

En los homogeneizadores de membrana, la emulsión se forma haciendo pasar una de las fases inmiscibles hacia la otra fase, a través de una membrana de vidrio o cerámica con poros uniformes. Este dispositivo puede utilizarse para formar emulsiones o/w o w/o [79].

Los homogeneizadores a válvula de alta presión, las sondas ultrasónicas y los microfluidizadores ya fueron descritos en la **Sección 1.4.2.**, ya que son los mismos

equipos que se utilizan para ruptura celular. Los primeros son adecuados para realizar una homogeneización secundaria, mientras que las sondas ultrasónicas y la mayoría de los microfluidizadores se utilizan para homogeneización primaria [79].

#### 1.6.4. Concentración de fase dispersa

Muchas de las propiedades de las emulsiones como su vida útil, apariencia, textura y sabor, están relacionadas con la concentración y tamaño de las gotas de la fase dispersa. En emulsiones o/w, la concentración de aceite se puede expresar como fracción volumétrica ( $\phi_v$ ) o fracción másica ( $\phi_m$ ) (**Ecuación 1.1 y 1.2**).

$$\phi_v = \frac{V_D}{V_E} \quad (\text{Ec. 1.1})$$

$$\phi_m = \frac{m_D}{m_E} \quad (\text{Ec. 1.2})$$

donde  $V_D$  es el volumen de fase dispersa (aceite),  $V_E$  es el volumen de la emulsión,  $m_D$  es la masa de fase dispersa y  $m_E$  es la masa de emulsión [79].

Este parámetro brinda información sobre la cantidad total de aceite incorporado, pero no sobre la cantidad de gotas presentes. Por lo tanto, para poder caracterizar mejor a estas dispersiones es necesario conocer la distribución de tamaño de partícula, que será explicada en la **Sección 2.12**.

#### 1.6.5. Estabilidad cinética y termodinámica

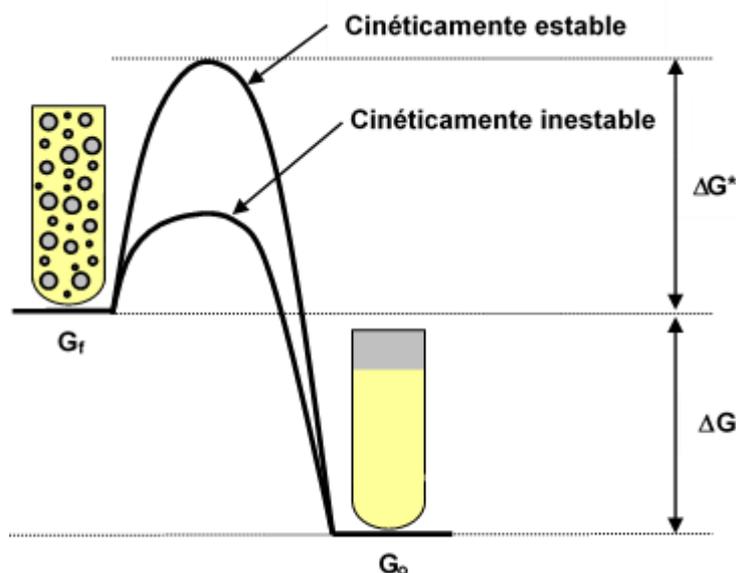
Para estudiar la estabilidad de emulsiones es preciso diferenciar entre estabilidad termodinámica y estabilidad cinética. La estabilidad termodinámica indica si un proceso puede ocurrir o no, mientras que la cinética hace referencia a la velocidad con que ocurre el proceso de desestabilización. Todas las emulsiones alimentarias son termodinámicamente inestables, sin embargo pueden ser más o menos estables

cinéticamente. El origen de la inestabilidad termodinámica se evidencia al comparar la energía libre de Gibbs antes y después del proceso de emulsificación (**Ecuación 1.3**).

$$\Delta G = \gamma \cdot \Delta A \quad (\text{Ec.1.3})$$

donde  $\Delta G$  es la variación de la energía libre de Gibbs del sistema,  $\gamma$  es la tensión interfacial y  $\Delta A$  es la variación del área interfacial. De esta ecuación se desprende que el incremento en el área interfacial producido durante el proceso de emulsificación, provoca un aumento en la energía libre y por lo tanto, la desestabilización del sistema. Por otro lado, la disminución de la tensión interfacial generada por la presencia de emulsionantes, aumenta la estabilidad termodinámica [81].

La estabilidad cinética en cambio, explica por qué algunos sistemas pueden permanecer estables o metaestables por largos períodos de tiempo (días, semanas o incluso años). Esto se atribuye a que el pasaje desde un estado de mayor energía a otro de menor energía implica alcanzar cierta energía de activación ( $\Delta G^*$ ). Por lo tanto, cuanto mayor sea esta barrera energética más estable será la emulsión (**Figura 1.10**) [79].



**Figura 1.10.** Demostración esquemática de la diferencia entre estabilidad cinética y termodinámica. Adaptado de McClements [79].

Las emulsiones tienen varios estados metaestables, y cada uno de ellos posee su propia energía de activación. El pasaje de un estado metaestable a otro puede ser suficiente para influir negativamente en las propiedades y en la calidad de un alimento [77].

### 1.6.6. Procesos de desestabilización de emulsiones

Los principales procesos de desestabilización de una emulsión son la separación gravitacional (cremado y sedimentación), floculación, desproporción, coalescencia e inversión de fases (**Figura 1.11**). Estos mecanismos pueden ocurrir simultáneamente y en general uno de ellos es el predominante [79].

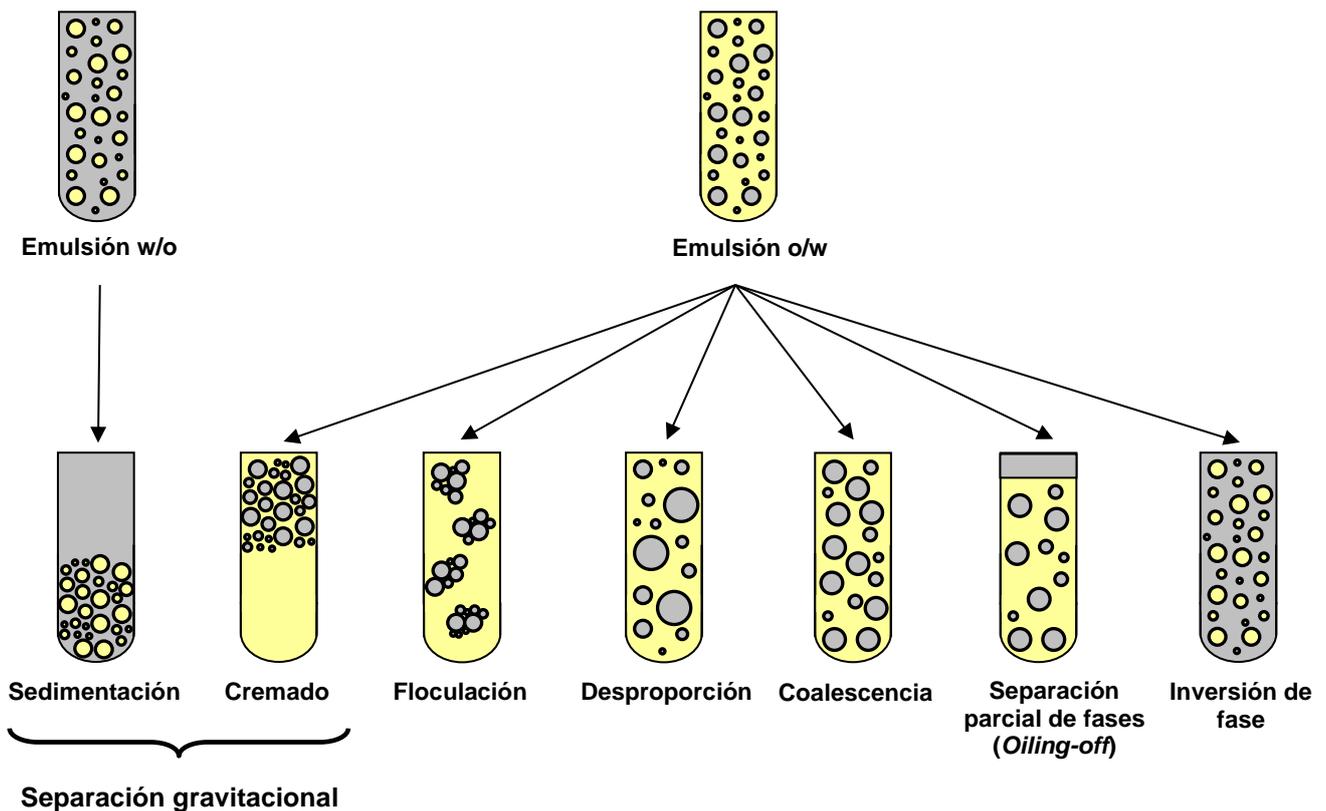


Figura 1.11. Esquema de los diferentes mecanismos de desestabilización de emulsiones.

### 1.6.6.1. Separación gravitacional

Generalmente las gotas tienen diferente densidad que la fase continua que las rodea y por lo tanto actúan sobre ellas fuerzas gravitatorias. Si las gotas son de aceite (emulsión o/w), su densidad será menor que la de la fase acuosa y tenderán a ascender. Este proceso se denomina cremado. Por el contrario, si las gotas son acuosas (emulsión w/o), su densidad será mayor a la de la fase continua lipídica y tenderán a descender. Este proceso se denomina sedimentación.

En un sistema ideal, la velocidad con la cual una partícula esférica aislada se mueve (asciende o descende) a través de la fase continua se puede calcular a partir de la Ley de Stokes (**Ecuación 1.4**).

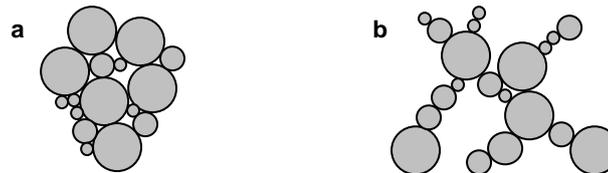
$$v_{gotas} = \frac{2gr^2(\rho_2 - \rho_1)}{9\mu} \quad (\text{Ec 1.4})$$

donde  $g$  es la gravedad,  $r$  el radio de las gotas,  $\rho_1$  y  $\rho_2$  son las densidades de la fase continua y dispersa respectivamente y  $\mu$  es la viscosidad de la fase continua. A partir de la ley de Stokes se observa que la velocidad es directamente proporcional al radio de las gotas y a la diferencia entre las densidades de ambas fases e inversamente proporcional a la viscosidad de la fase continua. Sin embargo, en sistemas reales, la velocidad de cremado o sedimentación pueden diferir de la calculada a partir de la Ley de Stokes debido a la fricción entre las gotas, que se opone al movimiento. En una emulsión o/w, al aumentar la fracción volumétrica de aceite, la velocidad de cremado se reduce respecto de la predicción realizada por la Ley de Stokes [77,81].

### 1.6.6.2. Floculación

La floculación es el proceso mediante el cual dos o más gotas se unen para formar un agregado, pero sin perder su individualidad. Dependiendo del tipo de emulsionante y de

la concentración de aceite, se pueden formar flóculos compactos o abiertos (**Figura 1.12**). Cuando los flóculos son compactos, aumenta la velocidad de cremado debido a que aumenta el tamaño efectivo de las partículas (**Ecuación 1.4**). Por el contrario, los flóculos abiertos forman una red tridimensional que reduce la movilidad de las gotas, aumentando la estabilidad de la emulsión [79].



**Figura 1.12.** Diagrama esquemático de los distintos tipos de flóculos: a) flóculo compacto, b) flóculo abierto.

### 1.6.6.3. Desproporción

La desproporción es el proceso mediante el cual las gotas más grandes crecen a expensas de las más pequeñas debido al transporte de fase dispersa a través de la fase continua. Este proceso es insignificante en la mayoría de los alimentos emulsionados, debido a que la solubilidad de los triglicéridos en agua es tan baja que el transporte de masa es despreciable [77,79].

### 1.6.6.4. Coalescencia

La coalescencia es el proceso mediante el cual dos o más gotas se unen para formar una de mayor tamaño. De esta forma, la emulsión pasa a un estado termodinámicamente más estable, ya que disminuye el área interfacial total entre las fases (**Ecuación 1.3**). La coalescencia depende del potencial de interacción entre las gotas y de la resistencia del film interfacial a la ruptura. Este proceso favorece la separación gravitacional debido a que aumenta el tamaño de las gotas [79,82].

#### 1.6.6.5. Separación parcial de fases (*Oiling-off*)

Este proceso es consecuencia de una avanzada coalescencia, en el cual se observa la separación parcial de fase dispersa, que forma una capa de aceite en la superficie de la emulsión [79].

#### 1.6.6.6. Inversión de fases

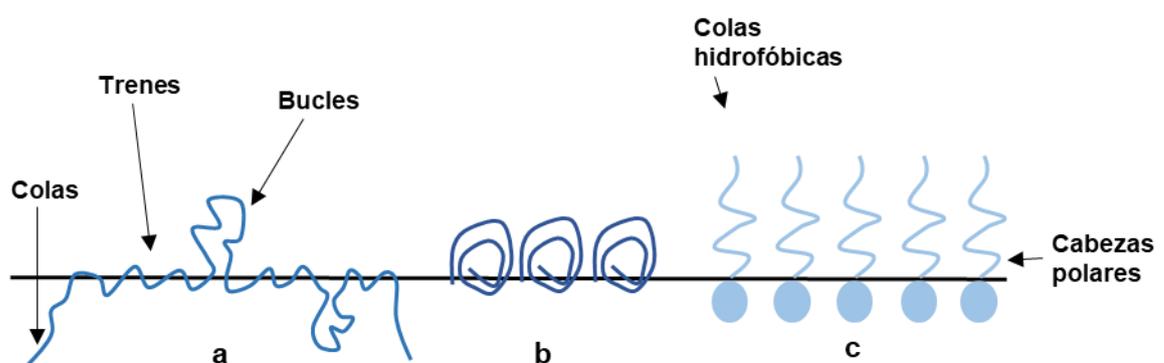
La inversión de fases es el proceso mediante el cual la emulsión cambia de o/w a w/o o viceversa. Este proceso es la etapa esencial en la elaboración de muchos alimentos emulsionados, como por ejemplo la manteca (emulsión w/o) a partir de la crema de leche (emulsión o/w). En otros productos la inversión de fases es indeseable debido a que modifica la apariencia, textura y gusto [79].

#### 1.6.7. Emulsionantes

Los emulsionantes son sustancias tensioactivas que se adsorben en la interfase aceite – agua formando una monocapa y disminuyendo la tensión interfacial. De esta manera, disminuye la energía libre de Gibbs y el sistema es más estable termodinámicamente (**Ecuación 1.3**). Los agentes emulsionantes pueden ser de origen proteico, lipídico o glucídico [79].

Las proteínas son biopolímeros que durante la homogeneización, se adsorben en la interfase, orientando los grupos polares hacia la fase acuosa y los grupos no polares hacia la fase lipídica. Las propiedades funcionales de estos biopolímeros están estrechamente relacionadas con sus características moleculares. Las proteínas varían ampliamente en su masa molecular, carga eléctrica, conformación e hidrofobicidad superficial. Generalmente las proteínas con buena capacidad emulsionante son globulares o con estructuras desordenadas flexibles [83]. La mayoría de las proteínas globulares son moléculas rígidas y por lo tanto su reordenamiento es lento. Poseen una conformación

aproximadamente globular en la interfase, aunque diferente a la conformación nativa. En cambio, algunas proteínas globulares son flexibles y durante la adsorción se desnaturalizan exponiendo los aminoácidos hidrofóbicos que originalmente se encontraban en el interior, e interaccionan con proteínas vecinas a través de interacciones hidrofóbicas o puentes disulfuro. Las membranas que forman son relativamente delgadas y compactas, con una alta viscoelasticidad. Por otro lado, las proteínas con estructuras terciarias no definidas o desordenadas flexibles tienden a formar una membrana relativamente abierta y con una baja viscoelasticidad [84]. En la interfase, las cadenas polipeptídicas pueden adoptar distintas conformaciones: trenes, bucles o colas (**Figura 1.13**). Los trenes y bucles son segmentos que contactan directamente con la interfase, mientras que las colas se sitúan habitualmente en la fase acuosa. Cuanto mayor es la proporción de trenes, más fuerte será la unión y menor la tensión interfacial. A una concentración de proteína elevada se pueden adsorber multicapas, aunque la adsorción de la segunda capa y las más distantes es muy débil [84].



**Figura 1.13.** Diferencias en el modo de adsorción de a) proteína flexible, b) proteína globular rígida, c) lípidos polares. Adaptada de Damodaran y col. [84].

Los emulsionantes lipídicos son lípidos polares que consisten en moléculas relativamente pequeñas, con una zona polar y otra no polar. Los fosfolípidos, los mono- y diglicéridos y los ésteres de monoglicéridos, son ejemplo de este tipo de emulsionantes. Una característica importante de un tensioactivo lipídico es su valor de HLB (balance

hidrofílico – lipofílico). Este parámetro brinda información sobre su solubilidad en aceite o en agua y se puede predecir a partir de él, que tipo de emulsión se formará (aceite en agua o agua en aceite). Un emulsionante con un bajo HLB (entre 3 y 6) es predominantemente hidrofóbico y se disolverá preferentemente en aceite, estabilizando emulsiones agua en aceite. Por el contrario, los emulsionantes con HLB elevados (entre 8 y 18) estabilizarán emulsiones aceite en agua, ya que son predominantemente hidrofílicos y más solubles en agua. Aquellos emulsionantes con un HLB intermedio (entre 6 y 8) no poseen una preferencia por el aceite o el agua, mientras que aquellos con un valor menor a 3 o mayor a 18 no migran a la interfase sino que tienden a acumularse en la fase lipídica o en la acuosa, respectivamente [79,85].

La adsorción de los lípidos polares es diferente a la de las proteínas (**Figura 1.13**). Orientan sus grupos polares hacia la fase acuosa y los no polares hacia la fase lipídica y como carecen de impedimentos conformacionales porque sus porciones hidrofóbicas e hidrofílicas están en extremos opuestos de la molécula, se adsorben en la interfase más rápidamente que las proteínas. Esto genera que estas moléculas disminuyan con mayor eficiencia la tensión interfacial. Sin embargo, las proteínas forman una membrana viscoelástica alrededor de la gota de aceite, que además de reducir la tensión interfacial resiste los choques mecánicos durante el almacenamiento y manipulación, dando una emulsión más estable que la obtenida con emulsionantes de origen lipídico [79,84].

La mayoría de los polisacáridos utilizados en la industria de alimentos son muy hidrofílicos y su capacidad emulsionante es muy pobre. Sin embargo, algunos polisacáridos como la goma arábiga, algunos almidones modificados y la celulosa modificada poseen una estructura anfifílica y tienen la capacidad de reducir la tensión interfacial [83].

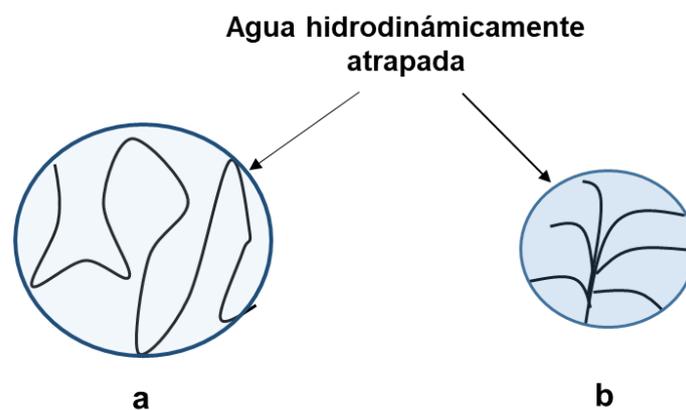
Muchos sistemas, como las dispersiones de levadura, contienen una mezcla de sustancias con actividad emulsionante. Las características del film interfacial que se forma dependen de las características de los emulsionantes y del tipo de interacciones entre ellos. La composición interfacial depende de las velocidades de adsorción relativas de los

distintos tipos de emulsionantes, la cual depende de las características moleculares como tamaño, forma y polaridad. Durante la homogeneización, las gotas de aceite son recubiertas primero por las moléculas que se adsorben más rápidamente. Sin embargo, la composición inicial de la interfase puede cambiar durante el almacenamiento de la emulsión debido a que las moléculas que se habían adsorbido inicialmente pueden ser desplazadas por otras moléculas con mayor afinidad por la interfase. En algunas mezclas de emulsionantes, los polisacáridos y las proteínas pueden formar multicapas alrededor de las gotas de aceite, aumentando la estabilidad del sistema [79]. Cuando en la mezcla hay lípidos polares, como los fosfolípidos, éstos al migrar más rápidamente que las proteínas, pueden competir con ellas por la interfase, desplazándolas y debilitando el film [86]. Sin embargo, dependiendo de las características estructurales, los lípidos polares y las proteínas pueden formar un film interfacial muy estable como ocurre con las lipoproteínas de la yema de huevo [87].

Así como los emulsionantes pueden adsorberse en la interfase, algunas partículas sólidas como por ejemplo sílice, quitosano, proteínas insolubles, complejos insolubles de proteínas y polisacáridos, gránulos de almidón, bacterias o levaduras también pueden adsorberse y formar una película protectora alrededor de las gotas. Este tipo de estabilización se conoce con el nombre de Pickering [88–90]. A diferencia de los lípidos polares y las proteínas, estas partículas no reducen la tensión interfacial sino que forman una barrera física que impide que dos gotas cercanas coalescan [91]. La capacidad estabilizante de las partículas sólidas depende de su tamaño, forma y ángulo de contacto cuando se adsorbe en la interfase. De la misma forma que ocurre con las mezclas de emulsionantes, en sistemas donde coexisten partículas sólidas y emulsionantes convencionales, el efecto puede ser sinérgico, logrando una mayor estabilidad de la emulsión, o antagónico, favoreciendo la desestabilización del sistema [92].

### 1.6.8. Estabilizantes

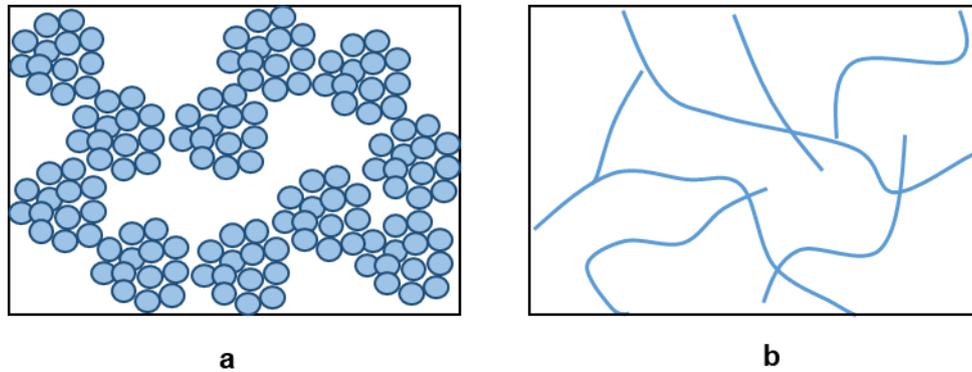
Los estabilizantes son sustancias que aumentan la viscosidad de la fase continua, disminuyendo la velocidad de desestabilización de la emulsión (**Ecuación 1.4**). Además modifican la textura y palatabilidad del producto. Si bien las proteínas pueden utilizarse como agentes estabilizantes, los polisacáridos son más eficaces y para una misma concentración proporcionan un mayor aumento de la viscosidad de la dispersión. La capacidad espesante de un polisacárido depende principalmente del peso molecular, del grado de ramificación, de la conformación y de la flexibilidad de la molécula [79]. En dispersión acuosa, algunos polisacáridos tienen la capacidad de rotar rápidamente debido a su energía térmica y atrapar un volumen esférico de agua con un diámetro que se extiende de punta a punta del polisacárido. Como el aumento de viscosidad producido por el hidrocoloide es proporcional al volumen de agua retenido, los polisacáridos lineales aumentan más la viscosidad que aquellos ramificados de igual peso molecular (**Figura 1.14**).



**Figura 1.14.** Polímeros de igual peso molecular rotando con agua hidrodinámica atrapada. a) polímero lineal, b) polímero ramificado.

Dependiendo el tipo y concentración de proteína o polisacárido utilizados, pueden formarse emulsiones gelificadas, que son mucho más estables frente a los procesos de desestabilización. Los geles son redes tridimensionales que retienen una gran cantidad de

agua en su interior. Según el tipo de biopolímero, los geles pueden ser particulados, que consisten en una red tridimensional de agregados, o filamentosos cuando se entrelazan cadenas delgadas que retienen una gran cantidad de agua (**Figura 1.15**).



**Figura 1.15.** Tipos de estructuras de gel de biopolímeros. a) gel particulado, b) gel filamentoso.

El tipo de interacciones que mantiene unidas a las cadenas de biopolímeros entre sí depende de las características estructurales de las macromoléculas. Algunas proteínas, como la gelatina y algunos polisacáridos forman puentes de hidrógeno, los cuales se favorecen en frío y se debilitan al aumentar la temperatura. Los geles estabilizados principalmente por este tipo de interacciones son termorreversibles; mientras que las proteínas con grupos tioles son capaces de formar puentes disulfuro intermoleculares, que aumentan la fuerza y la estabilidad del gel. Este tipo de geles es irreversible, ya que una vez formado, no se modifica por fluctuaciones de temperatura. Las proteínas o polisacáridos con muchos grupos con carga van a interactuar entre sí electrostáticamente. Este tipo de interacciones son muy sensibles a los cambios de pH y al agregado de sales. Por ejemplo el catión calcio, puede formar puentes salinos entre cadenas cargadas negativamente, favoreciendo la formación del gel [79,84].

## 1.7. Objetivos

### 1.7.1. Objetivo general

Realizar tratamientos combinados de homogeneización a alta presión y tratamiento térmico a células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* para mejorar sus propiedades emulsionantes y estabilizantes en emulsiones o/w.

### 1.7.2. Objetivos específicos

- Optimizar el proceso de homogeneización a alta presión, para maximizar el grado de ruptura celular, minimizando los cambios producidos por el aumento de temperatura no controlado durante el proceso.
- Evaluar la capacidad emulsionante de las muestras de levadura homogeneizadas a alta presión.
- Caracterizar física y químicamente las dispersiones obtenidas por combinación de tratamientos térmico y de homogeneización a alta presión a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
- Estudiar las propiedades emulsionantes de las dispersiones obtenidas por combinación de tratamientos térmico y de homogeneización a alta presión.

# **CAPÍTULO 2**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## CAPÍTULO 2: MATERIALES Y METODOS

### 2.1. Materiales

Todas las dispersiones se realizaron a partir de levadura panadera (*S. cerevisiae*) prensada comercial (CALSA, AB Mauri Argentina, Tucumán). Para las emulsiones se utilizó aceite de girasol Cañuelas.

Todos los reactivos utilizados para la determinación de la composición química fueron de grado analítico.

### 2.2. Preparación de dispersiones

#### 2.2.1. Muestra control (L)

La dispersión de levadura se preparó mezclando una parte de levadura prensada con dos partes de agua destilada. Se homogeneizó en agitador magnético durante media hora y posteriormente se centrifugó a  $1.380 \times g$  (Centrífuga Beckman Coulter Avanti J2-MC, rotor JA-14) durante 15 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . El sedimento obtenido se resuspendió nuevamente en agua destilada hasta obtener una concentración de 10% m/m b.s. y se homogeneizó en agitador magnético durante al menos una hora. La muestra de levadura lavada obtenida se utilizó como control (L) y a partir de ella se prepararon todas las dispersiones homogeneizadas y/o tratadas térmicamente.

#### 2.2.2. Muestras homogeneizadas ( $H_{750}$ , $H_{1000}$ , $H_{1250}$ , $H_{1500}$ )

Las muestras homogeneizadas se obtuvieron por homogeneización a alta presión de la muestra L, en un homogeneizador a válvula (Panda 2K, GEA Niro-Soavi, Italia). Se prepararon cuatro muestras homogeneizadas a distintas presiones: 750 – 1000 – 1250 y 1500 bar, las cuales se identificaron como:  $H_{750}$ ,  $H_{1000}$ ,  $H_{1250}$  y  $H_{1500}$  respectivamente.

En la **Figura 2.1** se muestra una fotografía del homogeneizador PANDA 2K. El equipo cuenta con un embudo de silicona de 600 mL de capacidad en el cual se coloca la muestra. Por otro lado, la salida del equipo está unida mediante una manguera de goma a

un serpentín de acero inoxidable que se sumerge en un baño agua – hielo (no mostrado en la figura), para evitar el aumento de temperatura durante la homogeneización. El otro extremo del serpentín está conectado a otra manguera de goma que se introduce en el embudo, cuando se quiere recircular la muestra.

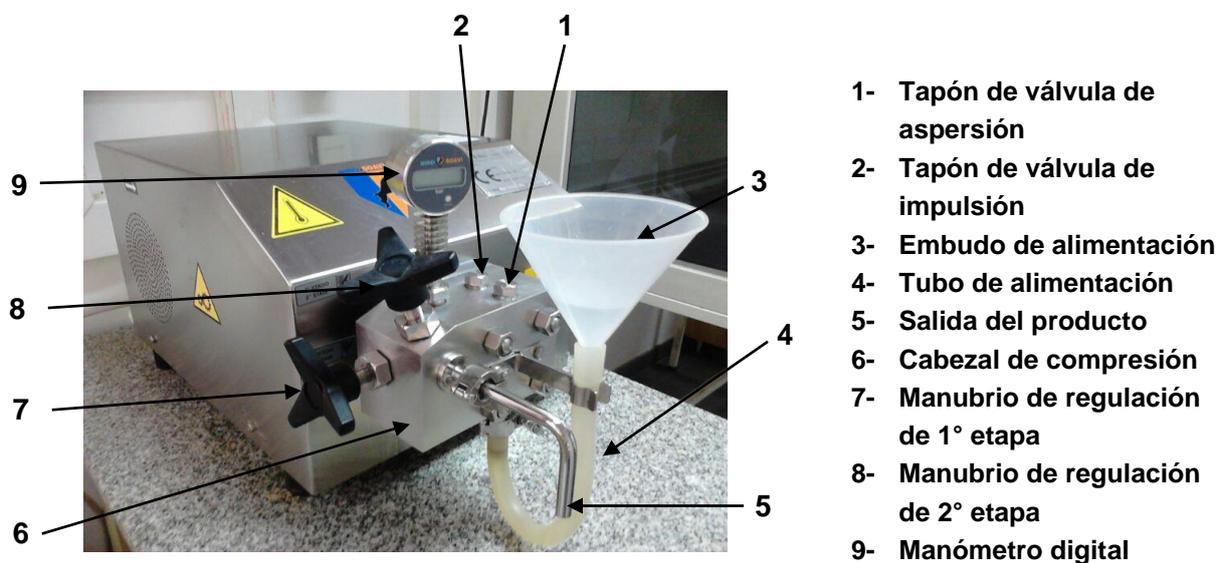


Figura 2.1. Fotografía de las partes externas del homogeneizador

La unidad de homogenización consta de dos válvulas (primera y segunda etapa) conectadas en serie, que poseen una cabeza de choque de bola de cerámica sobre una cabeza de paso de carburo de tungsteno, ensambladas sobre un cuerpo de acero inoxidable. Cada válvula posee un manubrio que se acciona de forma manual y están dotados de un sistema interno de amortiguación mediante muelles. La válvula de la primera etapa alcanza una presión máxima de 1500 bar, mientras que la de la segunda etapa, alcanza una presión de 150 bar (la relación entre la primera y segunda válvula debe ser siempre 10 a 1). La primera válvula tiene como objetivo micronizar la muestra, mientras que la segunda distribuye la graduación de la presión y evita la reaglomeración de las partículas micronizadas.

Para homogenizar la muestra, se la coloca en el embudo (agitando constantemente con varilla) y se enciende el interruptor. El equipo inicialmente está lleno de agua, por lo

cual, el fluido que sale durante los primeros segundos es agua o mezcla agua-muestra. Cuando comienza a salir muestra sin restos de agua, se introduce la manguera de la salida del serpentín en el interior del embudo y comienza a recircularse.

El aumento de presión se logra girando el manubrio de regulación hasta que el manómetro digital indique la presión deseada. En ese momento se comienza a medir el tiempo y una vez finalizado el proceso, se disminuye la presión y se recolecta el producto.

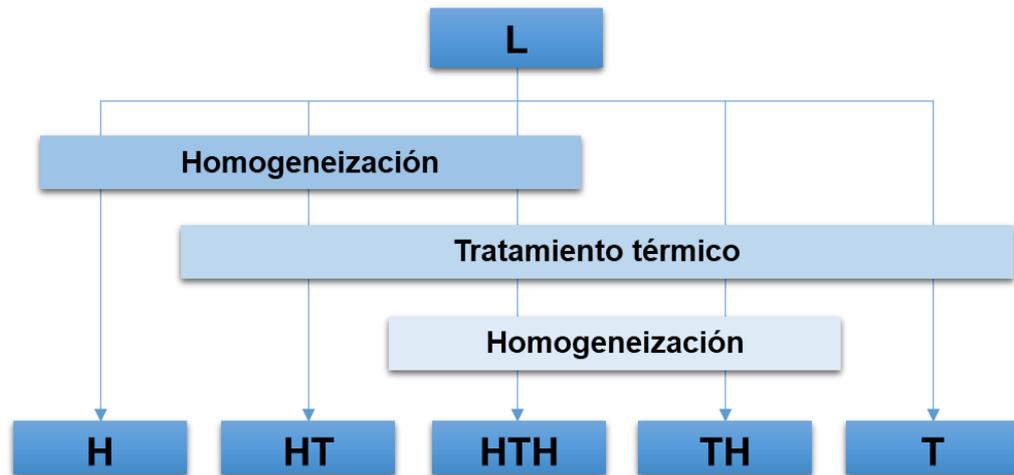
El tiempo de homogenización es el necesario para que el tratamiento sea equivalente a una homogenización en batch de 3 pasadas. Este tiempo es función del volumen de muestra y se calcula teniendo en cuenta la velocidad de flujo (250 mL/min) y el volumen muerto dentro del equipo (90 mL) y del serpentín (90 mL). Por ejemplo, para un volumen de muestra de 200 mL, el tiempo de homogenización necesario es de 8 minutos.

La limpieza del homogeneizador se realiza sin presión, con sucesivos lavados con agua corriente, solución alcalina (solución de NaOH al 3% m/v) y solución de detergente no iónico al 1% v/v. Finalmente se realizan sucesivos lavados con agua corriente y un último lavado con agua destilada. El equipo queda lleno de agua cuando no es utilizado.

### 2.2.3. Muestras homogeneizadas y/o tratadas térmicamente (H, T, HT, HTH, TH)

A partir de la muestra L, se prepararon 5 muestras, como se muestra en la **Figura 2.2**. La muestra H fue homogeneizada como se describió en la **Sección 2.2.2**, a una presión de 1250 bar (muestra H es equivalente a H<sub>1250</sub>). La muestra T se preparó colocando porciones de 100 mL de muestra L en vasos de precipitados tapados con papel aluminio, dentro de un baño de agua a 90 °C durante 25 minutos. Con las condiciones elegidas, se asegura que toda la muestra alcance una temperatura de 90 °C durante al menos 10 minutos. Las muestras HT, HTH y TH, se prepararon combinando homogeneización y tratamiento térmico, en las mismas condiciones que en las muestras H y T respectivamente. Los nombres de las muestras hacen referencia al orden de los tratamientos realizados. De esta forma, para obtener la muestra HT, se realizó primero un

tratamiento de homogeneización (H) y posteriormente un tratamiento térmico (T). En cambio, en la muestra TH se realizaron los mismos tratamientos, pero en orden inverso. La muestra HTH, tuvo dos tratamientos de homogeneización entre los cuales se realizó un tratamiento térmico.



**Figura 2.2.** Preparación de dispersiones homogeneizadas y/o tratadas térmicamente.

La muestra L y todas las dispersiones preparadas a partir de ella fueron almacenadas hasta el momento de su utilización en envases cerrados y previamente esterilizados, en heladera (4 °C) por un periodo no mayor a 3 días.

#### 2.2.4. Muestras autolizadas

Las muestras L y H se incubaron en un agitador shaker orbital marca Sontec durante 24 h a 50 °C con agitación de 200 rpm. Las muestras se tomaron cada 3 horas. Para evaluar el grado de autólisis se midió el pH con un pHmetro Consort c861 y se determinó el extracto seco (**Sección 2.4.1**).

### 2.3. Fraccionamiento de las dispersiones

El fraccionamiento se realizó por centrifugación a 19500 x g durante 20 minutos a 4 °C. Se utilizaron 2 centrífugas: Beckman Coulter Avanti J2-MC, rotor JA-14, Beckman

Coulter, Fullerton, Estados Unidos (para volúmenes de 20 a 150 mL) y Beckman GS-15R, rotor F2402, Beckman Estados Unidos (para volúmenes de 0,5 a 2 mL). La separación de la fracción insoluble y del sobrenadante se realizó inmediatamente después de la centrifugación. Las muestras fueron almacenadas hasta el momento de su utilización en envases cerrados y previamente esterilizados, en heladera (4 °C) por un período no mayor a 3 días.

## 2.4. Composición química

### 2.4.1. Extracto seco

Se determinó el extracto seco de las dispersiones y de los sobrenadantes por secado en estufa a  $103 \pm 2^\circ \text{C}$  hasta peso constante [93] (**Ecuación 2.1**).

$$\% \text{ Extracto seco} = \frac{m_s}{m_h} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 2.1})$$

donde  $m_s$  es la masa seca y  $m_h$  es la masa húmeda de la muestra. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

### 2.4.2. Ácidos nucleicos

El contenido de ácidos nucleicos en las dispersiones y en los sobrenadantes (**Ecuación 2.2**) se determinó por el método de Rut [94] modificado. Se colocó 1 mL de muestra (dispersión al 10% m/m o sobrenadante obtenido según lo descrito en la **Sección 2.3**) y 5 mL de  $\text{HClO}_4$  0,5 M en un tubo de ensayos de vidrio. Se calentó a  $90^\circ \text{C}$  durante 20 minutos y luego se trasvasó a tubos de centrifuga y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 270 y 290 nm haciendo las diluciones adecuadas con solución  $\text{HClO}_4$  0,5 M para tener valores de absorbancia entre 0,2 y 1.

$$\% \text{ Ácidos nucleicos} = \frac{(Abs_{270} - Abs_{290})}{1,63 \cdot 10^5} \cdot f_{dil} \cdot vol_f \cdot \frac{m_h}{m_s} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 2.2})$$

donde  $Abs_{270}$  y  $Abs_{290}$  son las absorbancias a 270 y 290 nm respectivamente;  $f_{dil}$  es el factor de dilución;  $vol_f$  es el volumen total del tubo (6 mL);  $m_h$  es la masa de la muestra húmeda y  $m_s$  es la masa seca de muestra. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

### 2.4.3. Proteínas

#### 2.4.3.1. Determinación de contenido de nitrógeno total (N<sub>T</sub>)

El nitrógeno total incluye nitrógeno proveniente de proteínas, péptidos, aminoácidos y ácidos nucleicos, siendo las proteínas y los ácidos nucleicos los componentes nitrogenados mayoritarios en este tipo de muestras.

Se determinó por triplicado el contenido de nitrógeno total en las dispersiones y en los sobrenadantes (**Ecuación 2.3**) por el método de micro-Kjeldahl modificado [95]. El método consiste en una digestión ácida de la muestra y una posterior determinación colorimétrica del amonio liberado.

**Digestión:** Se preparó la solución estándar mezclando 47,16 mg de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (p.a), 0,11 g de mezcla catalizadora (92,8%  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 2,8%  $\text{TiO}_2$  y 4,4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) con 3 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Se calentó hasta completar la digestión y una vez frío se llevó a volumen final de 100 mL con agua destilada. El contenido de nitrógeno en la solución fue de 100  $\mu\text{g/mL}$ . El blanco se realizó siguiendo el mismo procedimiento, pero sin el agregado de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Se preparó la curva patrón mezclando distintos volúmenes de solución estándar y de blanco, para obtener 0,5 mL de soluciones con concentraciones de nitrógeno entre 0 y 35  $\mu\text{g/mL}$ .

Para la digestión de las muestras se siguió el mismo procedimiento, pero reemplazando el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  por una cantidad de muestra (entre 200 y 1000 mg) que

asegure en 0,5 mL del digestato un contenido de nitrógeno que se encuentre dentro de los límites de la curva de calibración.

Colorimetría: Se colocó en baño termostatzado a 25 °C, solución buffer (volúmenes iguales de solución NaOH 2,5 M y de solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M, NaOH 0,2 M y tartrato de sodio y potasio tetrahidratado 0,36 M), reactivo de salicilato-nitroprusiato (20 g de salicilato de sodio, 30 mg de nitroprusiato de sodio en un volumen final de 100 mL con agua destilada) y solución de hipoclorito de sodio (contenido de cloro de 0,6% m/v). Posteriormente, en tubo de ensayos se mezclaron 0,5 mL de las soluciones patrones para la curva de calibración (mezclas de blanco y solución estándar), 1,5 mL de solución buffer y 0,4 mL de reactivo de salicilato-nitroprusiato. Se mezcló en vortex y se incubó 10 minutos a 25 °C.

Luego, se agregaron 0,2 mL de solución de hipoclorito de sodio, se mezcló e incubó 30 minutos. Finalmente, se agregaron 10 mL de agua destilada y se midió la absorbancia a 660 nm. Para la determinación de nitrógeno en las muestras, se siguió el mismo procedimiento reemplazando las soluciones patrones por 0,5 mL del digestato de la muestra.

Para la determinación del nitrógeno total se realizó la medición sobre la dispersión de levadura, mientras que el nitrógeno dispersable, se midió sobre el sobrenadante.

$$\% \text{ Nitrógeno total} = \frac{(Abs_{660} - b)}{a} \cdot f_{dil} \cdot \frac{m_h}{m_s} \cdot \frac{1g}{10^6 \mu g} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 2.3})$$

donde  $Abs_{660}$  es la absorbancia a 660 nm,  $a$  y  $b$  son la pendiente y la ordenada al origen de la curva de calibración respectivamente;  $f_{dil}$  es el factor de dilución;  $m_h$  es la masa húmeda y  $m_s$  es la masa seca de la muestra.

### 2.4.3.2. Cálculo del contenido de proteína

El contenido de proteínas se calculó a partir del contenido de nitrógeno total y el porcentaje de ácidos nucleicos de la muestra. Teniendo en cuenta que el nitrógeno total incluye principalmente al proveniente de las proteínas y de los ácidos nucleicos, y que cada 100 g de ácidos nucleicos contienen 17,5 g de nitrógeno (calculado a partir del contenido promedio de purinas y pirimidinas) y 100 g de proteínas contiene 16 g de nitrógeno, se calculó el porcentaje de proteínas a partir de la **Ecuación 2.4**.

$$\% \text{ Proteínas} = (N_T - AN \cdot \frac{17,5}{100}) \cdot \frac{100}{16} \quad (\text{Ec. 2.4})$$

donde  $N_T$  es el porcentaje de nitrógeno total y AN es el porcentaje de ácidos nucleicos de la muestra, ambos en base seca.

### 2.4.4. Hidratos de carbono totales

El contenido de hidratos de carbono totales en las dispersiones y sobrenadantes (**Ecuación 2.5**) se determinó por el método de fenol-sulfúrico [96]. Para cada muestra (dispersión o sobrenadante) se realizó una dilución adecuada en agua destilada de forma de obtener una concentración de hidratos de carbono totales menor a 80  $\mu\text{g/mL}$ .

A temperatura ambiente se colocó 1 mL de la dilución en un tubo de ensayos, se agregaron 0,5 mL de solución de fenol al 5% m/v y se homogenizó con vortex. Luego se agregaron 2,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y se homogenizó nuevamente con vortex. La mezcla se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y 15 minutos en baño a 37 °C. Se dejó enfriar y se midió la absorbancia a 490 nm.

Siguiendo el mismo procedimiento se realizó la curva patrón utilizando soluciones de glucosa en un rango de concentración de 0 a 80  $\mu\text{g/mL}$ . Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

$$\% \text{ Hidratos de carbono} = \frac{(Abs_{490} - b)}{a} \cdot f_{dil} \cdot \frac{m_h}{m_s} \cdot \frac{1g}{10^6 \mu g} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 2.5})$$

donde  $Abs_{490}$  es la absorbancia a 490 nm  $a$  y  $b$  son la pendiente de la curva y la ordenada al origen de la curva de calibración respectivamente;  $f_{dil}$  es el factor de dilución;  $m_h$  es la masa húmeda y  $m_s$  es la masa seca de la muestra.

#### 2.4.5. Lípidos

Se determinó el contenido de lípidos en las dispersiones y en los sobrenadantes por triplicado, según lo descrito por Freimund [40]. Se secaron las muestras en estufa a presión reducida y se suspendieron 10 g de muestra seca en una mezcla de n-hexano (160 mL) y metanol (40 mL). La suspensión se calentó a reflujo durante 2 horas. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró. El residuo se lavó con n-hexano, metanol, acetona y éter etílico (40 mL de cada uno). Se juntaron los filtrados obtenidos y se evaporaron los solventes en rotavapor. Se pesó el residuo seco obtenido y se calculó el porcentaje de lípidos en la muestra (**Ecuación 2.6**).

$$\% \text{ Lípidos} = \frac{m_r}{m_s} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 2.6})$$

donde  $m_r$  es la masa del residuo obtenido luego de evaporar los solventes y  $m_s$  es la masa seca de la muestra.

#### 2.4.6. Índices de dispersabilidad

Se calcularon los índices de dispersabilidad de ácidos nucleico, proteínas, hidratos de carbono y sólidos totales, como la masa seca de dichos componentes en el sobrenadante ( $m_s$ ), respecto de la masa seca del componente en la dispersión completa ( $m_d$ ) (**Ecuación 2.7**).

$$\text{Índice de dispersabilidad} = \frac{m_s}{m_d} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 2.7})$$

## 2.5. Recuento microbiológico

El recuento de levadura se realizó por triplicado, por siembra en placa sobre superficie. Se pesaron 10 g de muestra (dispersiones L y homogeneizadas, al 10% m/m), se agregaron 90 mL de agua de peptona 0,1% y se agitó en *stomacher* durante 1 minuto. Se realizaron 7 diluciones seriadas 1:10 (1 mL de dilución correspondiente en 9 mL de agua de peptona 0,1% y se agitó luego de cada dilución. Se sembraron 0,1 mL de las últimas tres diluciones ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ) con pipeta estéril en placa de agar extracto de malta (MEA) y se distribuyó el inóculo con espátula de Drigalski estéril. Se incubó a 25 °C y se contaron las colonias de las placas que tenían entre 10 y 150 colonias, luego de 5 días de incubación. El resultado se expresó como UFC/g muestra seca y se calculó el porcentaje de células viables de las dispersiones homogeneizadas respecto de la muestra L (Ecuación 2.8).

$$\% \text{ Células viables} = \frac{UFC/G_H}{UFC/G_L} \cdot 100 \quad (\text{EC. 2.8})$$

## 2.6. Espectroscopía UV - Visible

### 2.6.1. Fundamentos teóricos

La absorbancia a 280 nm de una dispersión de levadura se debe a la presencia de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina y triptófano, así como a la presencia de puentes disulfuro entre los residuos de cisteína. Además, los ácidos nucleicos presentan un máximo de absorbancia a 260 nm y otras especies pueden absorber en esta región del espectro y causar interferencia [94,97]. Por tal motivo, a partir de la medida de absorbancia a 280 nm no es posible cuantificar la concentración de proteína pero el aumento de este valor se relaciona con una mayor liberación de contenido intracelular.

Por otro lado, la absorbancia a 550 nm es una medida de la turbidez de las muestras, la cual es directamente proporcional a la concentración volumétrica de las partículas en dispersión e inversamente proporcional a su diámetro y a la densidad de la fase continua [98].

### 2.6.2. Condiciones experimentales

Se realizaron espectros de absorbancia en la región UV - visible (220 – 650 nm) a las dispersiones y a sus sobrenadantes, con un equipo PG Instrument, T60 UV-visible Spectrophotometer. Se realizaron diluciones con agua destilada para obtener valores de absorbancia menores a 1,0. De los espectros se obtuvieron los valores de absorbancia a 280 y a 550 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

### 2.7. Capacidad de retención de agua (CRA)

Se calculó a partir de los datos obtenidos en la determinación de extracto seco del sedimento (**Sección 2.4.1**) (**Ecuación 2.9**).

$$CRA = \frac{m_h - m_s}{m_s} . 100 \quad (\text{Ec. 2.9})$$

donde  $m_h$  es la masa húmeda y  $m_s$  es la masa seca de la muestra.

### 2.8. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

#### 2.8.1. Fundamentos teóricos

La espectroscopía FTIR se fundamenta en que la luz en la región infrarroja (12500 a  $10 \text{ cm}^{-1}$ ) provee la energía suficiente para que los enlaces de la molécula vibren, provocando la tensión o flexión de estos. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos, mientras que las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces.

Como la energía necesaria para provocar una transición vibracional depende de los tipos de átomos y de enlaces que los mantienen unidos, cada molécula produce un espectro característico (huella dactilar) [99].

Entre otras aplicaciones, la espectroscopía FTIR ha demostrado ser una herramienta útil para el estudio de distintos microorganismos. En particular, se ha utilizado espectroscopía FTIR en análisis genéticos de cepas de levadura modificadas y en la identificación de diferentes cepas por comparación con una librería de datos. Además, es posible monitorear tanto el metabolismo como los procesos de fermentación de células de levadura e identificar zonas características de proteínas, de hidratos de carbono y de fosfolípidos [100,101].

### **2.8.2. Condiciones experimentales**

Se realizaron espectros de absorbancia en el rango de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ , a las dispersiones y a sus fracciones, con un equipo FTIR Shimadzu modelo IR Affinity (Shimadzu Co., Japan). Los espectros se midieron con un promedio de 45 barridos, una resolución de 4,0  $\text{cm}^{-1}$  y apodización Happ-Genzel. Se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de dispersión en el ATR ZnSe, cubriendo todo el cristal y secando con una pistola de calor desde una distancia de aproximadamente 20 cm hasta completa deshidratación. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

## **2.9. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

### **2.9.1. Fundamentos teóricos**

La calorimetría diferencial de barrido permite determinar la temperatura y el flujo de calor asociado a las distintas transiciones de un material, en función de la temperatura. Esto provee información cualitativa y cuantitativa sobre procesos endotérmicos y exotérmicos que ocurren durante cambios de fases, desnaturalización, gelatinización, oxidación y transición vítrea, entre otros [102].

## 2.9.2. Condiciones experimentales

El análisis térmico de las muestras se realizó en un equipo MDSC Q-200 (TA Instruments, Delaware, USA) con la unidad de refrigeración RCS 90. Se colocaron aproximadamente 10 mg de muestra en cápsulas TZero® de aluminio herméticamente selladas y fueron calentadas de -60 a 150 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y se realizó un blanco con una cápsula vacía. A partir de los termogramas obtenidos se calcularon la temperatura de los picos endotérmicos y la entalpía ( $\Delta H$ ) expresada en J/g muestra en base seca y se calculó el porcentaje de desnaturalización **(Ecuación 2.10)**.

$$\% \text{ Desnaturalización} = \frac{\text{Entalpía}_L - \text{Entalpía}_H}{\text{Entalpía}_L} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 2.10})$$

donde Entalpía<sub>L</sub> y Entalpía<sub>H</sub> son las entalpías de las muestras L y homogeneizadas (H), respectivamente. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

## 2.10. Reología

### 2.10.1. Fundamentos teóricos

La reología estudia la relación entre el esfuerzo y la deformación en los materiales que son capaces de fluir. Una forma de caracterizar el comportamiento reológico de un fluido es a través de su viscosidad, que se define como la resistencia de un fluido a la deformación. Dependiendo de la estructura interna del material, al aplicarle un esfuerzo externo puede responder de diferentes maneras. En base a su comportamiento reológico, los fluidos pueden clasificarse en Newtonianos y no Newtonianos. Un fluido Newtoniano se caracteriza por cumplir la Ley de viscosidad de Newton, es decir, que existe una relación lineal entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación **(Ecuación 2.11)**.

$$\tau = -\mu \frac{dv}{dy} \quad (\text{Ec. 2.11})$$

donde  $\tau$  es el esfuerzo cortante,  $\mu$  es la viscosidad,  $v$  es la velocidad de deformación e  $y$  es la distancia.

En estos fluidos la viscosidad es constante y no depende del esfuerzo cortante aplicado ni del tiempo. Sin embargo, la mayoría de los fluidos presentan desviaciones a este comportamiento y se pueden clasificar en función de la dependencia de la viscosidad con la velocidad de deformación y/o con el tiempo de cizalla.

Los tres tipos de fluidos no ideales más comunes, dependientes de la velocidad de cizalla, son los pseudoplásticos, los dilatantes y los plásticos.

El comportamiento de flujo pseudoplástico (*“shear-thinning”*) es el más frecuente y se caracteriza porque la viscosidad aparente disminuye al aumentar la velocidad de cizalla. Los fluidos dilatantes, en cambio, exhiben un aumento de la viscosidad aparente al elevarse la velocidad de cizalla (*“shear-thickening”*). Por otro lado, los fluidos plásticos, son materiales que se comportan como un sólido elástico hasta que el esfuerzo alcanza un valor umbral, y al sobrepasarlo, se comportan como fluidos donde el esfuerzo puede tener una dependencia lineal con la velocidad de deformación o no.

Otra categoría de fluidos no Newtonianos es aquella cuya viscosidad aparente depende del tiempo en el que el esfuerzo fue aplicado. Estos fluidos se subdividen en tixotrópicos, cuando a velocidad de cizalla constante, la viscosidad aparente desciende con el tiempo, y reopéticos, cuando se produce un aumento de viscosidad con el tiempo.

Los modelos matemáticos que describen el comportamiento reológico de muchos de los fluidos no Newtonianos, son la ley de la potencia y el modelo de Herschel – Bulkley.

La **Ecuación 2.12** representa la Ley de la Potencia, donde  $k$  es el coeficiente de consistencia con unidades  $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$  y  $n$  es el índice de comportamiento de flujo, que es adimensional. En los fluidos Newtonianos,  $n=1$ , por lo que la Ley de viscosidad de Newton

es un caso particular de la Ley de la potencia. En los fluidos pseudoplásticos,  $n < 1$ , mientras que en los fluidos dilatantes  $n > 1$ .

$$\tau = k \left( \frac{dv}{dy} \right)^n \quad (\text{Ec. 2.12})$$

En el modelo de Herschel – Bulkley (**Ecuación 2.13**), se incorpora el término  $\tau_0$ , que es el esfuerzo mínimo de cedencia, cuando el material tiene un comportamiento plástico.

$$\tau = k \left( \frac{dv}{dy} \right)^n + \tau_0 \quad (\text{Ec 2.13})$$

Estos modelos han resultado satisfactorios para describir el comportamiento de muchos sistemas alimentarios, como emulsiones y suspensiones [103].

### 2.10.2. Condiciones experimentales

Las determinaciones se realizaron por triplicado en un reómetro AE-G2 (TA Instruments, Delaware, Estados Unidos). La velocidad de deformación fue entre  $0,1 \text{ s}^{-1}$  y  $1000 \text{ s}^{-1}$ , a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Los datos obtenidos se ajustaron al modelo de Herschel – Bulkley. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

### 2.11. Preparación de emulsiones

Se prepararon emulsiones o/w a partir de la muestra control (L), de las dispersiones de levadura homogeneizadas a diferentes presiones ( $H_{750}$ ,  $H_{1000}$ ,  $H_{1250}$  y  $H_{1500}$ ) y con tratamientos de homogeneización y/o térmico (T, TH, HT y HTH), y aceite refinado de girasol. La homogeneización se realizó con un equipo Ultraturrax T25 a  $20.000 \text{ rpm}$  durante

2 minutos. La concentración de levadura en la fase continua varió entre 0,75 a 10% m/m b.s. y la fracción másica de aceite ( $\phi_m$ ) varió entre 0,25 y 0,60.

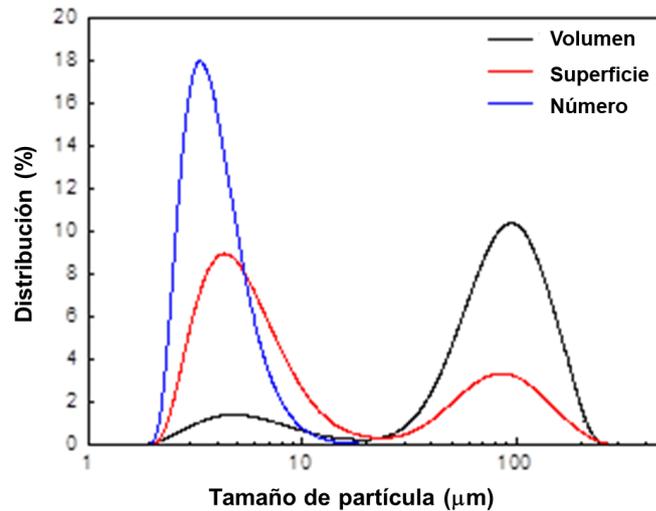
Para estudios de estabilidad, las emulsiones se almacenaron en heladera, en frascos o en tubos de centrifuga de 10 mL con tapa.

## 2.12. Determinación de tamaño de partícula de dispersiones de levadura y emulsiones

### 2.12.1. Fundamentos teóricos

Las gotas de aceite de las emulsiones o/w tienen forma aproximadamente esférica, cuyo diámetro está en el rango de 0,1 y 100  $\mu\text{m}$  [79]. Por otro lado, las células de levadura como los fragmentos obtenidos luego de la ruptura celular tienen forma irregular [66]. Es por tal motivo que surge la necesidad de definir el concepto de “*diámetro de esfera equivalente*”, que es el diámetro de una esfera que tiene el mismo volumen que la partícula que se está midiendo [104].

Cuando en una mezcla todas las partículas tienen el mismo tamaño (monodispersa), es posible caracterizarla solamente con el diámetro (D) o el radio (r) de las mismas. Sin embargo, las emulsiones y las dispersiones de levadura son polidispersas (rango de tamaños) y por lo tanto es necesario referirse a una distribución de tamaño de partículas. Como la cantidad de gotas en una emulsión o las partículas en una dispersión de levadura es extremadamente grande, la función de distribución puede considerarse continua. Habitualmente se utilizan las distribuciones expresadas en porcentaje en número, porcentaje en superficie y porcentaje en volumen (**Figura 2.3**).



**Figura 2.3.** Distribuciones de tamaño de partícula en volumen, en superficie y en número de una dispersión polidispersa.

La función de distribución en número está construida de forma tal que el área bajo la curva entre dos diámetros es igual al número de partículas o gotas en ese rango. De forma análoga, en las distribuciones en superficie y en volumen, el área bajo la curva entre dos diámetros es igual al área interfacial expuesta y al volumen de las partículas en dicho rango, respectivamente [79].

En las distribuciones polidispersas, la forma de las curvas cambia significativamente dependiendo de la manera como se expresa. Como el volumen de las partículas es proporcional a su diámetro al cubo ( $D^3$ ), la distribución en volumen es más sensible a las partículas de mayor tamaño, mientras que la distribución en número es más sensible a las partículas pequeñas. Debido a la complejidad de las funciones de distribución, es difícil definir un modelo matemático, pero se pueden calcular a partir de ella distintos valores promedio [79,104].

$$D_{1,0} = \frac{\sum n_i D_i}{N} \quad (\text{Ec. 2.14})$$

$$D_{2,0} = \frac{\sum n_i D_i^2}{N} \quad (\text{Ec. 2.15})$$

$$D_{3,0} = \frac{\sum n_i D_i^3}{N} \quad (\text{Ec. 2.16})$$

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i D_i^3}{\sum n_i D_i^2} \quad (\text{Ec. 2.17})$$

$$D_{4,3} = \frac{\sum n_i D_i^4}{\sum n_i D_i^3} \quad (\text{Ec.2.18})$$

donde  $n_i$  es el número de gotas con un diámetro  $D_i$ , y  $N$  es la cantidad total de gotas.

Los valores promedio  $D_{1,0}$  (en número),  $D_{2,0}$  (en superficie) y  $D_{3,0}$  (en volumen) (**Ecuaciones 2.14, 2.15 y 2.16**) requieren el conocimiento del número total de gotas. En cambio, con los valores de  $D_{3,2}$  (Sauter) y  $D_{4,3}$  (De Brouckere) (**Ecuaciones 2.17 y 2.18**) se introduce otro término lineal de diámetro y se independiza de la cantidad de gotas [79]. Estos dos diámetros se conocen con el nombre de “*moment diameter*” y se puede demostrar que son los promedios ponderados de las distribuciones en superficie y volumen respectivamente [104]. Otras medidas que caracterizan a una distribución son su moda, que es el diámetro de partícula que más se repite, y el *span*, que es una medida del ancho de la distribución y se define como (**Ecuación 2.19**).

$$\text{span} = \frac{p_{0,9} - p_{0,1}}{p_{0,5}} \quad (\text{Ec. 2.19})$$

donde  $p_{0,1}$ ,  $p_{0,5}$  y  $p_{0,9}$ , son los percentiles 0,1; 0,5 y 0,9 respectivamente e indican los diámetros por debajo de los cuales se encuentra el 10, el 50 y el 90% de las partículas (si es una distribución en número) o del volumen (si es una distribución en volumen), respectivamente.

### 2.12.2. Condiciones experimentales

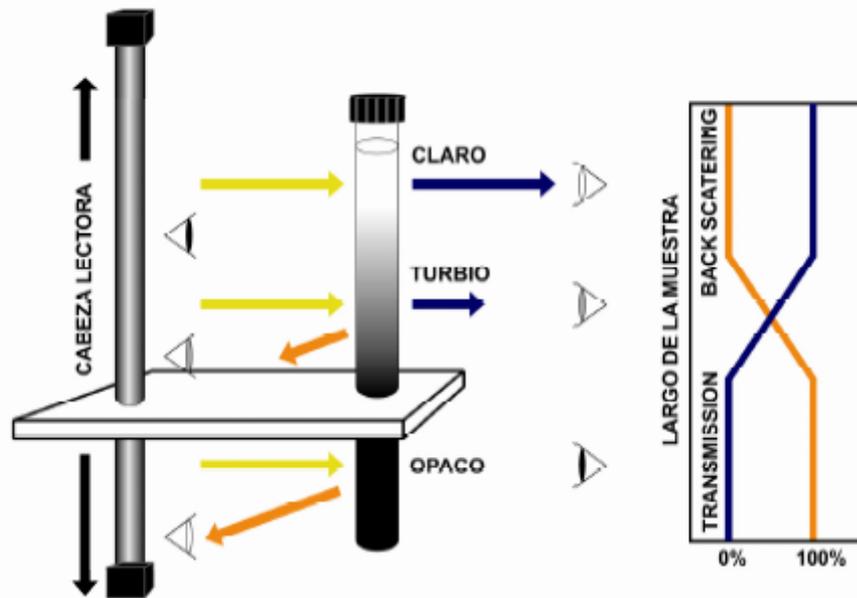
Se determinó la distribución de tamaño de partícula de las muestras (dispersiones de levadura y emulsiones) por difracción láser ( $\lambda=683$  nm y  $\lambda=455$  nm) en un rango de 0,1 a 10000  $\mu\text{m}$ , con un equipo Malvern Mastersizer 2000E (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). La velocidad de agitación en la unidad de dispersión (Hydro 2000MU, Worcestershire, Reino Unido) se seleccionó a 2000 rpm. Los parámetros ópticos seleccionados para transformar los patrones de difracción láser en las distribuciones de tamaño de partícula fueron: índices de refracción: 1,52 y 1,40 para las partículas dispersas, 1,47 para las gotas de aceite y 1,33 para el agua; coeficiente de absorción: 0,1.

En las dispersiones de levadura se determinó el tamaño de partícula a tiempo inicial y en las emulsiones se realizó la determinación en las muestras a tiempo inicial y con una semana de almacenamiento (en heladera). Las muestras, previo a la determinación de tamaño de partícula, se homogeneizaron por inversión del tubo. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### 2.13. Estabilidad de dispersiones de levadura y emulsiones determinado con un analizador óptico vertical (Quick Scan)

#### 2.13.1. Fundamentos teóricos

El analizador óptico vertical ha sido ampliamente utilizado para estudiar procesos de desestabilización global en emulsiones, dispersiones coloidales concentradas y espumas [105–109]. El equipo cuenta con una celda de vidrio (donde se introduce la muestra), la cual es colocada cerca de una cabeza lectora móvil compuesta por una fuente de luz IR-cercano ( $\lambda = 850$  nm) y dos detectores sincrónicos a  $0^\circ$  (Transmitancia) y a  $135^\circ$  (Backscattering), respecto de la fuente [110]. La cabeza lectora móvil realiza un barrido a lo largo de toda la altura del tubo de muestra (65 mm, aproximadamente), adquiriendo los datos de Transmitancia y Backscattering cada 40  $\mu\text{m}$  (**Figura 2.4**).



**Figura 2.4.** Esquema del analizador de barrido vertical (Quick Scan) (Cortesía Beckman Coulter).

Los resultados son presentados mediante un software como curvas de %Transmitancia (%T) y %Backscattering (%BS) en función de la altura del tubo. La adquisición de datos puede repetirse a lo largo del tiempo, a intervalos de 1 minuto como mínimo, lo cual permite obtener una cinética de %BS o %T en función del tiempo.

Los valores de %BS son directamente proporcionales a la concentración de fase dispersa e inversamente proporcionales al diámetro de las partículas. El análisis de esta señal, seleccionando zonas adecuadas del tubo permite estudiar procesos de desestabilización en sistemas opacos, como cremado y coalescencia en emulsiones [110] o sedimentación en dispersiones de levadura [105].

### 2.13.2. Condiciones experimentales

Se colocaron 6 mL de dispersión (previamente homogeneizadas por agitación) o de emulsión en el tubo del equipo. Se realizaron medidas de %T y %BS en función de la altura de la muestra, registrando los correspondientes perfiles a intervalos de 1 minuto durante

60 minutos y medidas puntuales a las 24 horas y 18 días (en las emulsiones). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### 2.14. Microscopia óptica

Las microscopías de las dispersiones se realizaron en un microscopio óptico Leica DMLB (Leica Microsystems, GmbH, Alemania), acoplado a una cámara digital adaptada (Leica DC100, Leica Microsystems, GmbH), con un aumento final de 1000x.

Las microscopías de las emulsiones se realizaron en un microscopio invertido Cytation 5 (BioTek Instruments, EE. UU.), con un aumento de 100x y 200x.

#### 2.15. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Se realizaron microscopías electrónicas de transmisión a las muestras de levadura tratadas térmicamente y/o homogeneizadas. Las muestras se colocaron en una cuadrícula de cobre (Formvar/carb, 300 mesh), sin dilución previa y se cubrieron con una solución saturada de acetato de uranilo durante 1 minuto. El microscopio electrónico empleado fue un Phillips EM-301 (Países Bajos) y se trabajó a 60 kV.

#### 2.16. Tensiometría

##### 2.16.1. Fundamentos teóricos

La tensión interfacial es la energía de Gibbs por unidad de área que se genera debido a que las moléculas cerca de una interfase tienen interacciones moleculares diferentes que las moléculas equivalentes dentro del fluido. Como se explicó en la **Sección 1.7**, los emulsionantes tienen la capacidad de reducir la tensión interfacial, aumentando la estabilidad termodinámica del sistema [111].

Por otro lado, la presión interfacial, se define según la **Ecuación 2.20**.

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (\text{Ec. 2.20})$$

donde  $\gamma_0$  es la tensión interfacial del agua pura y  $\gamma$  es la tensión interfacial de la dispersión acuosa con el emulsionante [111].

Uno de los equipos para medir tensión superficial es el Tensiómetro de anillo, en el que se coloca un anillo de platino sobre la superficie del líquido y se mide la fuerza requerida para separar el anillo de la superficie. En este método debe asegurarse el mojado completo del anillo para obtener resultados reproducibles y de significado. Es un método sencillo, rápido, de alta precisión y no muy dependiente del ángulo de contacto [112].

### 2.16.2. Condiciones experimentales

Se determinó la tensión interfacial de las dispersiones con un tensiómetro de anillo Du Noüy, Lauda TD3 (Lauda DR. R. Wobser GmbH & Co., Königshofen, Alemania). Las dispersiones se prepararon al 0,25% m/m de proteína en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0. Las medidas de tensión interfacial de equilibrio ( $\gamma_{eq}$ ) se realizaron automáticamente fijando la amplitud constante de movimiento del anillo en 20 mL de dispersión acuosa y luego agregando 20 mL de aceite refinado de girasol. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

### 2.17. Análisis de datos

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) y post test de Tukey, con el programa Graph Pad Prism v6.0. Se consideraron diferencias significativas a  $p < 0,05$ .

Los gráficos y ajustes a modelos matemáticos se realizaron con el software Microcal Origin ® 7.5 (Microcal Software Inc., Estados Unidos).

# **CAPÍTULO 3**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **RUPTURA CELULAR POR HOMOGENEIZACIÓN A ALTA PRESIÓN**

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### RUPTURA CELULAR POR HOMOGENEIZACIÓN A ALTA PRESIÓN

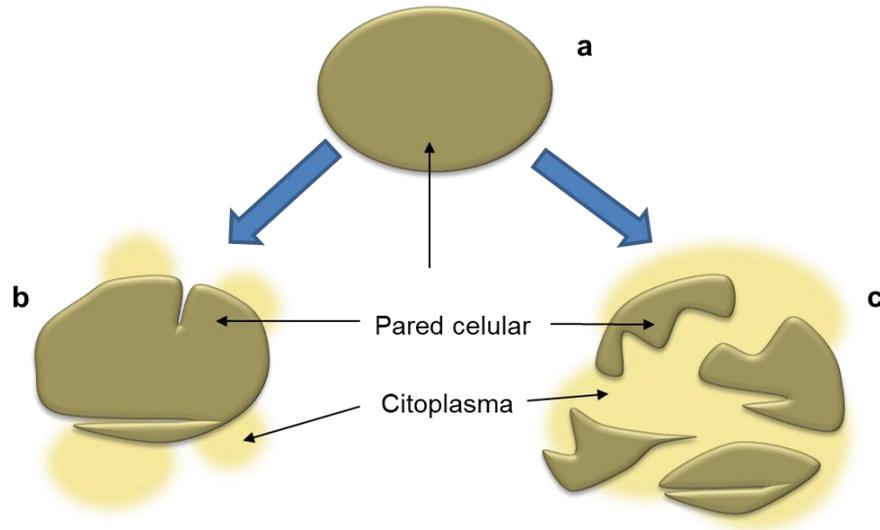
*Saccharomyces cerevisiae* es la especie de levadura más utilizada en la industria de alimentos, tanto por su poder fermentativo como por su alto valor nutricional. Posee además proteínas y polisacáridos con potenciales propiedades interfaciales, pero es necesario romper la pared celular para poder aprovechar estos componentes. En las últimas décadas se estudiaron diversos métodos para romper la pared celular, como la homogeneización a alta presión, sonicación, ruptura en un molino a bolas, tratamientos térmicos, métodos químicos y enzimáticos, entre otros [60–62,66]. En este capítulo se estudió el efecto de la homogeneización a distintas presiones sobre las propiedades de las dispersiones de levadura.

#### 3.1. Homogeneización a diferentes presiones de la dispersión de levadura

El homogeneizador a válvula utilizado en este trabajo alcanza una presión máxima de 1500 bar. Una limitante de este equipo es que en su interior se produce un aumento de temperatura de aproximadamente 2 °C cada 100 bar, debido a la compresión adiabática. Por lo tanto, si la muestra no está adecuadamente refrigerada, a presiones de 1500 bar la temperatura podría aumentar 30 °C, provocando la desnaturalización parcial de las proteínas [60,67]. Por otro lado, en ensayos preliminares de este trabajo se encontró que a presiones menores a 700 bar, más del 50% de las células permanecen viables [66]. A partir de estos resultados, se eligieron cuatro condiciones de homogeneización: 750, 1000, 1250 y 1500 bar, que dieron origen a las muestras H<sub>750</sub>, H<sub>1000</sub>, H<sub>1250</sub> y H<sub>1500</sub>, respectivamente.

Durante el proceso de homogeneización, las células de levadura pueden seguir dos caminos: 1) dañarse a nivel de pared y liberar el contenido intracelular, pero manteniendo su forma original o 2) romperse en varios fragmentos y liberar su contenido al medio, como

se esquematiza en la **Figura 3.1** [66]. Por lo tanto, se considera que hubo ruptura celular cuando se libera contenido intracelular (haya o no disminución del tamaño de las partículas), mientras que el término micronización se refiere a la formación de fragmentos de pared del orden del micrón.



**Figura 3.1.** Esquema simplificado del proceso de ruptura celular. a) célula entera, b) célula dañada que conserva la forma original, c) célula con la pared micronizada. Adaptado de Spiden y col. [66].

### 3.2. Recuento microbiológico y análisis microscópico

Para evaluar la ruptura celular y la viabilidad de la levadura luego de la homogeneización se llevó a cabo un estudio por microscopía y un recuento microbiológico, respectivamente. La muestra L tuvo un recuento de  $2 \cdot 10^{10}$  UFC/g expresado en base seca. Como se observa en la **Tabla 3.1**, la muestra H<sub>750</sub> mostró una reducción de células viables de más del 80% respecto de la muestra L. Por otro lado, en las muestras homogeneizadas a presiones iguales o superiores a 1000 bar, la reducción fue de más del 95% y aunque el porcentaje de reducción aumentó con la presión de homogeneización, no se encontraron diferencias significativas entre las muestras H<sub>1250</sub> y H<sub>1500</sub>. Los porcentajes de reducción de células viables obtenidos son acordes a los publicados por Spiden y col. [66], quienes encontraron que a una presión de homogeneización de 600 bar el porcentaje de muerte

celular es de casi el 80% y a presiones superiores a 1000 bar se alcanzan valores de muerte celular superiores al 90-95%.

**Tabla 3.1.** Porcentaje de disminución del recuento microbiológico de células viables de levadura en las muestras homogeneizadas, respecto de la muestra L.

Muestra	% Disminución
H <sub>750</sub>	81,0 ± 0,5 <sup>a</sup>
H <sub>1000</sub>	97,0 ± 0,2 <sup>b</sup>
H <sub>1250</sub>	98,6 ± 0,3 <sup>c</sup>
H <sub>1500</sub>	99,5 ± 0,3 <sup>c</sup>

Valores con diferentes letras son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

En la **Figura 3.2** se muestran las micrografías ópticas de las dispersiones. En la muestra L, se observan células de forma oval con un tamaño aproximado de 5  $\mu\text{m}$ . En la muestra H<sub>750</sub>, la cantidad de células que mantienen su forma original es mayor a la esperada según el recuento de células viables. Esto se atribuye a que durante la homogeneización a 750 bar se produce lisis celular y posible liberación del contenido intracelular, pero la pared celular conserva su forma. En las muestras homogeneizadas a presiones entre 1000 y 1500 bar se observa una gran cantidad de fragmentos de pared celular y muy pocas cápsulas enteras, lo cual concuerda con el recuento microbiológico (**Tabla 3.1**). Con estos resultados se confirma que a presiones de 750 bar se logra un gran porcentaje de muerte celular, pero son necesarias presiones de 1000 bar o superiores para lograr la micronización de la pared celular.

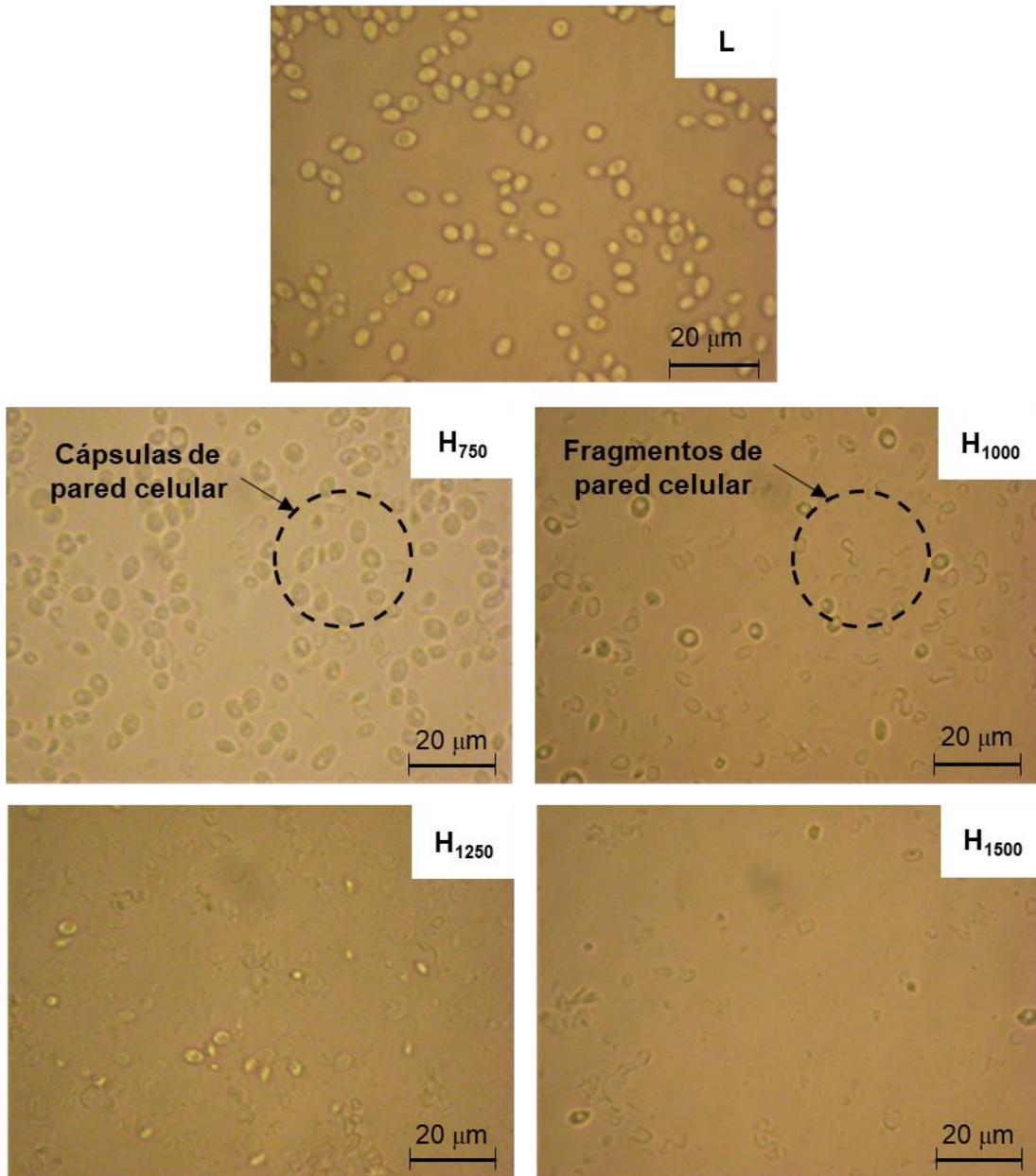
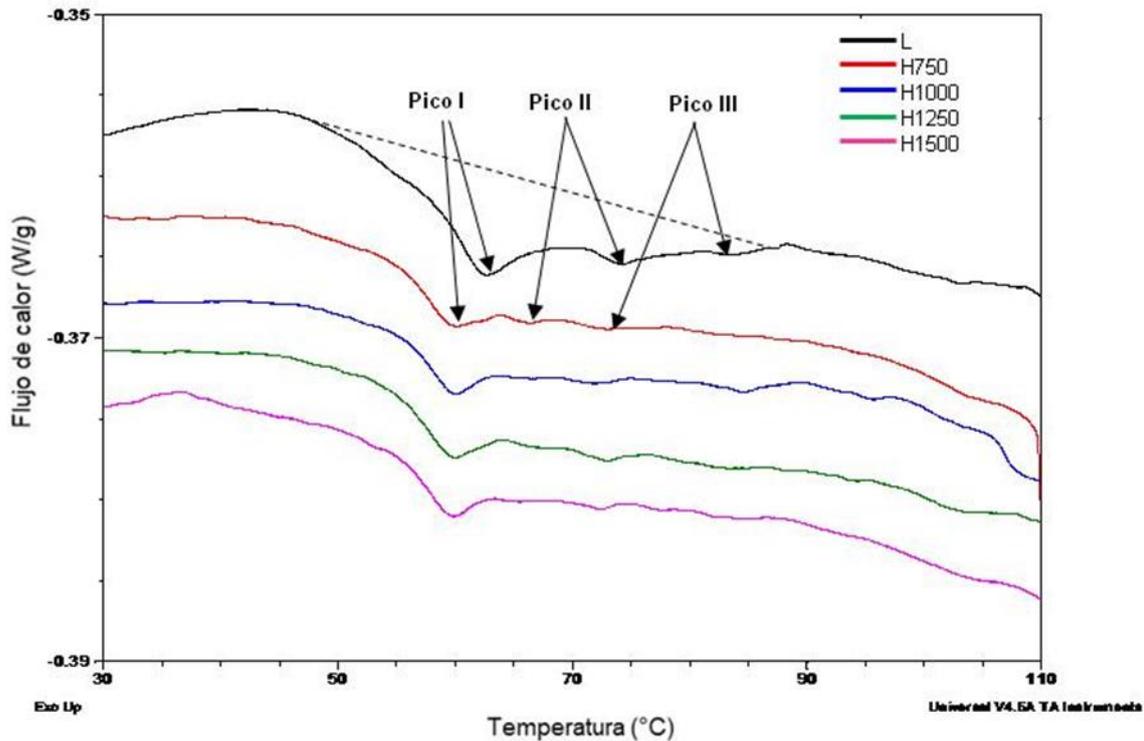


Figura 3.2. Micrografías ópticas de las muestras H<sub>750</sub>, H<sub>1000</sub>, H<sub>1250</sub> y H<sub>1500</sub> (x1000).

### 3.3. Comportamiento térmico y grado de desnaturalización de las proteínas

Como se mencionó anteriormente, el proceso de homogeneización puede traer aparejado un cierto grado de desnaturalización proteica que puede afectar el desempeño funcional de las muestras obtenidas. Por este motivo se realizó un estudio por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de las dispersiones de levadura entera y homogeneizadas a distintas presiones. En la **Figura 3.3** se muestran los termogramas de la muestra L y de

las muestras homogeneizadas y en la **Tabla 3.2** se resumen los valores de temperatura de los picos endotérmicos, de la entalpía de desnaturalización y del grado de desnaturalización.



**Figura 3.3.** Termogramas DSC de las muestras L, H<sub>750</sub>, H<sub>1000</sub>, H<sub>1250</sub> y H<sub>1500</sub>.

El termograma de la muestra L exhibe 3 picos endotérmicos a 62,6 °C, 74,0 °C y 83,5 °C, aunque el proceso de desnaturalización comienza a los 50 °C. Estos picos confirmarían la presencia de 3 fracciones de proteínas con diferente estabilidad térmica. En un trabajo publicado [113] se atribuyó el pico menos estable térmicamente (pico I) a mananoproteínas y proteínas de membrana mientras que las proteínas globulares citoplasmáticas y las nucleoproteínas serían más estables térmicamente (picos II y III).

**Tabla 3.2.** Valores de pico de temperatura, entalpía de desnaturalización y porcentaje de desnaturalización de muestras L y homogeneizadas. La desviación estándar de las temperaturas de los picos varía 0 y 0,1.

Muestra	Temperatura de los picos endotérmicos (°C)			Entalpía de desnaturalización (J/g base seca)	% Desnaturalización
	Pico I	Pico II	Pico III		
L	62,6	74,0	83,5	12,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	0
H <sub>750</sub>	59,8	66,0	72,0	7,9 ± 0,5 <sup>b</sup>	34,2
H <sub>1000</sub>	60,0	66,5	71,9	7,0 ± 0,3 <sup>c</sup>	41,7
H <sub>1250</sub>	59,9	65,4	72,4	6,4 ± 0,2 <sup>c,d</sup>	46,7
H <sub>1500</sub>	60,0	66,6	72,9	6,2 ± 0,3 <sup>d</sup>	48,3

Valores con diferentes letras en cada parámetro son significativamente diferentes (p<0,05)

En las muestras homogeneizadas, se observa un corrimiento de los picos hacia temperaturas menores (aproximadamente 60 °C, 66 °C y 72 °C) respecto de la muestra L. Este resultado parece estar relacionado con el hecho de que las proteínas en su medio natural (citoplasma) están protegidas y se requieren temperaturas más elevadas para desnaturalizarlas. Con la ruptura celular, el citoplasma se diluye, y las proteínas requieren una menor temperatura para sufrir cambios conformacionales [56,113],

Por otro lado, la tendencia en la disminución de la entalpía de desnaturalización demuestra que al aumentar la presión de homogeneización, las proteínas se desnaturalizan parcialmente, debido a la cavitación y esfuerzos de corte que son sometidas durante este proceso [60,67]. Además, se puede observar en los termogramas de las muestras homogeneizadas que el pico II tiende a desaparecer cuando aumenta la presión de homogeneización, reflejando una mayor desnaturalización de las proteínas globulares respecto a las proteínas de membrana y pared.

### 3.4. Actividad enzimática

Las enzimas son un grupo importante de proteínas globulares citoplasmáticas. Si bien en los termogramas de las muestras homogeneizadas (**Figura 3.3**) se observa la desnaturalización parcial de este tipo de proteínas, algunas enzimas podrían continuar activas, incluso luego de la muerte celular. Para confirmar la presencia de enzimas, se

almacenaron las dispersiones L y H<sub>1250</sub> a 50 °C, debido a que en estas condiciones se favorece el proceso de autólisis. Este proceso se basa en la activación de enzimas endógenas que degradan la pared celular, incrementando la porosidad y posteriormente provocando la lisis celular [62].

En la **Figura 3.4a** se puede observar que las muestras L y H<sub>1250</sub> presentan una disminución del peso seco de sólidos insolubles en función del tiempo. La muestra L presentó el 54% de los sólidos insolubles iniciales al cabo de 24 horas de autólisis. En un trabajo publicado por Martínez-Rodríguez y col. (2001), también se observó disminución de sólidos durante la autólisis de *S. cerevisiae* realizada a 30 °C [114]. Aunque en el trabajo citado, la cantidad de sólidos a las 24 horas fue del 75% respecto de la cantidad inicial, los resultados son consistentes con el aumento de la actividad enzimática al aumentar la temperatura. En la muestra H<sub>1250</sub>, la disminución de la masa de sólidos insolubles alcanzó un 60% de disminución a las 24 h, corroborando la presencia de enzimas activas en esta muestra.

En la **Figura 3.4b** se observa la modificación del pH en ambas muestras durante las 24 horas de ensayo. Si bien no es objetivo de este trabajo estudiar las reacciones que ocurren durante la autólisis, los cambios en el pH que se observan en ambas muestras, estarían asociados a la acción de proteasas y otras enzimas que modifican la composición de las dispersiones. En la muestra homogeneizada, la variación de pH a las 24 h fue mayor que en la muestra L, resultado que se atribuye a una mayor actividad enzimática cuando las enzimas son liberadas al medio.

Cabe señalar que, aunque en este ensayo se eligió una temperatura elevada (50 °C) para favorecer la acción enzimática y observar cambios en tiempos más corto, las enzimas pueden actuar incluso en temperaturas de refrigeración, siendo su acción un factor determinante en la estabilidad química de las dispersiones.

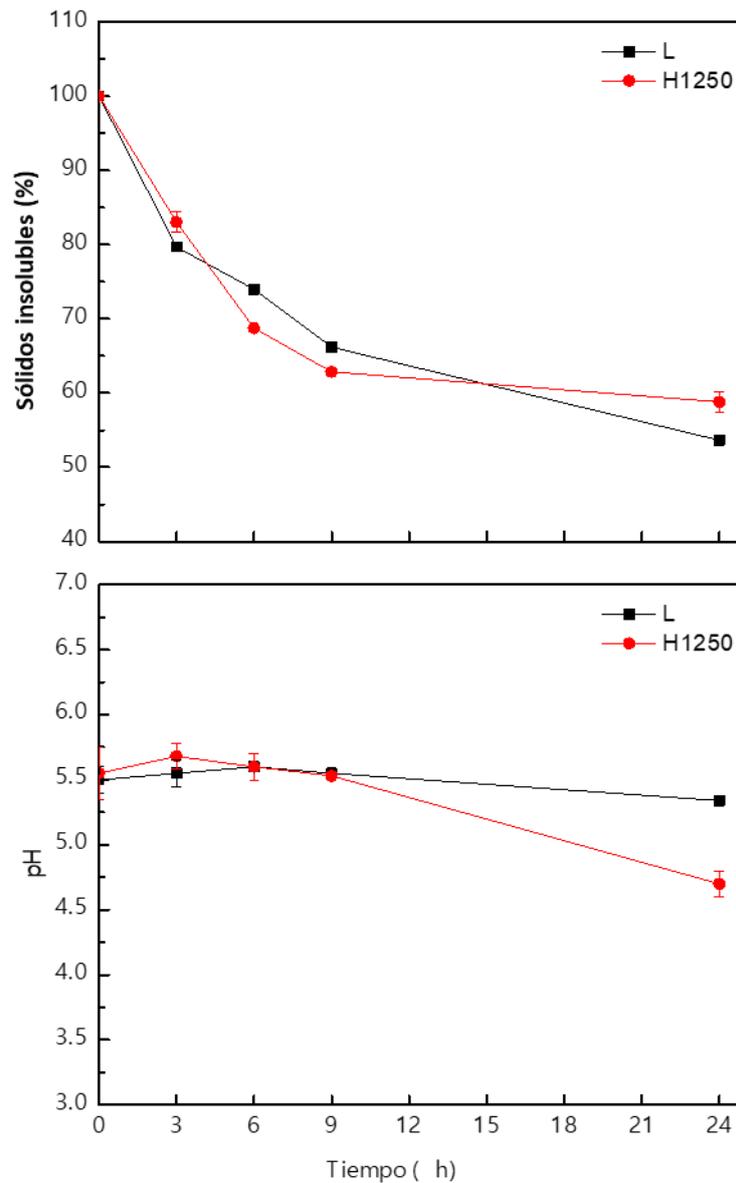
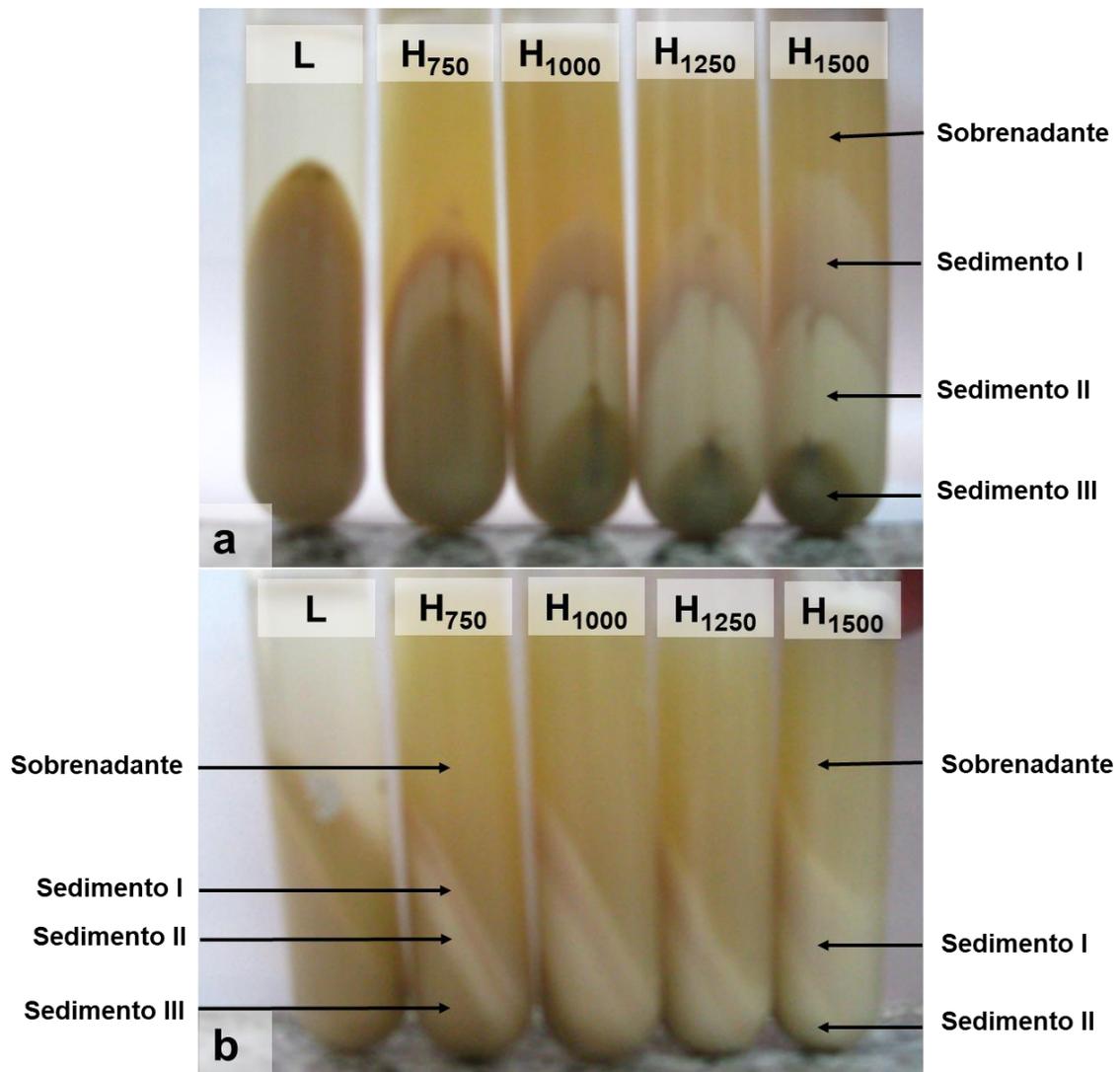


Figura 3.4. Autólisis a 50 °C de las muestras L y H<sub>1250</sub>, a) sólidos insolubles, b) cambio de pH.

### 3.5 Separación de sedimentos y sobrenadante por centrifugación

Para poder caracterizar los componentes solubles e insolubles de las muestras, se realizó un fraccionamiento de las dispersiones mediante centrifugación. En la **Figura 3.5a**, se muestra la vista de frente de los tubos centrifugados.



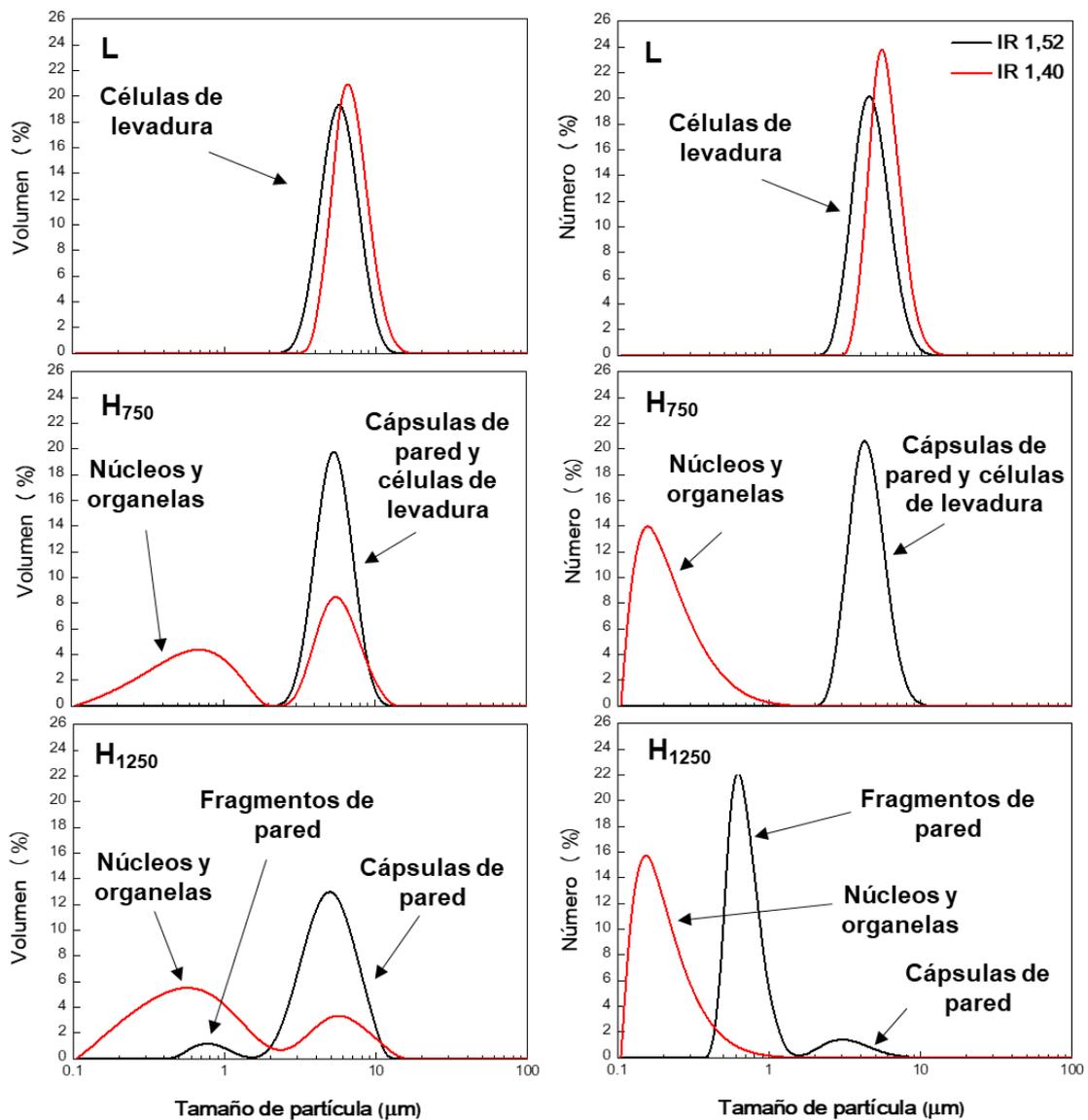
**Figura 3.5.** Fracciones obtenidas por centrifugación de las muestra L, H<sub>750</sub>, H<sub>1000</sub>, H<sub>1250</sub> y H<sub>1500</sub>. a) vista de frente, b) vista de perfil.

Se observa en la muestra L, un sedimento de color uniforme y un sobrenadante límpido. En las muestras homogeneizadas, en cambio, los sobrenadantes son turbios y en los sedimentos se diferencian tres capas con distintas tonalidades, que cómo se verá más adelante, indican la presencia de fracciones con diferente composición, grado de hidratación y/o tamaño de partícula y que por lo tanto sedimentan a diferentes velocidades. La fracción del sedimento III, es la mayoritaria en la muestra H<sub>750</sub>, pero en las muestras H<sub>1000</sub>, H<sub>1250</sub> y H<sub>1500</sub>, esta fracción solo forma una pequeña capa superficial en el fondo del

tubo que no pudo aislarse para su posterior caracterización. Contrariamente, las fracciones I y II, que estarían formadas por partículas más pequeñas y/o más hidratadas, aumentan en proporción a medida que se incrementa la presión de homogeneización. En la **Figura 3.5b**, se observa la vista de perfil de los tubos. Se puede corroborar que la capa del sedimento III es evidente en la muestra H<sub>750</sub>, pero despreciable en las muestras H<sub>1000</sub>, H<sub>1250</sub> y H<sub>1500</sub>.

### **3.6. Distribución de tamaño de partícula**

La distribución de tamaño de partícula depende del índice de refracción (IR) utilizado, ya que este parámetro varía según las características de los componentes que se analizan. El índice de refracción de la célula y de los componentes intracelulares generalmente se estima a partir del contenido de proteína y de agua. En los componentes ricos en proteínas e hidratos de carbono como la pared celular, el índice varía entre 1,48 y 1,60, mientras que, en aquellos componentes más hidratados, como las organelas y núcleos, está comprendido entre 1,38 y 1,42 [115]. Por lo tanto, para poder determinar la presencia de distintos componentes celulares, se compararon las distribuciones de tamaño de partícula de las dispersiones homogeneizadas y sin homogeneizar, con un IR de 1,52 (valor de default del equipo) y con un IR de 1,40. En la **Figura 3.6** se comparan las distribuciones en número y en volumen de las muestras L, H<sub>750</sub> y H<sub>1250</sub>. Las distribuciones de las muestras H<sub>1000</sub> y H<sub>1500</sub> no se muestran, pero son similares a las de la muestra H<sub>1250</sub>. Las distribuciones de tamaño de partícula de la muestra L, tanto en número como en volumen y con ambos índices de refracción (1,40 y 1,52) presentan una población monomodal, cuyo rango de tamaño corresponde al de las células de levadura enteras [10]. En la distribución en volumen de la muestra H<sub>750</sub>, medida con un IR de 1,52, la población también es monomodal y con un tamaño similar al de la muestra L. Sin embargo, con un IR de 1,40 se observa una segunda población con un tamaño de partícula más pequeño, que se atribuye a los componentes intracelulares liberados al medio [1].



**Figura 3.6.** Distribuciones en volumen (izquierda) y en número (derecha) de las muestras L, H<sub>750</sub> y H<sub>1250</sub> (IR 1,40 y 1,52)

Este resultado confirmaría que, durante la homogeneización a 750 bar, las células se dañan y liberan el contenido intracelular, pero mantienen su tamaño original. En la distribución en número de esta muestra, medido con un IR de 1,52 se observa la población correspondiente a cápsulas de pared, mientras que, con un IR de 1,40, solo se observa la población correspondiente a las organelas liberadas al medio.

Por otro lado, las distribuciones en número y en volumen de la muestra H<sub>1250</sub> medidas con un IR de 1,52 presentan dos poblaciones, una con una moda de 0,7 μm que correspondería a la pared micronizada y la otra con una moda de 5,0 μm que se atribuye a células vivas o cápsulas de pared sin micronizar. En las determinaciones realizadas con un IR de 1,40, al igual que en la muestra H<sub>750</sub>, solo se observa la población correspondiente a núcleos y organelas.

A partir del análisis de las distribuciones medidas con ambos IR, se puede concluir que las determinaciones realizadas con un IR 1,40 permite corroborar que la homogeneización a alta presión provoca la liberación de componentes intracelulares, incluso a una presión de 750 bar que no logra micronizar a las células. Sin embargo, para cuantificar la cantidad de fragmentos de pared y de cápsulas enteras, se debe utilizar un IR de 1,52.

En la **Tabla 3.3** se muestran los valores promedio D<sub>1,0</sub>, y D<sub>4,3</sub> (De Brouckere), que corresponden a los promedios ponderados de las curvas de distribución en número y en volumen respectivamente y los valores de *span* de dichas distribuciones para las muestras L, H<sub>750</sub>, H<sub>1000</sub>, H<sub>1250</sub> y H<sub>1500</sub>, medidos con un IR de 1,52.

**Tabla 3.3.** Valores promedios D<sub>4,3</sub> y D<sub>1,0</sub>, y *span* de las muestras L, H<sub>750</sub>, H<sub>1000</sub>, H<sub>1250</sub> y H<sub>1500</sub>, medidos con un IR de 1,52.

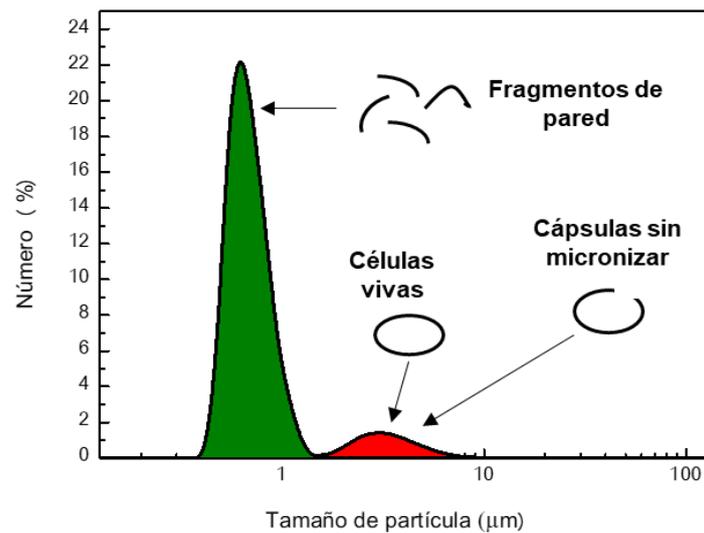
Muestra	Volumen		Número	
	D <sub>4,3</sub> (μm)	<i>span</i>	D <sub>1,0</sub> (μm)	<i>span</i>
L	5,54 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,52 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,01 <sup>a</sup>
H <sub>750</sub>	5,15 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,68 ± 0,00 <sup>a</sup>	4,24 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,66 ± 0,00 <sup>a</sup>
H <sub>1000</sub>	4,55 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,08 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,89 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,97 ± 0,03 <sup>b</sup>
H <sub>1250</sub>	4,48 ± 0,00 <sup>d</sup>	1,22 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,85 ± 0,01 <sup>d</sup>	1,00 ± 0,03 <sup>b</sup>
H <sub>1500</sub>	4,78 ± 0,02 <sup>e</sup>	1,33 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,85 ± 0,00 <sup>d</sup>	1,00 ± 0,02 <sup>b</sup>

Valores con diferentes letras en cada parámetro son significativamente diferentes (p<0,05)

En la **Tabla 3.3** se observa que los valores de  $D_{4,3}$  obtenidos para la muestra L son del orden a los datos publicados por Srinorakutara [10], quién determinó el diámetro celular con un equipo Coulter Counter y con un analizador de imágenes, obteniendo diámetros de  $5,75 \pm 0,10 \mu\text{m}$  y  $5,91 \pm 0,13 \mu\text{m}$ , respectivamente.

Se observa además, que los valores de  $D_{4,3}$  se reducen progresiva y significativamente al aumentar la presión de homogeneización, excepto en la muestra  $H_{1500}$  que aumentan respecto de  $H_{1250}$ . Esto se atribuye a la formación de pequeños agregados formados por desnaturalización térmica, debido al aumento de temperatura dentro del homogeneizador. En cambio, en los valores de  $D_{1,0}$  se observa una disminución marcada entre las muestras micronizadas ( $H_{1000}$ ,  $H_{1250}$  y  $H_{1500}$ ) en relación con las muestras sin micronizar (L y  $H_{750}$ ) y no se encontraron diferencias significativas entre las muestras  $H_{1250}$  y  $H_{1500}$  ( $p > 0,05$ ). Por otro lado, el valor de *span* que es un parámetro del ancho de la distribución y da idea de la variabilidad en los tamaños de partículas, aumenta con la presión de homogeneización en la distribución en volumen. En la distribución en número en cambio, se observa que las muestras L y  $H_{750}$  tienen distribuciones con menor valor de *span* que las muestras micronizadas, entre las cuales no hay diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Si bien estos parámetros resultan útiles para comparar de manera rápida el tamaño de las partículas de diferentes muestras, no son tan representativos en distribuciones polimodales. Por lo tanto, para determinar el porcentaje de partículas de cada población se calculó su área bajo la curva en la distribución en número, como se esquematiza en la **Figura 3.7**.

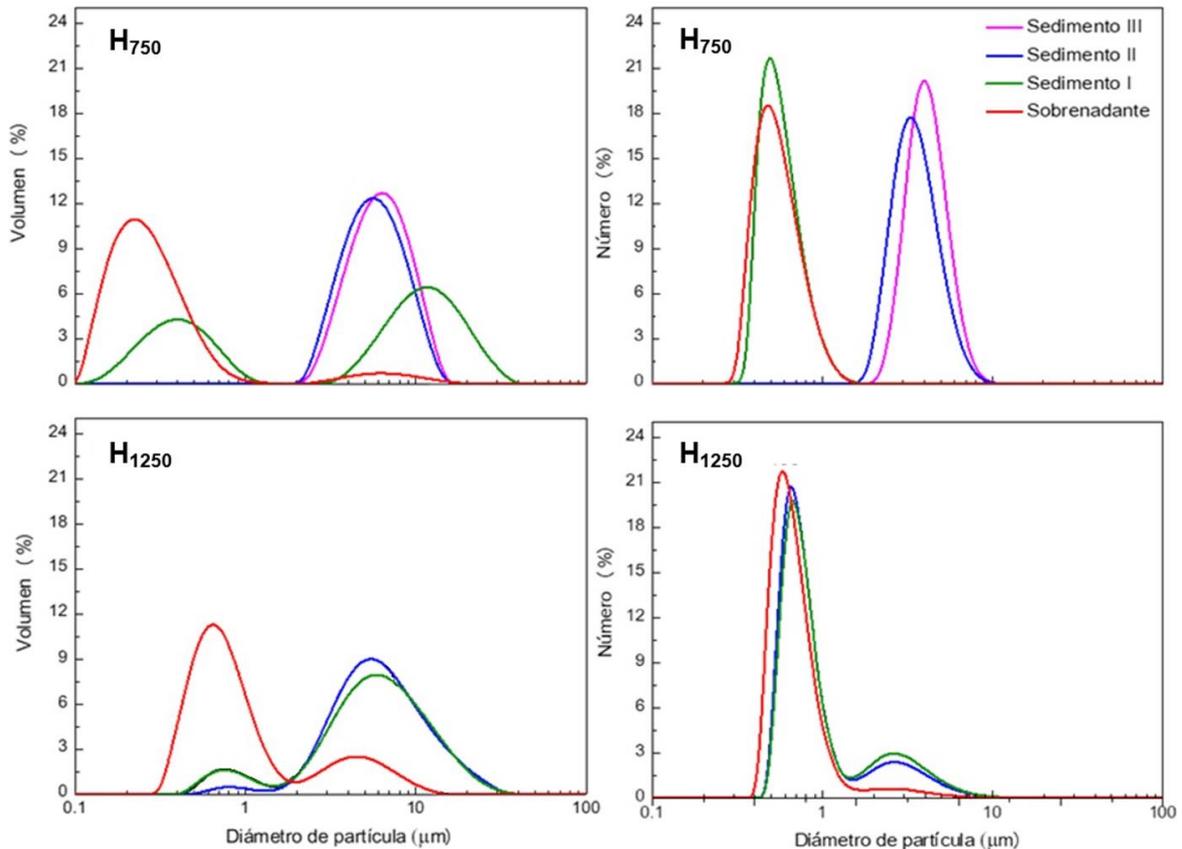


**Figura 3.7.** Esquema de la distribución de tamaño de partícula de una muestra y su relación con el tipo de partícula de cada población.

Se corroboró que en la muestra  $H_{750}$  no hay fragmentos de pared micronizada, mientras que, en las muestras homogeneizadas a presiones entre 1000 y 1500 bar, el porcentaje de estos fragmentos alcanzó valores de  $91,3 \pm 0,2$ ;  $92,9 \pm 0,2$  y  $93,5 \pm 0,1\%$  para las muestras  $H_{1000}$ ,  $H_{1250}$  y  $H_{1500}$  respectivamente. Estos resultados confirman que al aumentar la presión de homogeneización, aumenta el grado de micronización de la pared celular.

A partir de los análisis realizados, se concluye que las distribuciones en número y los parámetros que se obtienen a partir de ella, permiten caracterizar mejor el grado de ruptura y micronización de las muestras, ya que informan sobre la cantidad de partículas micronizadas y sin micronizar. Sin embargo, a partir de la distribución en volumen es posible detectar la presencia de partículas de gran tamaño, que influirían negativamente en la estabilidad frente a la sedimentación de las dispersiones.

En la **Figura 3.8** se muestran las distribuciones en volumen y en número de las fracciones de las muestras H<sub>750</sub> y H<sub>1250</sub> medidas con un IR de 1,52. Las distribuciones de las muestras H<sub>1000</sub> y H<sub>1500</sub> no se muestran, pero son similares a las de la muestra H<sub>1250</sub>.



**Figura 3.8.** Distribución de tamaño de partícula en número y en volumen de las fracciones de las muestras H<sub>750</sub> y H<sub>1250</sub> (IR 1,52).

Como se observa en las distribuciones en número y en volumen de la muestra H<sub>750</sub>, las fracciones de los sedimentos II y III tienen partículas con un tamaño similar al de las cápsulas sin micronizar y las células enteras. Por otro lado, la mayor parte de las partículas del sobrenadante y del sedimento I son del orden del micrón. Para poder realizar las determinaciones en estas dos fracciones, fue necesario utilizar un volumen mucho mayor de muestra, debido a que la concentración de partículas es despreciable en comparación a la cantidad presente en las fracciones de los sedimentos II y III. Esto explicaría por qué en la muestra H<sub>750</sub> completa (**Figura 3.6**) no se había detectado la población de partículas

micronizadas. Con estos resultados se llega a la conclusión que en la muestra H<sub>750</sub> hay micronización de pared, pero es despreciable en comparación a la que ocurre a presiones superiores.

En las distribuciones en volumen y en número de las fracciones de la muestra H<sub>1250</sub> se observan dos poblaciones, una con una moda de 0,5  $\mu\text{m}$  y la otra con una moda de 5  $\mu\text{m}$ . Se pudo corroborar que la diferencia entre las distintas fracciones es el porcentaje relativo de las poblaciones; en el sobrenadante predominan las partículas micronizadas mientras que en las fracciones del sedimento, las partículas de mayor tamaño. Por lo tanto, la diferencia en la velocidad de sedimentación de cada fracción, que se evidenció con la formación de diferentes capas en el sedimento (**Figura 3.5**), no estaría determinada únicamente por el tamaño de partícula, sino también por el grado de hidratación de éstas. En las capas superiores, estarían las partículas más hidratadas, que tienen una densidad menor que aquellas más concentradas en hidratos de carbono y proteínas. En la **Sección 3.10** se analizará con mayor detalle el proceso de sedimentación de las dispersiones.

### **3.7. Determinación de absorbancia a 280 nm y a 550 nm**

La turbidez se determinó por medidas de absorbancia a 550 nm, obteniéndose los resultados que se muestran en la **Tabla 3.4**. Estos valores son directamente proporcionales a la concentración de partículas dispersas, e inversamente proporcionales a su tamaño [98]. En un sistema ideal, la disminución de tamaño de partícula se reflejaría en un aumento de la turbidez. Sin embargo, en una dispersión de células, cuando se produce la ruptura, la liberación del contenido intracelular provoca una disminución de la concentración volumétrica de la fase dispersa, ya que una alta proporción del citoplasma está formado por componentes solubles y agua. Por tal motivo, en las dispersiones la turbidez disminuye a medida que aumenta la presión de homogeneización. En cambio, en los sobrenadantes, la turbidez aumenta con la presión de homogeneización, debido a que aumenta la cantidad de fragmentos micronizados que no sedimentan por centrifugación. Por otra parte, el

aumento de absorbancia a 280 nm a medida que aumenta la presión de homogeneización está relacionado con la liberación de proteínas solubles y ácidos nucleicos durante este proceso.

**Tabla 3.4.** Valores de absorbancia a 550 nm (turbidez) de las dispersiones y sobrenadantes, y de absorbancia a 280 nm de los sobrenadantes de las muestras L, H<sub>750</sub>, H<sub>1000</sub>, H<sub>1250</sub> y H<sub>1500</sub>.

Muestra	Dispersiones*	Sobrenadantes**	
	550 nm	550 nm	280nm
L	0,600 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,000 ± 0,000 <sup>a</sup>	0,026 ± 0,005 <sup>a</sup>
H <sub>750</sub>	0,366 ± 0,002 <sup>b</sup>	0,013 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,275 ± 0,003 <sup>b</sup>
H <sub>1000</sub>	0,249 ± 0,006 <sup>c</sup>	0,017 ± 0,002 <sup>b</sup>	0,442 ± 0,013 <sup>c</sup>
H <sub>1250</sub>	0,185 ± 0,000 <sup>d</sup>	0,026 ± 0,001 <sup>c</sup>	0,507 ± 0,010 <sup>d</sup>
H <sub>1500</sub>	0,155 ± 0,004 <sup>e</sup>	0,030 ± 0,001 <sup>c</sup>	0,550 ± 0,008 <sup>e</sup>

\*Factor de dilución 1/600

\*\*Factor de dilución 1/150.

Valores con diferentes letras en cada parámetro son significativamente diferentes (p<0,05)

### 3.8. Caracterización química

#### 3.8.1. Composición de la célula entera

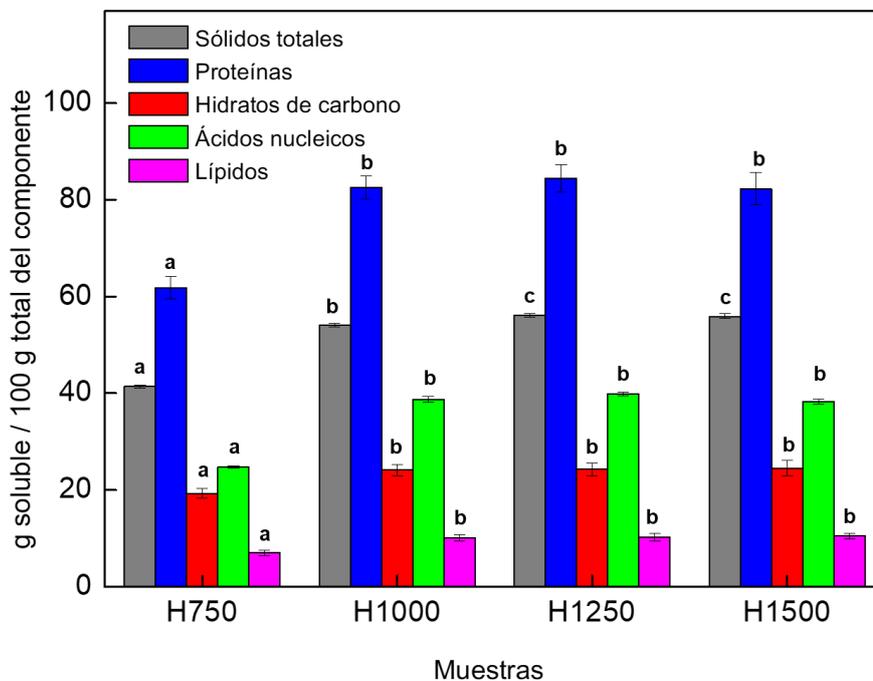
Según las determinaciones realizadas, la composición porcentual promedio de la muestra L en base seca es de 43 ± 2% de hidratos de carbono, 40 ± 3% de proteínas, 6,9 ± 0,3% de ácidos nucleicos, 6,6 ± 0,5% de lípidos y 6,4 ± 0,4% de cenizas, mientras que su contenido de humedad promedio en base húmeda es del 70 ± 2%.

#### 3.8.2. Dispersabilidad de los componentes celulares

El análisis de la composición de los sobrenadantes de las dispersiones permitió determinar la dispersabilidad acuosa de los componentes. En la muestra L no hubo valores significativos de dispersabilidad de ninguno de los componentes (p>0,05). En la **Figura 3.9** se muestra la dispersabilidad de sólidos totales, proteínas, hidratos de carbono, ácidos nucleicos y lípidos de las muestras homogeneizadas a distintas presiones. Los sólidos totales, que incluyen tanto los solubles como los que están en suspensión coloidal,

alcanzan una dispersabilidad entre 41 y 56%. Por otro lado, el índice de dispersabilidad de las proteínas alcanza valores entre 65 y 88%, mientras que el de hidratos de carbono presenta valores entre 25 y 30%. La diferencia se atribuye a que en la célula, la mayor parte de los hidratos de carbono son polisacáridos insolubles con función estructural (fundamentalmente  $\beta$ -glucanos y mananos de pared celular). En el caso de las proteínas, si bien algunas también tienen función estructural (asociadas a mananos de pared o a fosfolípidos de la membrana), la mayoría son enzimas, proteínas solubles y proteínas del citoesqueleto, que se liberan al sobrenadante cuando se rompe la pared celular. En cuanto al contenido de ácidos nucleicos, también se observó un aumento de la dispersabilidad con la homogeneización. En la muestra H<sub>750</sub>, el 25% del contenido quedó en el sobrenadante, mientras que en las tres muestras homogeneizadas a presiones superiores a 750 bar, este porcentaje ascendió al 40%.

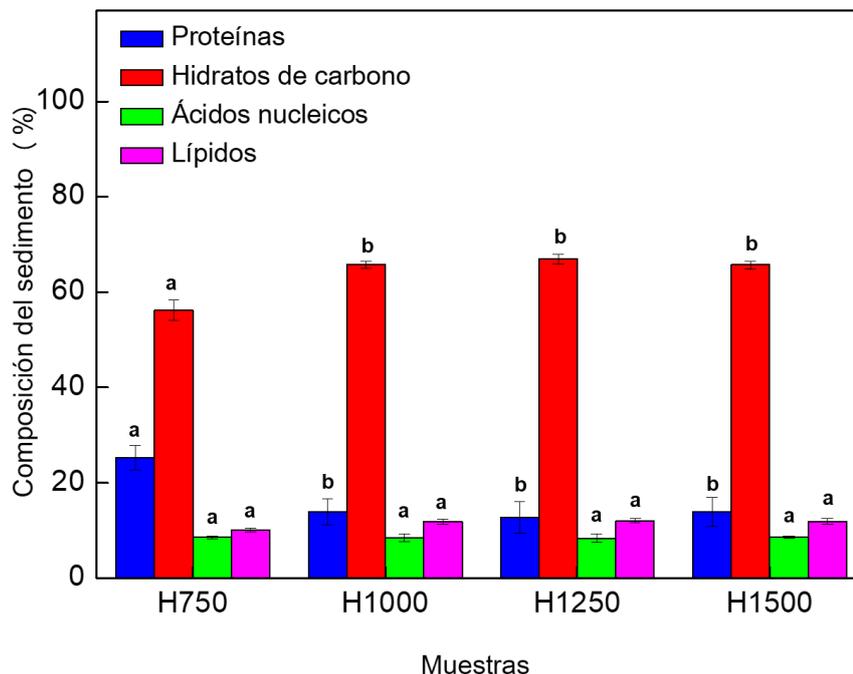
En todos los componentes se observó que la muestra H<sub>750</sub> presenta valores de dispersabilidad significativamente menores respecto de las tres muestras micronizadas, entre las cuales no hay diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).



**Figura 3.9.** Dispersabilidad de los componentes celulares de las muestras H<sub>750</sub>, H<sub>1000</sub>, H<sub>1250</sub> y H<sub>1500</sub>. Valores con diferentes letras para cada componente son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

### 3.8.3. Composición de los sedimentos

En la **Figura 3.10** se muestra la composición centesimal de los sedimentos unificados. Se observa que todos los sedimentos son más ricos en hidratos de carbono ( $\beta$ -glucanos y mananos) que en proteínas, alcanzando una concentración de 56% en la muestra H<sub>750</sub> y entre 66 y 67% en las muestras micronizadas. También contienen ácidos nucleicos que junto con parte de las proteínas intracelulares y lípidos, quedarían retenidos en los agregados de fragmentos de pared. Tanto en el porcentaje de proteínas como de hidratos de carbono se observan diferencias significativas solamente entre la muestra H<sub>750</sub> y las micronizadas, mientras que los porcentajes de ácidos nucleicos y lípidos no varían significativamente entre las cuatro muestras. Estos resultados reflejan que independientemente del grado de ruptura, la composición porcentual de los sedimentos de todas las muestras micronizadas (H<sub>1000</sub>, H<sub>1250</sub> y H<sub>1500</sub>) es similar.



**Figura 3.10.** Composición porcentual de los sedimentos de las muestras H<sub>750</sub>, H<sub>1000</sub>, H<sub>1250</sub> y H<sub>1500</sub>. Valores con diferentes letras para cada componente son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

#### 3.8.4. Caracterización de las fracciones por espectroscopía infrarroja

Los espectros obtenidos por FTIR son consistentes con los publicados por varios autores [100,116–118]. En muestras como las dispersiones de levadura, con múltiples componentes y grupos funcionales, los espectros son complejos, con señales que pueden superponerse. Sin embargo, se pueden identificar ciertas zonas con bandas características. En la **Figura 3.11** se muestran los espectros de las distintas fracciones de la muestra H<sub>750</sub>.

En la región 2990 - 2820 cm<sup>-1</sup> la absorbancia corresponde a grupos -CH<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>, mientras que a ~1740 cm<sup>-1</sup> la banda se atribuye al estiramiento de grupos -C=O de lípidos [100,116,117]. Gran parte de los lípidos de la célula son fosfolípidos que se encuentran en la membrana plasmática y en las membranas que recubren al núcleo y a las organelas. Durante la homogeneización a alta presión las membranas se rompen y los fosfolípidos, debido a su naturaleza anfifílica, podrían interactuar con el resto de los componentes celulares (tanto polares como no polares), quedando parte de estos en todas las fracciones.

La región comprendida entre 1650 y 1500 cm<sup>-1</sup> incluye a la banda amida I (1652 cm<sup>-1</sup>) que se atribuye al estiramiento del enlace C=O y la banda amida II (1550 cm<sup>-1</sup>) que corresponde al estiramiento del enlace C-N y al balanceo del enlace N-H. Ambos picos son característicos de la estructura proteica y se modifican si esta estructura cambia [100,117,119]. Por otro lado, en la zona comprendida entre 1200 y 1480 cm<sup>-1</sup> se observan múltiples bandas. La de mayor intensidad, que absorbe a 1400 cm<sup>-1</sup>, se asigna principalmente al estiramiento de grupos -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> de proteínas y al estiramiento simétrico del grupo -C=O del carboxilato de proteínas, mientras que a 1300 cm<sup>-1</sup> se encuentra la banda amida III. Por otro lado, la banda que absorbe a 1240 cm<sup>-1</sup> corresponde a la vibración del grupo -PO<sub>2</sub><sup>-</sup> presente en ácidos nucleicos y fosfolípidos [100]. Comparando la intensidad de los picos amida I, II y III de las diferentes fracciones, se corroboran los resultados obtenidos en las **Secciones 3.8.2 y 3.8.3**; la fracción del sobrenadante tiene mayor porcentaje de proteínas que las fracciones de los sedimentos.

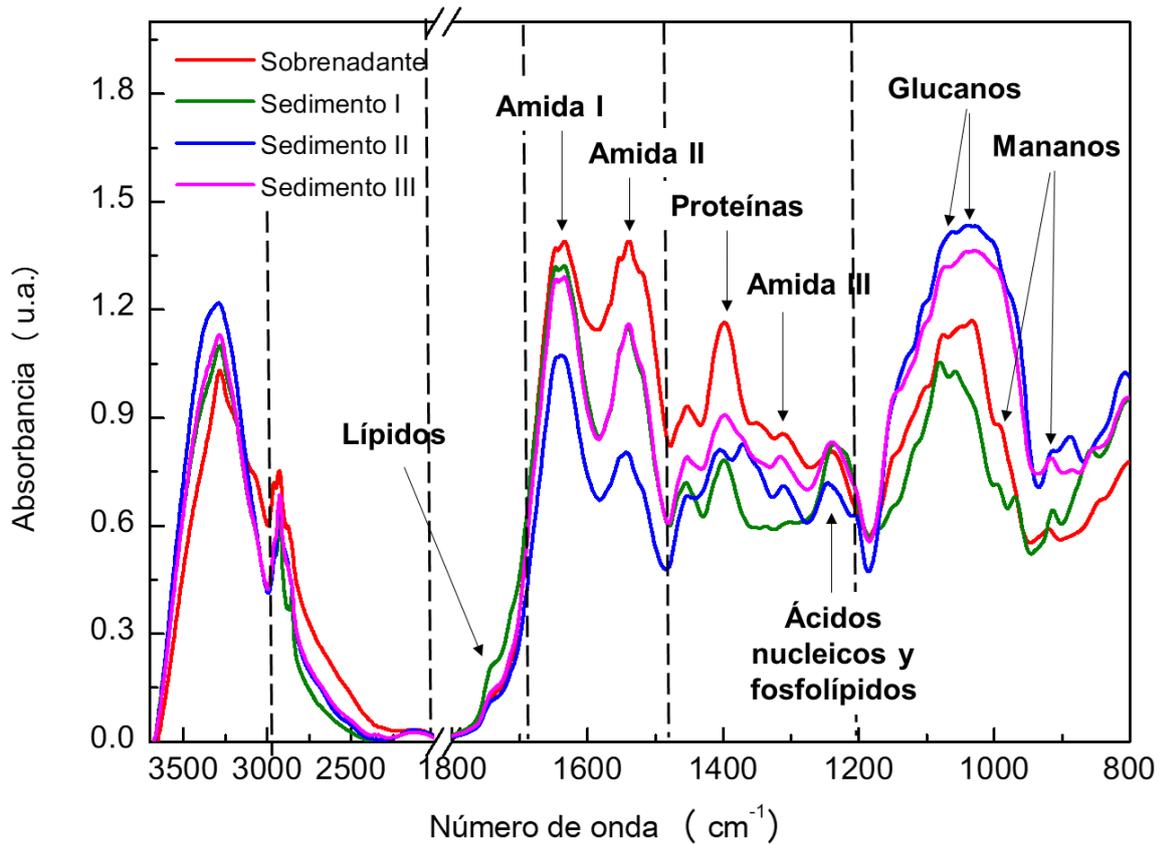
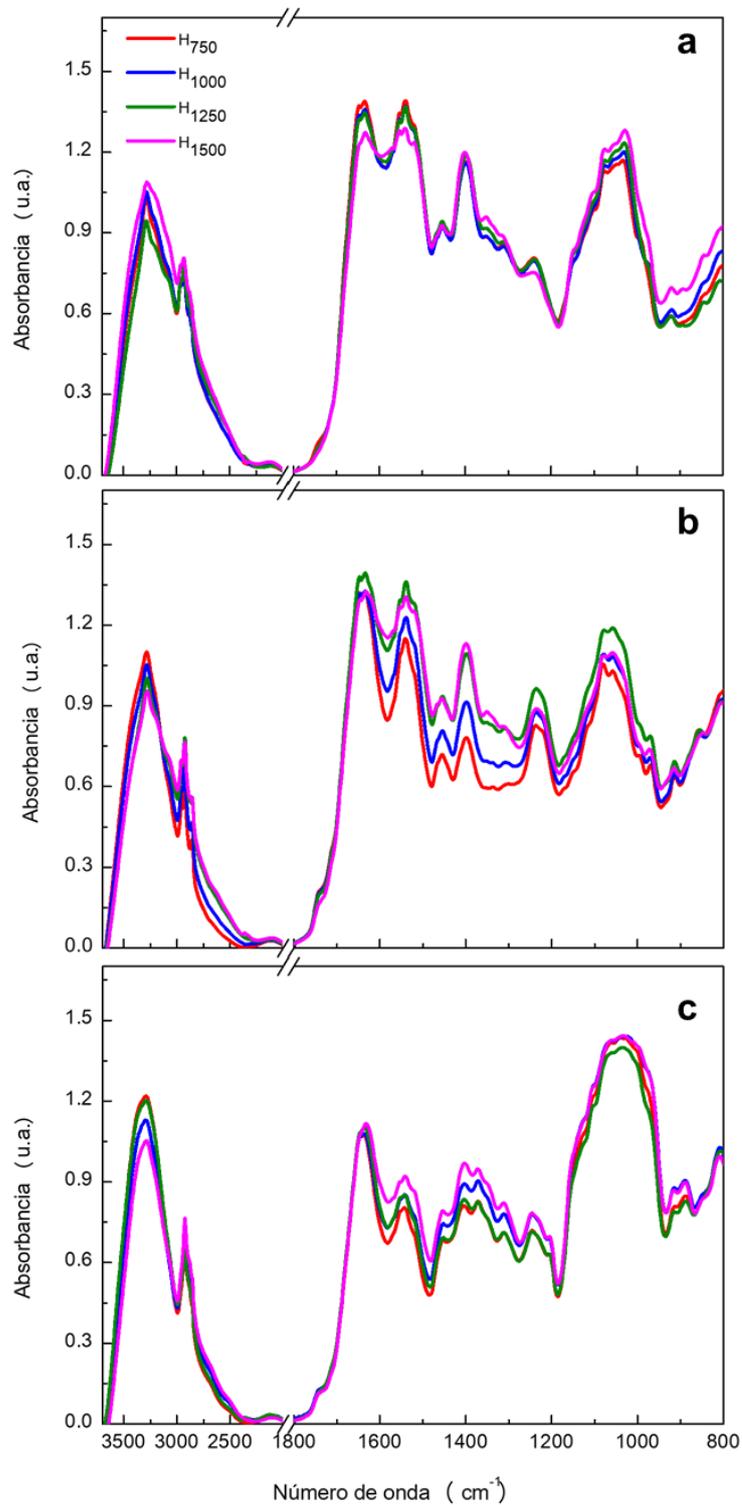


Figura 3.11. Espectros de FTIR de las fracciones de la muestra H<sub>750</sub>.

En la última región, entre 800 y 1200  $\text{cm}^{-1}$ , las bandas corresponden principalmente a hidratos de carbono. Por ejemplo, los picos a 822, 905, 972 y 1050  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a mananos mientras que los picos a 998, 1025 y 1108  $\text{cm}^{-1}$  se asignan a  $\beta$ -glucanos [100]. En forma comparativa se puede observar que las fracciones de los sedimentos II y III son más ricas en  $\beta$ -glucanos y mananos de pared que las fracciones del sobrenadante y del sedimento I. Dentro de esta región, también se encuentra una banda a 1080  $\text{cm}^{-1}$  que es característica de la presencia de ácidos nucleicos [116,117], sin embargo, la intensidad de este pico puede estar enmascarada por  $\beta$ -glucanos (1076  $\text{cm}^{-1}$ ) [118].

En la **Figura 3.12** se muestran los espectros de FTIR de las fracciones de sobrenadante, sedimento I y sedimento II de todas las muestras. Comparando los

espectros de las tres fracciones, se puede observar que en el sobrenadante todas las muestras presentan las mismas bandas de absorción.

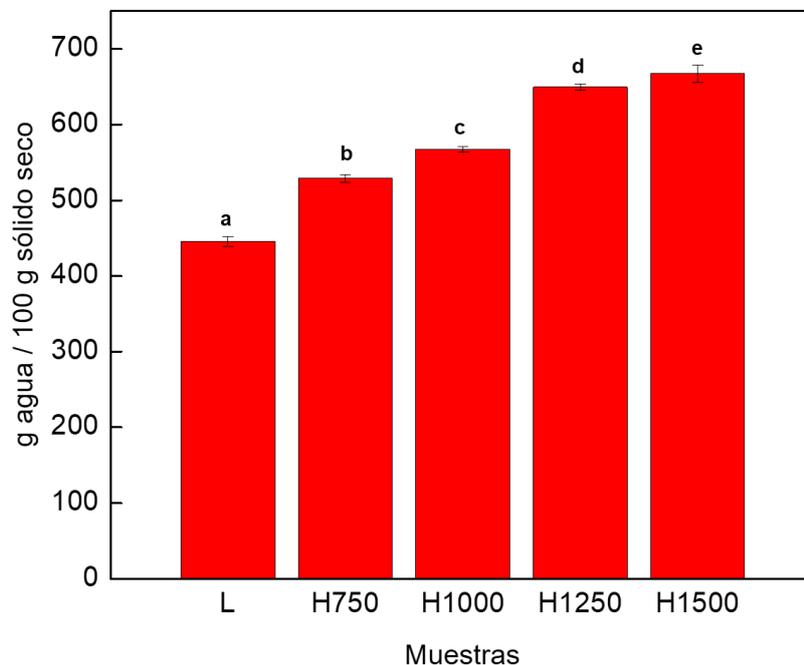


**Figura 3.12.** Espectros de FTIR de las fracciones de las muestras H<sub>750</sub>, H<sub>1000</sub>, H<sub>1250</sub> y H<sub>1500</sub>. a) sobrenadante, b) sedimento I, c) sedimento II.

En las fracciones de los sedimentos, también se observan las mismas bandas, aunque con diferencias en la intensidad, especialmente en la zona que predomina la absorción de proteínas ( $1200 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ ). A pesar de estas diferencias, todas las muestras presentan la misma “huella dactilar” o patrón de absorción para cada fracción, independientemente de la presión de homogeneización aplicada y de la eficiencia de la ruptura.

### 3.9. Capacidad de retención de agua de la fracción insoluble

La capacidad de retención de agua (CRA) es una medida de la cantidad de agua que es absorbida y retenida por los componentes insolubles de la célula, luego de la centrifugación de las dispersiones [97]. En la **Figura 3.13** se muestra la capacidad para retener agua de la célula entera y de las fracciones insolubles unificadas de las dispersiones homogeneizadas.



**Figura 3.13.** Capacidad de retención de agua de las muestras L, H<sub>750</sub>, H<sub>1000</sub>, H<sub>1250</sub> y H<sub>1500</sub>. Valores con diferentes letras son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

La muestra L tiene una alta CRA debido a que las células retienen una gran cantidad de agua en su interior. En la muestra H<sub>750</sub>, se observa un aumento en la CRA respecto de la muestra L. Como se discutió anteriormente, en esta muestra las células se dañan y liberan gran parte de su contenido intracelular, pero mantienen su tamaño original. Esto sugiere que el contenido intracelular es reemplazado por agua dentro de las cápsulas de la pared. Teniendo en cuenta la masa inicial de células (en base seca), la cantidad de agua en la muestra H<sub>750</sub> es 30% menor que en la muestra L. Sin embargo, como parte de los sólidos intracelulares se liberan al medio, la masa seca del sedimento disminuye en un 42% respecto de la muestra L, resultando en un incremento en la CRA.

En las muestras micronizadas, el aumento de la CRA respecto de las muestras L y H<sub>750</sub> se atribuye al mayor contenido de  $\beta$ -glucanos y mananoproteínas en la fracción insoluble, que tienen una alta capacidad de hidratación [39,49,120]. Se observa además que la CRA aumenta con el grado de micronización, lo cual se relaciona con la mayor área superficial de las partículas micronizadas, que favorece la interacción de éstas con el agua.

### **3.10. Estabilidad de las dispersiones de levadura entera y homogeneizada frente a la sedimentación**

Como se mencionó en secciones anteriores, la velocidad de sedimentación de las dispersiones está condicionada principalmente por el tamaño de las partículas dispersas y por la diferencia de densidad entre ambas fases, la cual disminuye a medida que aumenta el grado de hidratación de sus partículas [121].

Si se agita una dispersión con células de levadura enteras o rotas, se observa a simple vista que las dispersiones son opacas y de tonalidad homogénea. Sin embargo, al dejar los tubos en reposo, rápidamente comienza el proceso de sedimentación y la dispersión se torna más traslúcida en la parte superior del tubo y se acumulan partículas en la parte inferior del mismo, observándose la formación de un sedimento. Mediante los perfiles de %BS y de %T es posible estudiar estos procesos de migración de partículas. La

señal de %BS es proporcional a la concentración e inversamente proporcional al tamaño de las partículas en dispersión, mientras que la señal de %T indica que el sistema es traslúcido [105].

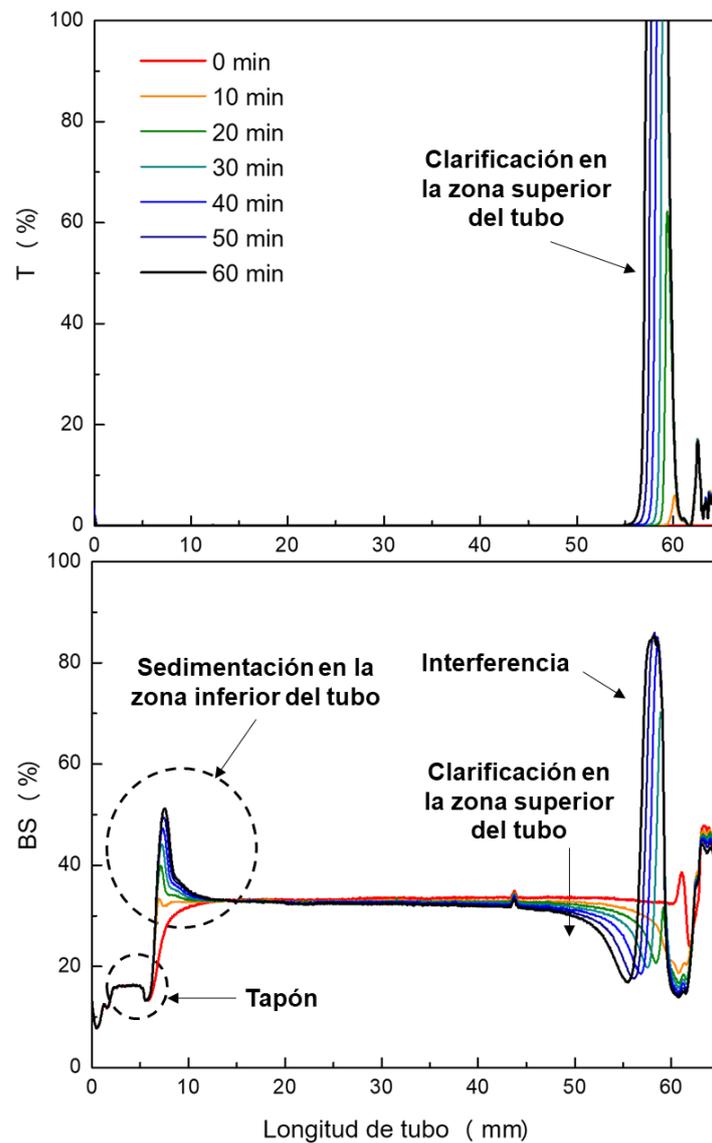


Figura 3.14. Perfil de %T y %BS en función del tiempo de la muestra L.

En los perfiles de la muestra L (**Figura 3.14**) se observa que inicialmente no hay señal de %T mientras que el perfil de %BS es aproximadamente constante a lo largo de todo el tubo. Con el transcurso del tiempo, se produce un aumento del %BS en la zona inferior del tubo. El ancho del pico formado, es una medida de la altura del sedimento en el tubo, mientras que la intensidad de la señal de %BS da idea de la concentración de partículas en el mismo. Simultáneamente, en la zona superior del tubo se evidencia la disminución de la señal de %BS debido a la disminución de la concentración de partículas y la aparición de la señal de %T debido a que la muestra se torna traslúcida. En la zona donde aparecen ambas señales, no es posible analizar los perfiles de %BS debido a que la señal de %T genera interferencia [109].

En la **Figura 3.15**, se muestran los perfiles de %BS de las dispersiones homogeneizadas en función del tiempo durante 60 minutos. Se puede observar que en todas las muestras hay un aumento en la señal de %BS en la zona inferior del tubo y una disminución en la zona superior. Comparativamente, la muestra H<sub>750</sub> presenta una cantidad mucho menor de sedimento (menor ancho del pico de %BS en la zona inferior) y una disminución del %BS solamente en el último centímetro del tubo (zona superior), a diferencia de las muestras micronizadas en las cuales la cantidad de sedimento es mayor y la disminución de %BS ocurre en toda la zona media y alta del tubo.

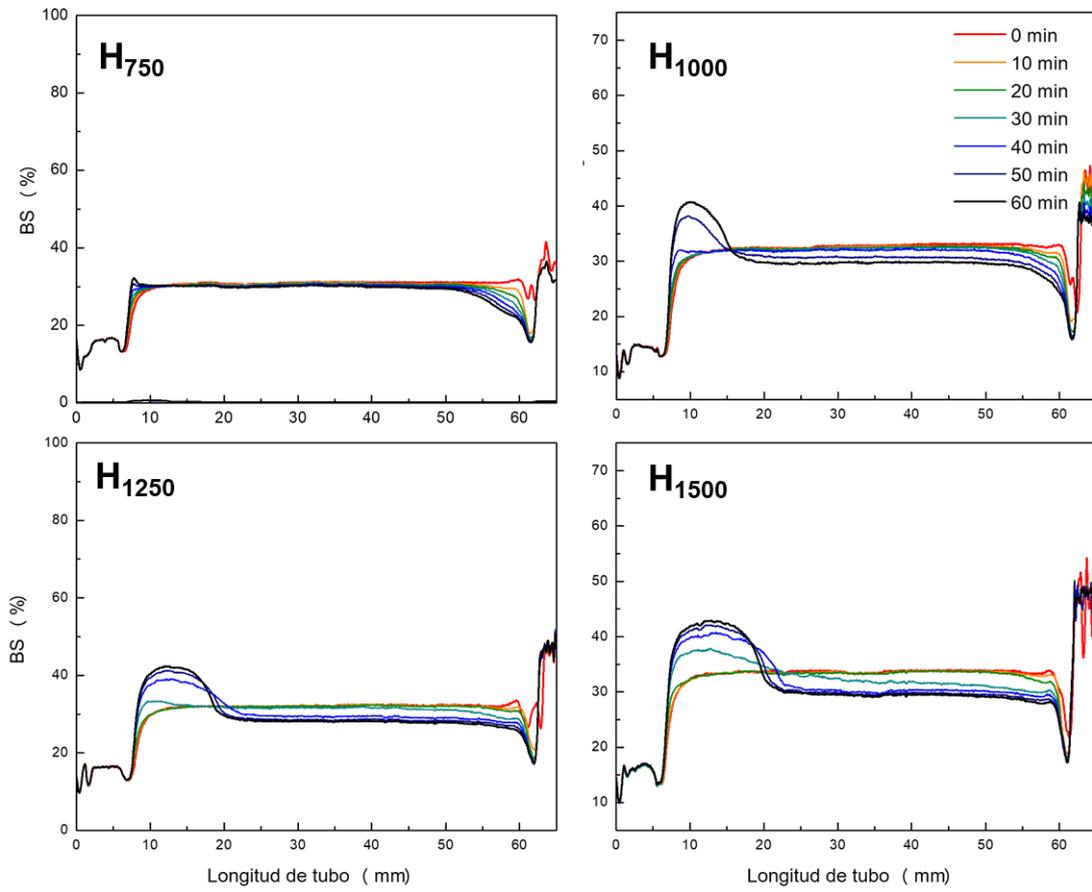
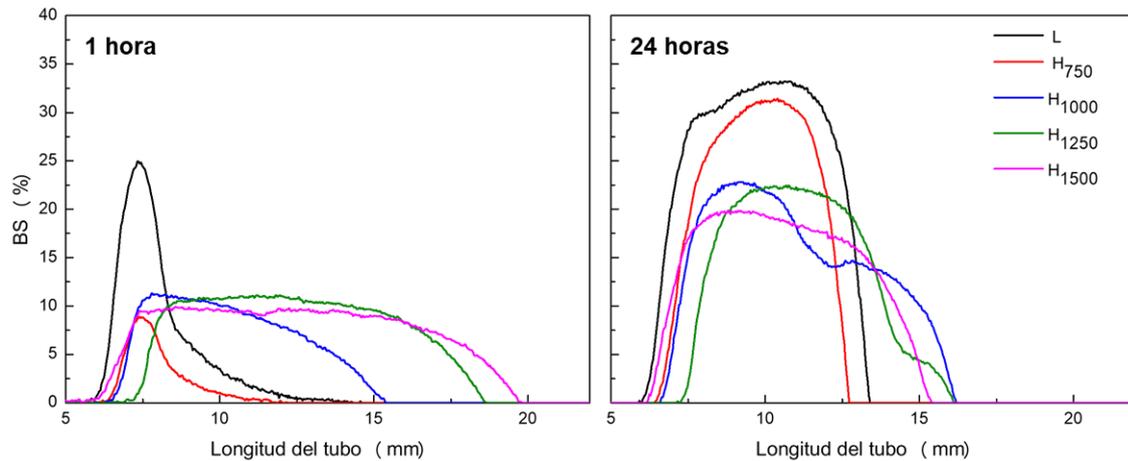


Figura 3.15. Perfiles de %BS de las muestras H<sub>750</sub>, H<sub>1000</sub>, H<sub>1250</sub> y H<sub>1500</sub>.

En la **Figura 3.16** se muestran los perfiles de %BS en la zona baja del tubo luego de 1 y 24 horas. Durante la primera hora, las muestras micronizadas formaron sedimentos con mayor volumen (ancho del pico) que los de las muestras no micronizadas (L y H<sub>750</sub>). Sin embargo, la intensidad de la señal de %BS indica que la muestra L es la que forma un sedimento más concentrado en partículas (menos hidratado). Por otro lado, la muestra H<sub>750</sub> formó un sedimento con poco volumen y poca concentración de partículas. Luego de 24 horas, las muestras L y H<sub>750</sub> formaron sedimentos menos hidratados y con menor volumen que los sedimentos de las muestras micronizadas. En estas últimas, la intensidad del %BS aumentó y la altura del sedimento disminuyó respecto del que se había formado a los 60 minutos, debido a la compactación de los sedimentos. Estos resultados se correlacionan con la capacidad de retención de agua discutida en la **Sección 3.9**. Al aumentar el grado

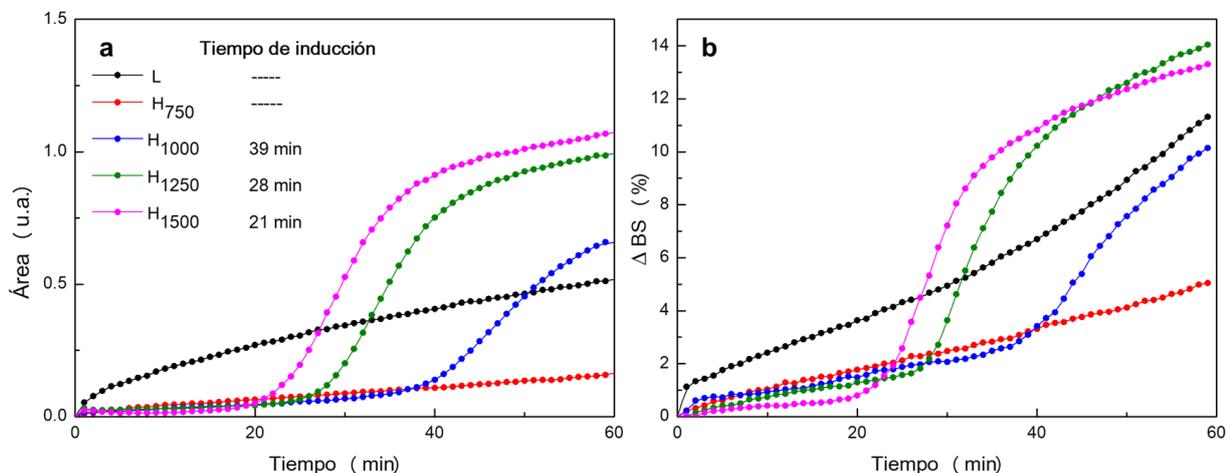
de micronización, las partículas se hidratan más y los sedimentos tienen mayor CRA. En los perfiles de %BS, esto se refleja en una menor intensidad de la señal de %BS y mayor cantidad de sedimento en el tubo.



**Figura 3.16.** Perfiles de %BS de las muestras H<sub>750</sub>, H<sub>1000</sub>, H<sub>1250</sub> y H<sub>1500</sub> en la zona baja del tubo, luego de 1 y 24 horas de sedimentación.

Para estudiar la velocidad de sedimentación, se analizaron y compararon los cambios en los perfiles de %BS en la zona inferior y en la zona superior del tubo. En la **Figura 3.17a** se muestra la cinética de sedimentación de las dispersiones, que se determinó como el área bajo cada perfil en la zona inferior del tubo en función del tiempo, tomando como referencia 0% para el tiempo inicial. Este parámetro adimensional, tiene en cuenta tanto el volumen del sedimento formado (ancho del pico) como la concentración de las partículas en él (intensidad de %BS). La velocidad de sedimentación se puede interpretar como la pendiente en cada punto de la curva. Los datos obtenidos para las muestras L y H<sub>750</sub> se pueden ajustar con una función lineal ( $R^2= 0,9811$  y  $R^2= 0,9949$ , respectivamente). Por lo tanto, ambas muestras sedimentan a velocidad aproximadamente constante, pero la velocidad de la muestra L es tres veces mayor que la de la muestra H<sub>750</sub>. Este resultado se atribuye a que durante la ruptura celular, aunque no se modifica significativamente el tamaño de las partículas, la célula libera contenido intracelular al

medio y se llena de agua, disminuyendo la diferencia de densidad entre ambas fases. Este efecto retrasa la velocidad de sedimentación respecto a la velocidad de las células enteras.



**Figura 3.17.** Cinética de sedimentación de las muestras L, H<sub>750</sub>, H<sub>1000</sub>, H<sub>1250</sub> y H<sub>1500</sub>. a) área bajo el perfil de la curva en la zona baja del tubo, b) porcentaje de disminución de %BS en la zona alta del tubo.

En las muestras micronizadas (H<sub>1000</sub>, H<sub>1250</sub> y H<sub>1500</sub>), se observa que las curvas de sedimentación están divididas en tres zonas. En la primera zona, a tiempos cortos, la velocidad de sedimentación de las tres muestras es menor a la de la muestra H<sub>750</sub>, debido al menor tamaño de sus partículas. Luego de este tiempo, que se denominó tiempo de inducción, la velocidad aumenta rápidamente. Estos resultados sugieren que las partículas micronizadas tienen actividad interfacial y tienden a formar agregados, que sedimentan a mayor velocidad. Como el tiempo de inducción disminuye a medida que aumenta la presión de homogeneización, la tendencia a la formación de agregado aumentaría con la cantidad de partículas micronizadas. Finalmente, en la tercera zona, la velocidad vuelve a reducirse, debido a la disminución de la concentración de partículas lo cual limita su velocidad de agregación.

En la **Figura 3.17b** se muestran las cinéticas de sedimentación de las dispersiones, que se determinaron como el porcentaje de disminución de la señal de %BS en la zona

alta del tubo. Se puede observar que las curvas tienen la misma forma que las obtenidas a partir del área bajo el perfil de %BS en la zona baja del tubo (**Figura 3.16a**). En ambas se observa un tiempo de inducción en las tres muestras micronizadas y la misma tendencia en la reducción de este tiempo a medida que aumenta el grado de micronización de las partículas. Si bien las cinéticas obtenidas de esta manera son más sencillas de determinar, los resultados son fuertemente dependientes de la zona del tubo seleccionada. Además, en las regiones más traslúcidas en las cuales hay %T, debe descartarse la señal de %BS. Por lo tanto, la determinación de la cinética a partir de la cuantificación del área bajo la curva de %BS (**Figura 3.17a**), es más reproducible e independiente de la traslucidez de la muestra en la zona superior.

A partir del análisis de los perfiles de %BS se pudo demostrar que la velocidad de sedimentación no depende únicamente del tamaño de las partículas y de la cantidad de éstas sino también de su tendencia a agregarse. Esta tendencia a formar agregados da indicios de las propiedades anfílicas de las partículas micronizadas, las cuales se estudiarán en el próximo capítulo.

### **3.11. Resumen de resultados y conclusiones parciales**

- La homogeneización a alta presión es un método efectivo para provocar la ruptura celular. A presiones de homogeneización de 750 bar, el porcentaje de muerte celular es superior al 80%. En estas condiciones las células se dañan y liberan el contenido intracelular, pero las cápsulas de pared mantienen su forma original. Por otro lado, cuando la homogeneización se realiza a presiones de 1000 bar o superiores, el porcentaje de muerte celular es prácticamente total y la pared celular se microniza casi completamente.
- Durante la homogeneización se produce la desnaturalización parcial de las proteínas, que se incrementa con la presión aplicada. Sin embargo, luego del proceso de homogeneización, las muestras aún presentan actividad enzimática que limita la utilización de las dispersiones.
- Por centrifugación de las dispersiones homogeneizadas se separa el sobrenadante y tres fracciones de sedimento, que poseen partículas con diferentes tamaños y grado de hidratación.
- La composición porcentual de los sedimentos de las muestras micronizadas no presenta diferencias significativas entre ellas, pero sí respecto de la muestra H<sub>750</sub>. Además, cada fracción presenta espectros de FTIR similares, independientemente de la muestra homogeneizada de la cual proviene.
- Al aumentar la presión de homogeneización aumenta la capacidad de retención de agua de los sedimentos. Como consecuencia, se obtiene mayor cantidad de sedimento al aumentar el grado de micronización.
- Las partículas micronizadas tendrían actividad interfacial y por tal motivo tienden a agregarse.
- La aplicación de una presión de homogeneización de 1500 bar genera un aumento de temperatura tal, que puede generar cambios en la muestra, como la desnaturalización no controlada de proteínas.

- La condición óptima de ruptura celular fue a 1250 bar. La muestra obtenida presentó una composición similar a la de la muestra homogeneizada a 1000 bar, pero con un mayor grado de micronización y mayor tendencia a formar agregados y retener agua, lo cual estaría relacionado con una mayor actividad superficial de sus partículas.

# **CAPÍTULO 4**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **EMULSIONES CON LEVADURA HOMOGENEIZADA A ALTA PRESIÓN**

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN. EMULSIONES CON LEVADURA HOMOGENEIZADA A ALTA PRESIÓN

Como se mencionó en el **Capítulo 3**, la célula de levadura está integrada principalmente por polisacáridos ( $\beta$ -glucanos y mananos), proteínas y fosfolípidos. Aunque la célula entera, debido a su organización estructural, no presenta buenas propiedades emulsionantes, se ha demostrado en numerosos trabajos que los componentes aislados tienen la capacidad de actuar como emulsionantes y estabilizantes de emulsiones [18,39,49,50,122].

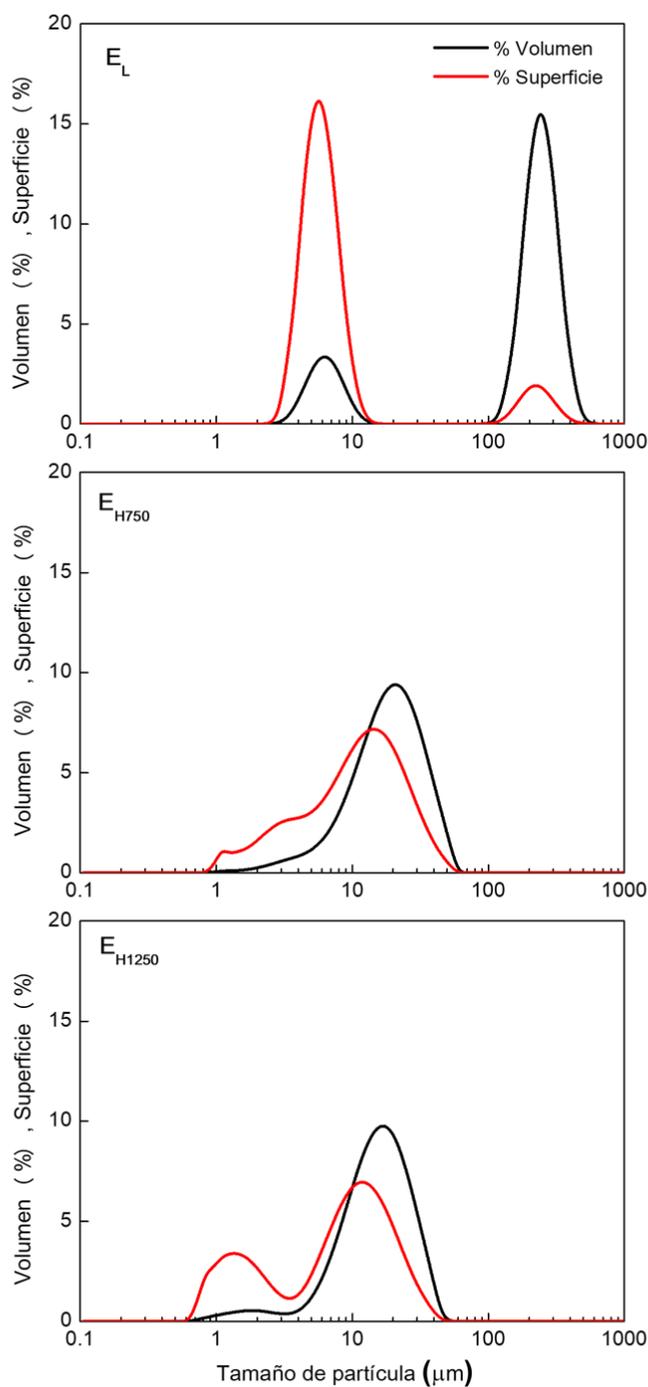
En este capítulo se evaluaron las propiedades emulsionantes de las dispersiones de levadura homogeneizadas a distintas presiones. Las emulsiones se prepararon con un  $\phi_m$  de 0,3 y una concentración de levadura de 2,5% b.s. en la fase acuosa.

La nomenclatura que se utilizó para las emulsiones es la letra E seguida del nombre de la dispersión de levadura. Por ejemplo, la emulsión preparada con la muestra L se denomina  $E_L$  y la preparada con la dispersión  $H_{1250}$  se denomina  $E_{H1250}$ .

### 4.1. Distribución de tamaño de partícula de las emulsiones recién preparadas

Como los procesos de cremado y coalescencia están gobernados por la presencia de gotas de mayor tamaño, aunque estén presentes en pequeño porcentaje con respecto al número total [79], la distribución de tamaño de partícula en volumen es más adecuada para identificar a estas poblaciones. Por otro lado, la distribución en superficie se relaciona con el área total expuesta y es más sensible a las partículas pequeñas ya que para un mismo volumen total, poseen mayor área superficial total que las partículas más grandes.

En la **Figura 4.1** se muestran las distribuciones de tamaño de partícula en superficie y en volumen a tiempo inicial de las muestras  $E_L$ ,  $E_{H750}$  y  $E_{H1250}$ . Las distribuciones de las muestras  $E_{H1000}$  y  $E_{H1500}$  no se muestran, ya que son muy similares a las de la muestra  $E_{H1250}$ .



**Figura 4.1.** Distribuciones de tamaño de partícula de las muestras  $E_L$ ,  $E_{H750}$  y  $E_{H1250}$ .

El índice de refracción (IR) utilizado fue 1,47, que corresponde al del aceite de girasol. Este valor difiere de los utilizados para las células enteras y fragmentos de pared (IR 1,52) y para el contenido intracelular (IR 1,40). Por lo tanto, en las distribuciones de tamaño de partícula de las emulsiones, las poblaciones correspondientes a levadura pueden estar levemente desplazadas respecto de las analizadas en el capítulo anterior.

En las distribuciones de tamaño de partícula en volumen y en superficie de la muestra E<sub>L</sub>, se observa una población con una moda de 240 μm, que está asociada a las gotas de aceite y otra población con una moda de 6 μm, que correspondería a las células de levadura. La formación de emulsión en ausencia de emulsionantes libres se explica por la adsorción de las células de levadura en la interfase, que la estabilizarían por un efecto Pickering. Firoozmand y Rousseau [89] demostraron que este tipo de células pueden estabilizar emulsiones aceite en agua, en sistemas con porcentajes de aceite elevados (superiores al 60%). En emulsiones con menor proporción de aceite como las utilizadas en este trabajo, la estabilización no es tan eficiente aunque se logran formar algunas gotas de gran tamaño.

En la distribución de tamaño de partícula en volumen de la muestra E<sub>H750</sub>, la población que corresponde a las gotas de aceite tiene una moda de 20 μm pero está superpuesta con la población de las cápsulas de pared, dando una distribución monomodal con un sesgo hacia la izquierda. Sin embargo, se observa que la distribución en superficie es trimodal y en ella se diferencian una población correspondiente a gotas de aceite (de mayor tamaño), otra asociada principalmente a las cápsulas de pared y una tercera con partículas de menor tamaño, asociada a fragmentos de pared celular y contenido intracelular. No obstante, las dos poblaciones de menor tamaño también podrían contener pequeñas gotas de aceite.

En la distribución en volumen de la muestra E<sub>H1250</sub> (y en las otras dos emulsiones con levadura micronizada que no se muestran), se observan dos poblaciones; una de mayor tamaño de partícula (moda de 16 μm), que corresponde a las gotas de aceite y la

otra de menor tamaño de partícula (moda de 2  $\mu\text{m}$ ) que representa entre el 3 y el 5% del volumen total y correspondería a gotas de aceite de pequeño tamaño, aunque también podría incluir a fragmentos de pared celular que no se incorporaron en la emulsión. En la distribución en superficie se observan ambas poblaciones, aunque desfasadas hacia la izquierda, y con mayor proporción de partículas de menor tamaño (entre el 27 y el 30% de la superficie total), respecto de la distribución en volumen.

Numerosos trabajos han demostrado que las mananoproteínas liberadas de la pared celular tienen actividad emulsionante [18,69,113], así como los  $\beta$ -glucanos son buenos agentes estabilizantes de emulsiones [39,49,50]. Por otro lado, Salgado y col. [123] demostraron que los  $\beta$ -glucanos solubles también poseen cierta actividad interfacial. En la homogeneización de la dispersión de levadura a 750 bar, la dispersabilidad de proteínas, hidratos de carbono y fosfolípidos (**Figura 3.9**) debida a la liberación de las proteínas citoplasmáticas, parte de mananoproteínas y  $\beta$ -glucanos de pared celular y fosfolípidos de membranas, explican por qué la muestra  $E_{H750}$  tiene una población de gotas marcadamente más chica que las de la muestra  $E_L$ . Asimismo, el incremento en la dispersabilidad de dichos componentes en las dispersiones micronizadas explica el menor tamaño de gota de sus emulsiones respecto de la muestra  $E_{H750}$ . Adicionalmente, como se discutió en la **Sección 3.10**, las partículas insolubles podrían tener actividad interfacial, dando emulsiones con tamaños de gota menores que los de la muestra  $E_{H750}$ . Este tipo de comportamiento de las partículas insolubles fue descrito para complejos de proteínas y polisacáridos de leche y de soja [88,124].

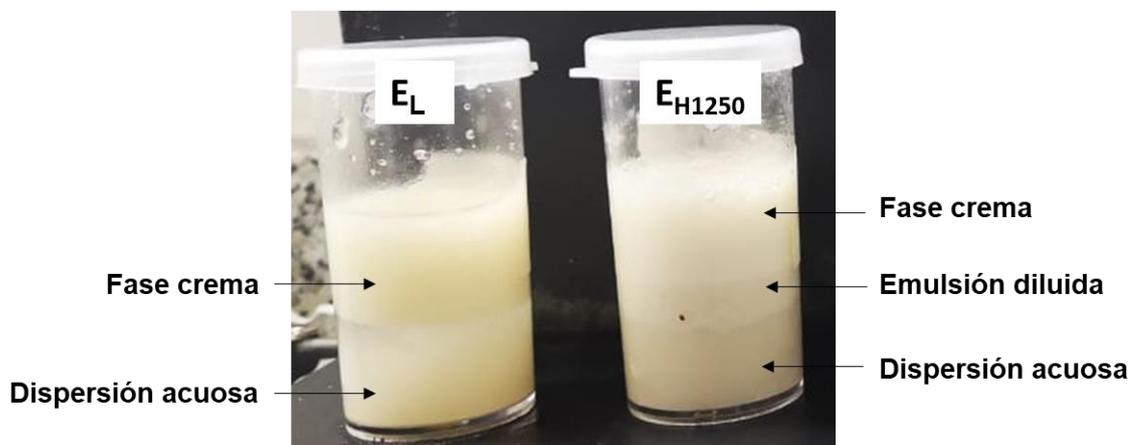
En las emulsiones preparadas con levadura micronizada, el tamaño de gota promedio inicial es comparable al de las emulsiones preparadas con proteínas de aislados de soja [107] y con lecitinas [125].

## 4.2. Estabilidad física de las emulsiones

Las emulsiones preparadas a partir de dispersiones de levadura (entera u homogeneizada), además de sufrir los procesos de desestabilización característicos de las emulsiones o/w, como cremado, floculación y/o coalescencia, pueden presentar sedimentación de las células, cápsulas o fragmentos de pared celular que no se incorporaron en la interfase.

Durante el almacenamiento de las muestras se observó a simple vista una rápida desestabilización por cremado. En la muestra  $E_L$ , se formaron dos fases, una superior rica en aceite (fase crema) y otra fase acuosa inferior con células de levadura sedimentadas. En cambio, en las emulsiones preparadas con levadura homogeneizada, se distinguieron 3 fases: una fase crema superior, una emulsión más diluida en el centro y una fase acuosa inferior, que presenta turbidez indicativa de la presencia de partículas insolubles en suspensión.

En la **Figura 4.2** se muestran a modo de ejemplo las fotografías de las emulsiones  $E_L$  y  $E_{H1250}$  almacenadas durante 24 horas.



**Figura 4.2.** Fotografía de las muestras  $E_L$  y  $E_{H1250}$  almacenadas 24 horas.

Para estudiar la estabilidad global de las emulsiones se determinaron los perfiles de %BS y %T con un analizador óptico vertical (Quick Scan). En la **Figura 4.3** se muestran los perfiles de la muestra  $E_L$ , medidos cada 10 minutos durante una hora. Se puede

observar el corrimiento de los perfiles de %BS de izquierda a derecha en la zona inferior del tubo, debido al cremado de las gotas, así como su disminución de arriba hacia abajo en la zona superior, que se debe al proceso de coalescencia [108,126]. Por otro lado, en la zona inferior del tubo, la aparición de un pico en la señal de %BS indica la sedimentación de células de levadura, mientras que la aparición de señal en los perfiles de %T se debe a la clarificación de la dispersión, la cual produce interferencia en los perfiles de %BS [127].

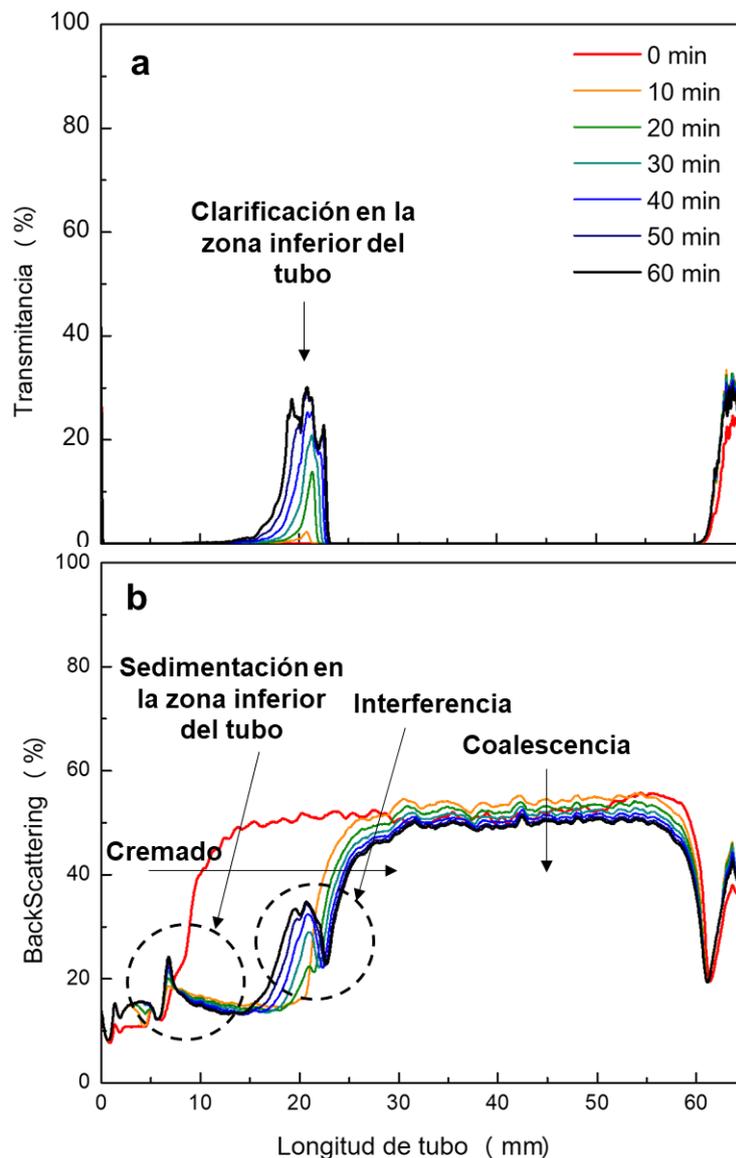
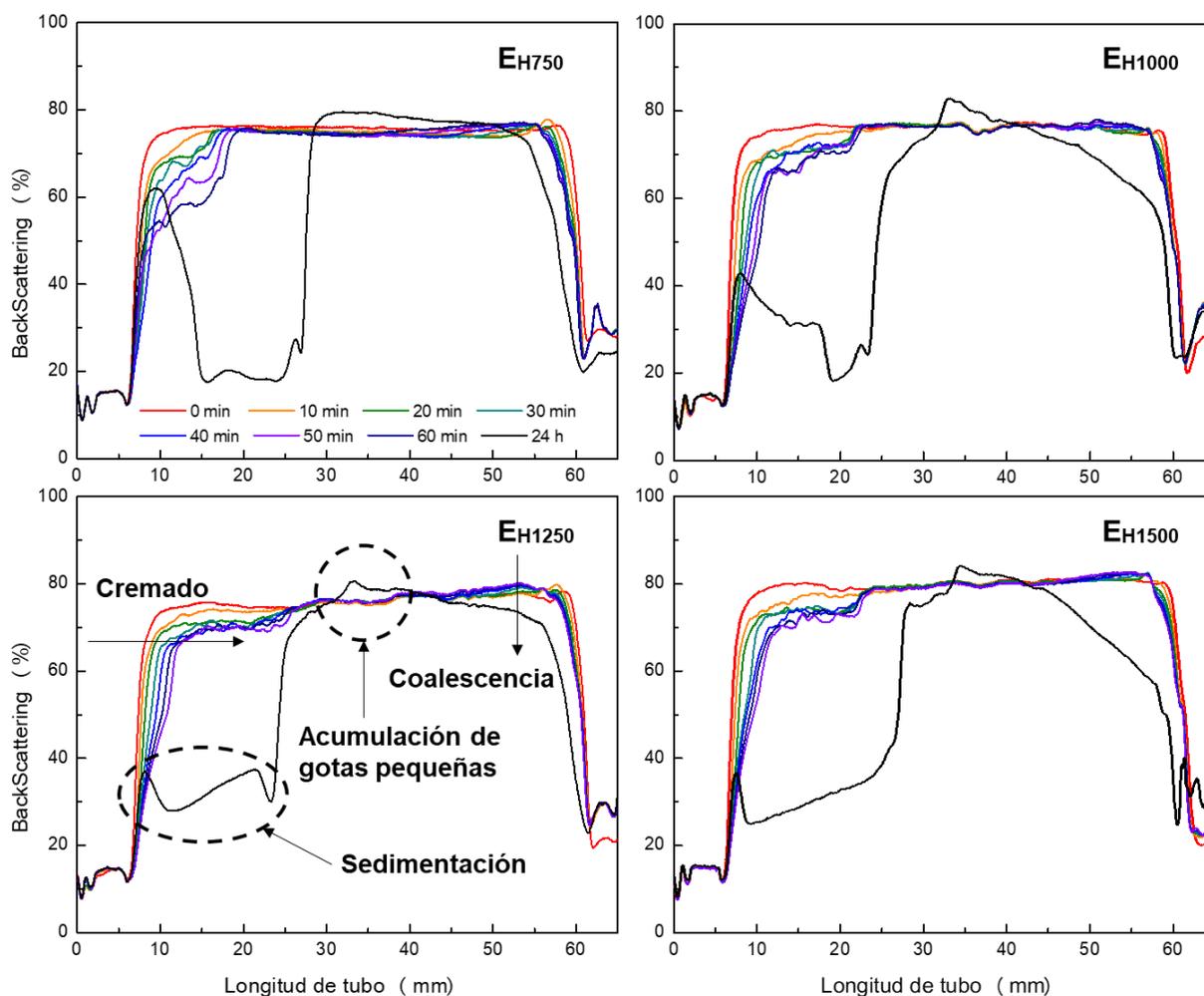


Figura 4.3. Perfil de a) %T y b) %BS en función del tiempo de la muestra E<sub>L</sub>.

En la **Figura 4.4** se muestran los perfiles de %BS de las emulsiones  $E_{H750}$ ,  $E_{H1000}$ ,  $E_{H1250}$  y  $E_{H1500}$  durante 24 horas. Los perfiles de %T no se muestran porque solamente en las muestras  $E_{H750}$  y  $E_{H1000}$  se observó la aparición de un pequeño pico en la zona baja del tubo a las 24 horas de almacenamiento.



**Figura 4.4.** Perfil %BS en función del tiempo de las muestras  $E_{H750}$ ,  $E_{H1000}$ ,  $E_{H1250}$  y  $E_{H1500}$ .

En los perfiles de %BS de las emulsiones preparadas con levadura homogeneizada se identificaron los mismos procesos de desestabilización que en la muestra  $E_L$ : sedimentación, cremado y coalescencia. Sin embargo, se puede observar que estos

procesos ocurren a menor velocidad. A continuación se analizará cada uno de ellos con mayor detalle.

#### **4.2.1. Sedimentación**

A partir de los cuatro perfiles de %BS (**Figura 4.4**), se corrobora que todas las emulsiones sedimentan a las 24 horas, aunque en la muestra  $E_{H750}$  el sedimento tiene menor volumen (menor ancho del pico) pero mayor concentración de partículas (mayor intensidad) respecto de las emulsiones preparadas con levadura micronizada. Estos resultados concuerdan con los perfiles de %BS de las dispersiones, discutidos en el **Capítulo 3**; las cápsulas de pared al ser de mayor tamaño y estar menos hidratadas que los fragmentos micronizados, forman un sedimento más compacto.

Por otro lado, la turbidez que se observa a simple vista en la fase acuosa inferior de la muestra  $E_{H1250}$  (**Figura 4.2**) sumado a la evidencia en los perfiles de %BS de esta muestra (**Figura 4.4**), demuestran que gran parte de las partículas micronizadas presentes inicialmente en la emulsión sedimentan. Como las partículas micronizadas tienen una elevada CRA (**Sección 3.9**) su sedimentación disminuye la hidratación y viscosidad de la fase continua, favoreciendo a los demás procesos de desestabilización. Por otro lado, la rápida sedimentación sugiere que las partículas micronizadas poseen poca o nula capacidad para adsorberse o permanecer en la interfase y se encontraban la mayor parte de ellas, suspendidas en la fase acuosa que rodeaba a las gotas de aceite.

#### **4.2.2. Cremado**

El cremado es un proceso de separación gravitacional en el cual las gotas de aceite ascienden a la superficie de la emulsión. Se observa en la **Figura 4.4** que este proceso comienza en los primeros minutos y la fase crema alcanza su volumen máximo alrededor de las 24 horas de almacenamiento. En la fase crema de las emulsiones preparadas con levadura micronizada ( $E_{H1000}$ ,  $E_{H1250}$  y  $E_{H1500}$ ), la señal de %BS muestra un pico con mayor

intensidad que se atribuye a la acumulación de gotas de pequeño tamaño con una menor velocidad de cremado. Estos resultados confirman que la población de partículas pequeñas observadas en la **Figura 4.1** de la muestra  $E_{H1250}$ , corresponde en parte a partículas de levadura micronizadas, pero también incluye gotas pequeñas de aceite. La presencia de estas gotas puede favorecer la estabilidad de la emulsión debido a que disminuye la velocidad de cremado de las gotas más grandes [79].

En la **Tabla 4.1** se muestran los porcentajes de fase crema a las 24 horas, que se calcularon a partir del ancho del perfil de %BS a las 24 horas respecto del ancho del perfil de %BS a tiempo inicial. Como el ancho de los perfiles depende del %BS al cual se mide, se promediaron los datos obtenidos a tres valores de %BS: 80, 85 y 90 % respecto del %BS inicial. Se observa que al aumentar la presión de homogeneización de las dispersiones de 750 a 1250 bar, hay una tendencia a aumentar el porcentaje de fase crema, aunque solamente la muestra  $E_{H1250}$  es significativamente diferente al resto. El volumen de la fase crema depende de la cantidad de aceite que contiene y de la hidratación de las lamelas que rodean a las gotas. Debido a la rápida velocidad de desestabilización, luego de 24 horas de almacenamiento se espera que la totalidad del aceite haya cremado en todas las emulsiones, por lo tanto, la diferencia en los volúmenes de las fases crema está determinada únicamente por su hidratación. Como se discutió en la **Sección 3.9**, la micronización de las partículas aumenta su capacidad para retener agua, y esto conduciría a la formación de una fase crema más hidratada al aumentar la presión de homogeneización. Sin embargo, en la muestra  $E_{H1500}$ , a pesar de que las partículas de la dispersión  $H_{1500}$  tienen mayor capacidad de retención de agua que el resto, la fase crema tiene menor volumen. Este resultado se puede explicar por la alta tendencia a la agregación de sus partículas (**Sección 3.10**), que podría generar que las gotas interactúen más fuertemente entre sí, formando una fase crema más compacta.

**Tabla 4.1.** Porcentaje de fase crema a las 24 h de las muestras E<sub>H750</sub>, E<sub>H1000</sub>, E<sub>H1250</sub> y E<sub>H1500</sub>.

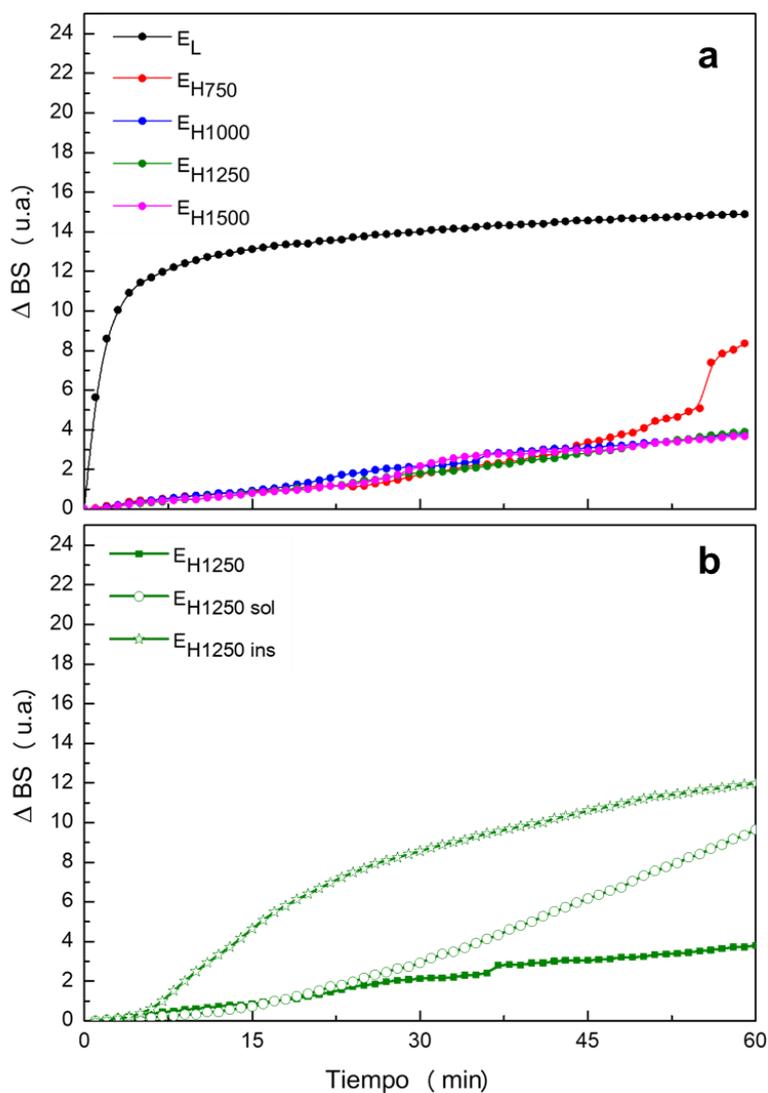
Muestra	% Fase crema
E <sub>H750</sub>	54,5 ± 2,2 <sup>a</sup>
E <sub>H1000</sub>	57,0 ± 2,3 <sup>a</sup>
E <sub>H1250</sub>	65,8 ± 2,5 <sup>b</sup>
E <sub>H1500</sub>	54,2 ± 2,0 <sup>a</sup>

Valores con diferentes letras son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

Para comparar cuantitativamente la velocidad de cremado, se determinó la cinética de este proceso a partir del corrimiento de izquierda a derecha en la zona inferior del tubo en función del tiempo. En la **Figura 4.5a** se puede observar que la emulsión E<sub>L</sub> tiene una velocidad de cremado muy alta en comparación con las emulsiones preparadas con levadura homogeneizada, debido al mayor tamaño de sus gotas. En la muestra E<sub>H750</sub>, aunque las células de levadura no están micronizadas, la velocidad de cremado es similar a la de las muestras E<sub>H1000</sub>, E<sub>H1250</sub> y E<sub>H1500</sub> durante los primeros 45 minutos, aunque luego aumenta rápidamente. A partir de estos resultados se confirma que al aumentar la dispersabilidad de componentes con buena actividad interfacial como mananoproteínas, proteínas citoplasmáticas y fosfolípidos [18,51] y de  $\beta$ -glucanos que además de tener cierta actividad interfacial forman redes débiles que reducen la movilidad de las gotas, la estabilidad de las emulsiones frente al cremado mejora [39,48,49,123].

En la **Figura 4.5b** se muestran las cinéticas de cremado de las emulsiones preparadas con la fracción soluble y con la fracción insoluble (sedimentos unificados) de la muestra H<sub>1250</sub> (E<sub>H1250sol</sub> y E<sub>H1250ins</sub>, respectivamente) y con la dispersión completa (E<sub>H1250</sub>). Las tres emulsiones se prepararon con la misma concentración de levadura en la fase continua (2,5% b.s). Se puede corroborar que la muestra preparada con la fracción insoluble, rica en  $\beta$ -glucanos pero con un reducido porcentaje de proteínas y fosfolípidos (**Sección 3.8.3**), posee una mayor velocidad de cremado, mientras que la emulsión preparada con la fracción soluble, rica en proteínas citoplasmáticas y mananoproteínas, es

relativamente estable durante los primeros 30 minutos, pero luego crema rápidamente. Por otro lado, la emulsión preparada con la dispersión completa fue la más estable durante el tiempo estudiado, demostrando el efecto sinérgico entre los componentes con buena actividad tensioactiva (mananoproteínas, proteínas citoplasmáticas y fosfolípidos) y con capacidad estabilizante ( $\beta$ -glucanos) [18,39,49,51].



**Figura 4.5.** Cinética de cremado de las muestras a)  $E_L$ ,  $E_{H750}$ ,  $E_{H1000}$ ,  $E_{H1250}$  y  $E_{H1500}$ , b)  $E_{H1250}$ ,  $E_{H1250sol}$  y  $E_{H1250ins}$ .

### 4.2.3. Coalescencia y floculación

La coalescencia es el proceso en el cual las gotas de aceite se unen de manera irreversible, formando gotas de mayor tamaño. Se diferencia del proceso de floculación, en que en este último, las gotas se agrupan de manera reversible, pero sin perder su individualidad. En ambos casos, el tamaño de partícula aumenta durante el almacenamiento. Para diferenciar ambos procesos se determinó el tamaño de partícula antes y después del almacenamiento, con y sin el agregado de dodecil sulfato de sodio (SDS), que es una sustancia tensioactiva que separa las gotas unidas en un flóculo [108]. En todas las emulsiones se observó un aumento de tamaño durante el almacenamiento, pero en ninguna de ellas se encontraron diferencias significativas en las muestras medidas con y sin SDS. Con estos resultados se descarta la formación de flóculos estables y se puede atribuir el aumento de tamaño de partícula únicamente al proceso de coalescencia. Por otro lado, este proceso también puede evidenciarse como el descenso de la señal de %BS en la zona superior del tubo (**Figura 4.4**). A partir de estos dos métodos se calcularon y compararon los porcentajes de coalescencia (**Tabla 4.2**). En el primer caso se calculó el porcentaje de incremento del  $D_{4,3}$  durante del almacenamiento (con SDS) y en el segundo caso, se calculó el porcentaje de disminución de la señal de %BS en la zona superior del tubo, respecto del valor inicial.

**Tabla 4.2.** Porcentaje de coalescencia determinado a partir del  $D_{4,3}$  y del %BS de las muestras  $E_{H750}$ ,  $E_{H1000}$ ,  $E_{H1250}$  y  $E_{H1500}$ .

Muestra	$\frac{\Delta D_{4,3}}{D_{4,3 \text{ inicial}}} \cdot 100$	$\frac{\Delta BS}{\%BS_0} \cdot 100$
$E_{H750}$	$16,4 \pm 0,3^a$	2
$E_{H1000}$	$27,9 \pm 0,2^b$	15
$E_{H1250}$	$22,3 \pm 0,3^c$	6
$E_{H1500}$	$27,2 \pm 0,1^d$	13

Valores con diferentes letras en cada parámetro son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

A partir de ambos métodos se obtuvieron resultados comparables. A pesar de que la muestra  $E_{H750}$  presentó un tamaño de gota inicial mayor al de las emulsiones con levadura micronizada, el tamaño de las gotas luego del almacenamiento fue similar en las cuatro emulsiones, dando como resultado una menor variación de tamaño para la muestra  $E_{H750}$ , que se traduce como un menor porcentaje de coalescencia. Esto puede deberse a que en las muestras  $E_{H1000}$ ,  $E_{H1250}$  y  $E_{H1500}$ , parte de las partículas micronizadas que inicialmente aumentaban la viscosidad de la fase acuosa de la emulsión sedimentan, quedando principalmente en la fase acuosa retenida entre las gotas, los componentes solubles y dispersables. Por tal motivo, las cuatro emulsiones tendrían tamaños de gotas similares luego del almacenamiento.

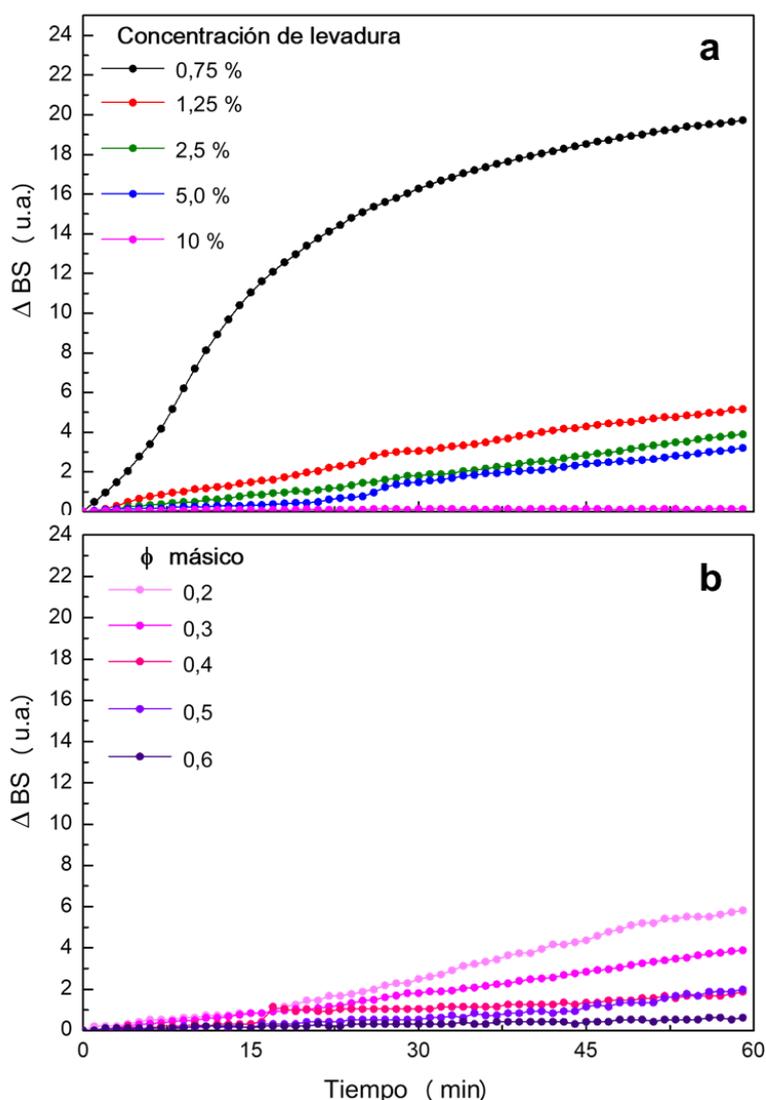
Por otro lado, entre las emulsiones con levadura micronizada, la muestra  $E_{H1250}$  fue la más estable frente a la coalescencia. Este resultado puede deberse a que la película interfacial, más hidratada que la de las demás emulsiones con levadura micronizada, disminuiría la probabilidad de unión de gotas de aceite vecinas.

#### **4.3. Efecto de la concentración de aceite y de levadura en la estabilidad de emulsiones.**

Otro factor que influye en la estabilidad de emulsiones es la concentración de aceite y de levadura, como se observa en la **Figura 4.6**. Las emulsiones fueron preparadas con la dispersión  $H_{1250}$ , variando la concentración de levadura o de aceite y manteniendo constantes el resto de las variables. En las emulsiones con diferente  $\phi_m$  la concentración de levadura en la fase acuosa fue de 2,5% b.s., mientras que en las emulsiones con diferente concentración de levadura, el  $\phi_m$  fue de 0,3.

Se puede observar que el aumento de la concentración de levadura tiene un efecto positivo en la estabilidad, debido a que al aumentar la cantidad de moléculas con actividad interfacial, es posible crear mayor área interfacial. Además, al aumentar la cantidad de partículas insolubles, ricas en  $\beta$ -glucanos y mananoproteínas con alta capacidad de

retención de agua, aumenta la viscosidad de la fase continua, lo cual contribuye a la estabilidad cinética de la emulsión. Asimismo, la concentración de aceite también aumenta progresivamente la estabilidad debido a que, al haber mayor cantidad de gotas, disminuye su movilidad [79]. Por otro lado, el aumento en la concentración de aceite y de levadura, incide en otros aspectos como el valor energético (principalmente en el caso del aceite) o el sabor, siendo limitantes en la formulación de alimentos.



**Figura 4.6.** Cinética de cremado de a) muestras con diferentes concentraciones de levadura y b) diferentes  $\phi_m$ .

#### 4.4. Resumen de resultados y conclusiones parciales

- La levadura homogeneizada contiene componentes solubles con propiedades emulsionantes que reducen el tamaño de gota entre 12 y 15 veces respecto de la levadura entera.
- Las partículas micronizadas de las muestras H<sub>1000</sub>, H<sub>1250</sub> y H<sub>1500</sub>, ricas en β-glucanos y mananoproteínas insolubles, tienen elevada capacidad de retención de agua y aumentan la viscosidad de la fase acuosa, contribuyendo a la estabilidad de la emulsión. Sin embargo, en todas las emulsiones preparadas con levadura homogeneizada, las partículas insolubles sedimentaron durante el almacenamiento.
- La muestra E<sub>H750</sub> fue más estable frente a la coalescencia, pero menos estable al cremado en comparación con las emulsiones preparadas con levadura micronizada.
- La emulsión E<sub>H1250</sub> tuvo una estabilidad frente al cremado similar al del resto de las emulsiones preparadas con dispersiones de levadura micronizadas, pero presentó una fase crema más hidratada y estable frente a la coalescencia respecto del resto de estas emulsiones.
- Las fracciones soluble e insoluble de la muestra H<sub>1250</sub> formaron individualmente emulsiones con menor estabilidad que la preparada con ambas fracciones juntas, demostrando el efecto sinérgico entre los componentes de ambas fracciones.
- La estabilidad de las emulsiones es proporcional a la concentración de aceite y de levadura. Además, estos parámetros modifican otras características de las emulsiones como su valor energético y sabor.

# **CAPÍTULO 5**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **EFFECTO COMBINADO DE**

### **TRATAMIENTO TÉRMICO Y**

### **HOMOGENEIZACIÓN A**

### **ALTA PRESIÓN**

## CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN. EFECTO COMBINADO DE TRATAMIENTO TÉRMICO Y HOMOGENEIZACIÓN A ALTA PRESIÓN

Como se analizó en el **Capítulo 3**, la homogeneización a alta presión de la levadura produce la micronización de la pared celular y la liberación del contenido intracelular. En el **Capítulo 4** se pudo demostrar que estos componentes liberados poseen propiedades emulsionantes y estabilizantes. Sin embargo, las dispersiones obtenidas contienen muchas enzimas activas, generando modificaciones no favorables, como cambios de pH, degradación de compuestos y aparición de olores desagradables (**Sección 3.4**).

El tratamiento térmico necesario para inactivar estas enzimas también conduce a otros cambios como la desnaturalización y agregación de otras proteínas [84], la hidratación y despliegue de  $\beta$ -glucanos y la solubilización de mananoproteínas de pared celular [39,48,52,128,129], modificando las propiedades de las levaduras. En este capítulo se estudió el efecto del tratamiento térmico y de la homogeneización a alta presión combinados de distintas maneras, sobre las propiedades de las dispersiones de levadura.

### 5.1. Tratamientos de las muestras

Según los resultados obtenidos en el **Capítulo 3**, en este capítulo se trabajó a una presión de 1250 bar para asegurar la micronización de las células sin producir un calentamiento excesivo de la muestra en el homogeneizador, que podría provocar la coagulación de proteínas y posible obturación del equipo. Por otro lado, en base a los termogramas DSC de desnaturalización de dispersiones de levaduras (**Sección 3.3**), la temperatura de calentamiento que se debe alcanzar para lograr la desnaturalización completa de las proteínas y por ende, la inactivación de todas las enzimas es 90 °C. Por este motivo el tratamiento térmico se llevó a cabo a dicha temperatura durante 25 minutos.

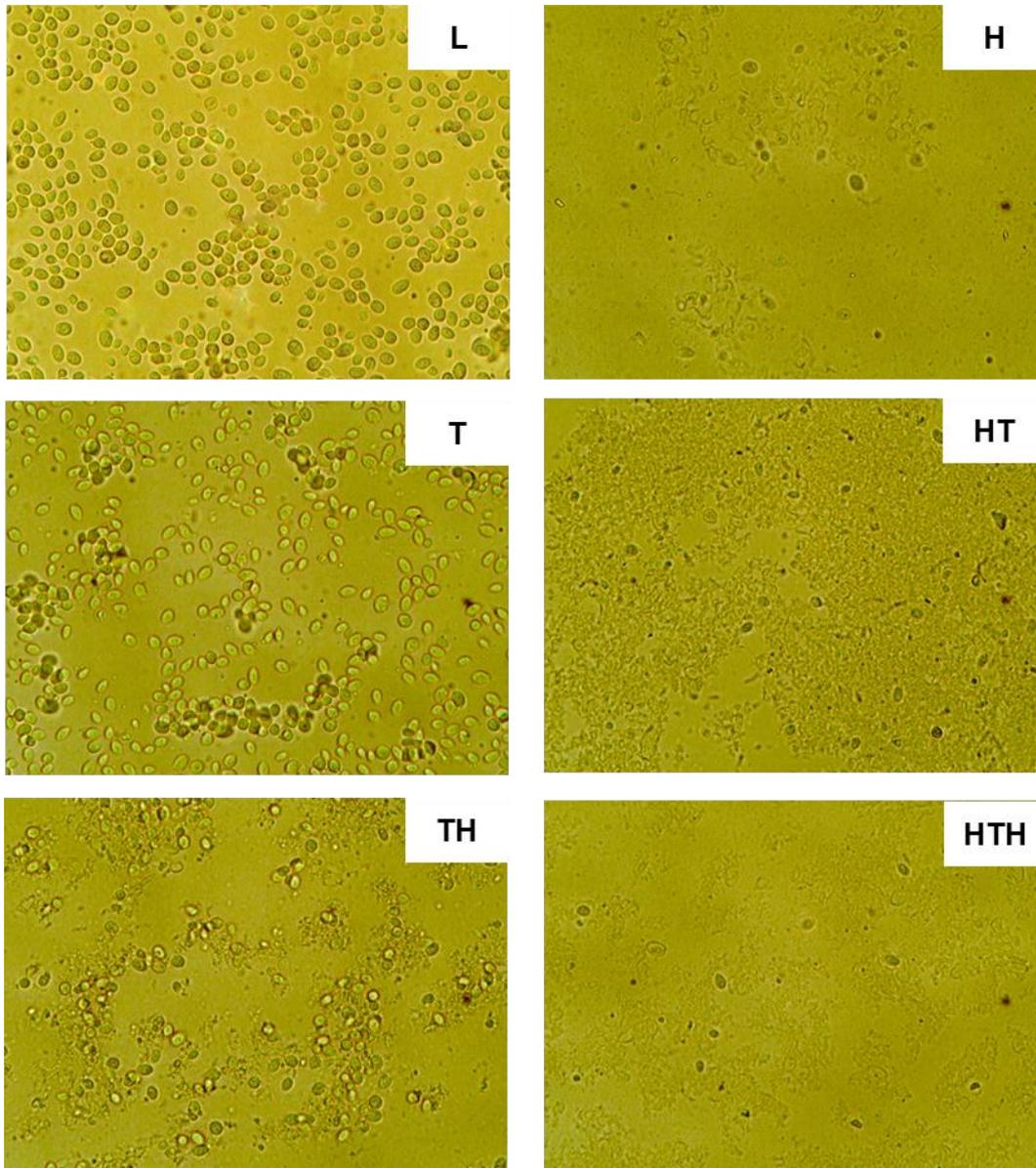
Cuando se sometió a la dispersión de levadura homogeneizada al tratamiento térmico a 90 °C (muestra HT), se observó a simple vista el aumento de la viscosidad, que da idea de la formación de agregados con una estructura tridimensional tipo gel. Este comportamiento no se observó en la dispersión tratada térmicamente sin homogeneización previa (muestra T) ni tampoco en la dispersión primero calentada y luego homogeneizada (muestra TH). Por otro lado, la homogeneización posterior a la formación de la estructura tipo gel disminuyó notablemente la viscosidad de la muestra (muestra HTH). Estos resultados preliminares dan una idea de que la combinación de tratamiento térmico y homogeneización es capaz de generar diferentes cambios estructurales y funcionales en las dispersiones obtenidas.

En este capítulo, las muestras L y H (llamada H<sub>1250</sub> en los capítulos anteriores), que fueron analizadas en el **Capítulo 3**, se utilizarán como controles de las muestras con tratamientos térmicos y de homogeneización combinados.

## **5.2. Análisis de las dispersiones con microscopio óptico**

En la **Figura 5.1** se muestran las micrografías ópticas de las dispersiones con distintos tratamientos. La muestra con tratamiento térmico (T), forma algunos agregados y a pesar de que no posee células viables, no se observan diferencias en cuanto a la forma y tamaño de las células respecto de la muestra L. Tampoco se observan fragmentos micronizados. La homogeneización posterior al tratamiento térmico (TH), rompe los agregados celulares y gran parte de las cápsulas de pared. Sin embargo, la cantidad de cápsulas con la forma original es considerablemente mayor a la encontrada en la muestra homogeneizada sin tratamiento térmico previo (H). Esto sugeriría que el tratamiento térmico aumenta la resistencia de las células frente a la homogeneización. Por otro lado, en la muestra que tuvo un tratamiento térmico luego de la homogeneización (HT), se observa la presencia de agregados cuya formación se atribuye a la coagulación térmica de las proteínas y al desplegamiento de los  $\beta$ -glucanos [129]. Al homogeneizar nuevamente

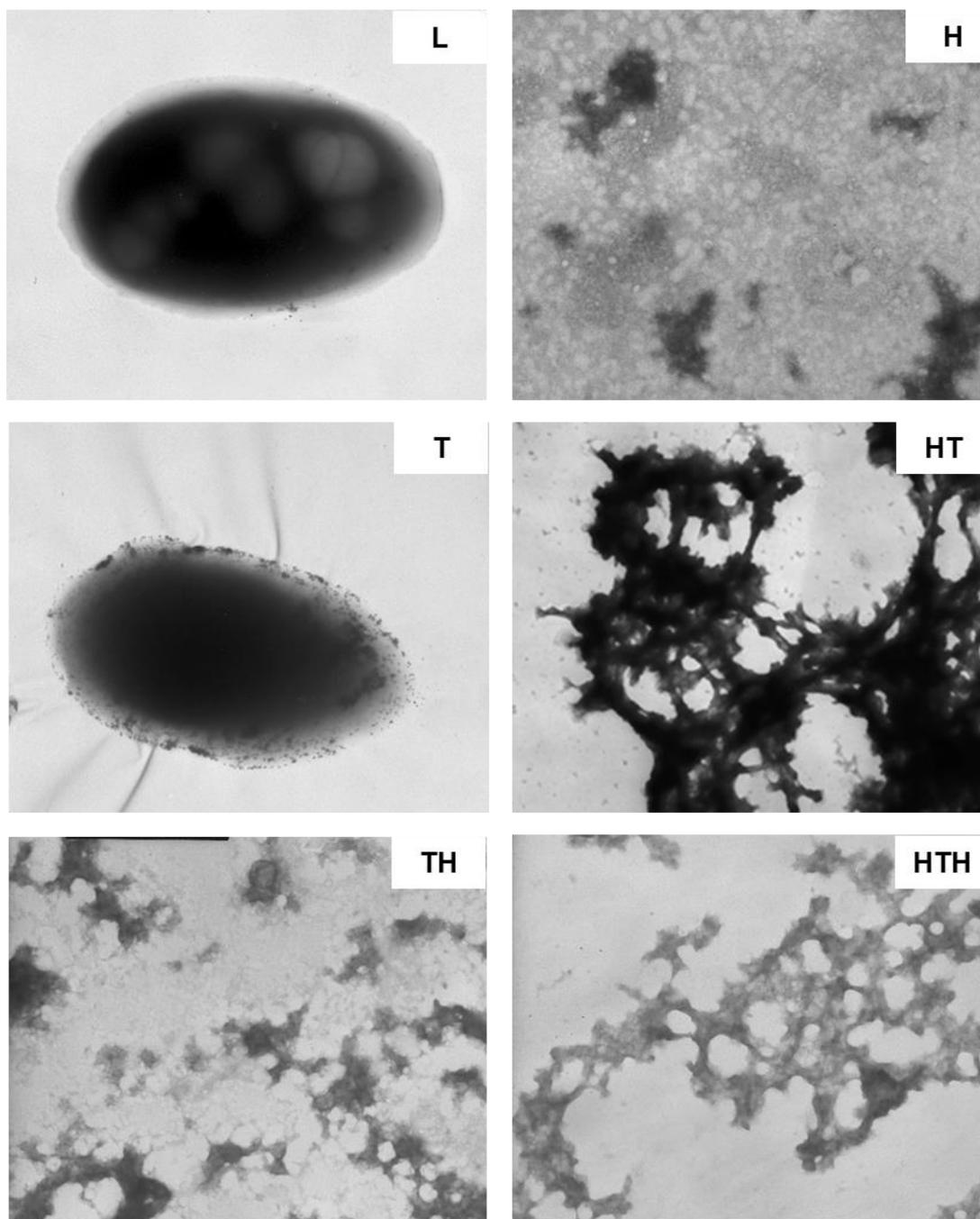
esta muestra (HTH), también se observan agregados, pero de menor tamaño que en la muestra HT.



**Figura 5.1.** Micrografías ópticas de las muestras L, H, HT, HTH, T y TH (x1000).

### 5.3. Análisis de las dispersiones por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En la **Figura 5.2** se comparan las micrografías realizadas con un microscopio electrónico de transmisión.



**Figura 5.2.** Micrografías TEM de las muestras L, H, HT, HTH, T y TH (x35000).

En la muestra L se muestra una célula de levadura entera, en la que se distinguen las organelas y la pared celular en una coloración más clara que el resto. En la muestra T, también se observa una célula, pero en el interior no se diferencian las estructuras internas, lo cual se atribuye a la coagulación de las proteínas del núcleo y de las organelas. Mientras que, en la pared celular, debido a la agregación térmica de las

mananoproteínas, se detectan numerosos agregados que serían los responsables de aumentar la resistencia de las células frente a la homogeneización. En las muestras H y TH se puede observar el contenido intracelular en un color más claro y restos de pared celular en color más oscuro. En los campos observados, no hay presencia de cápsulas enteras.

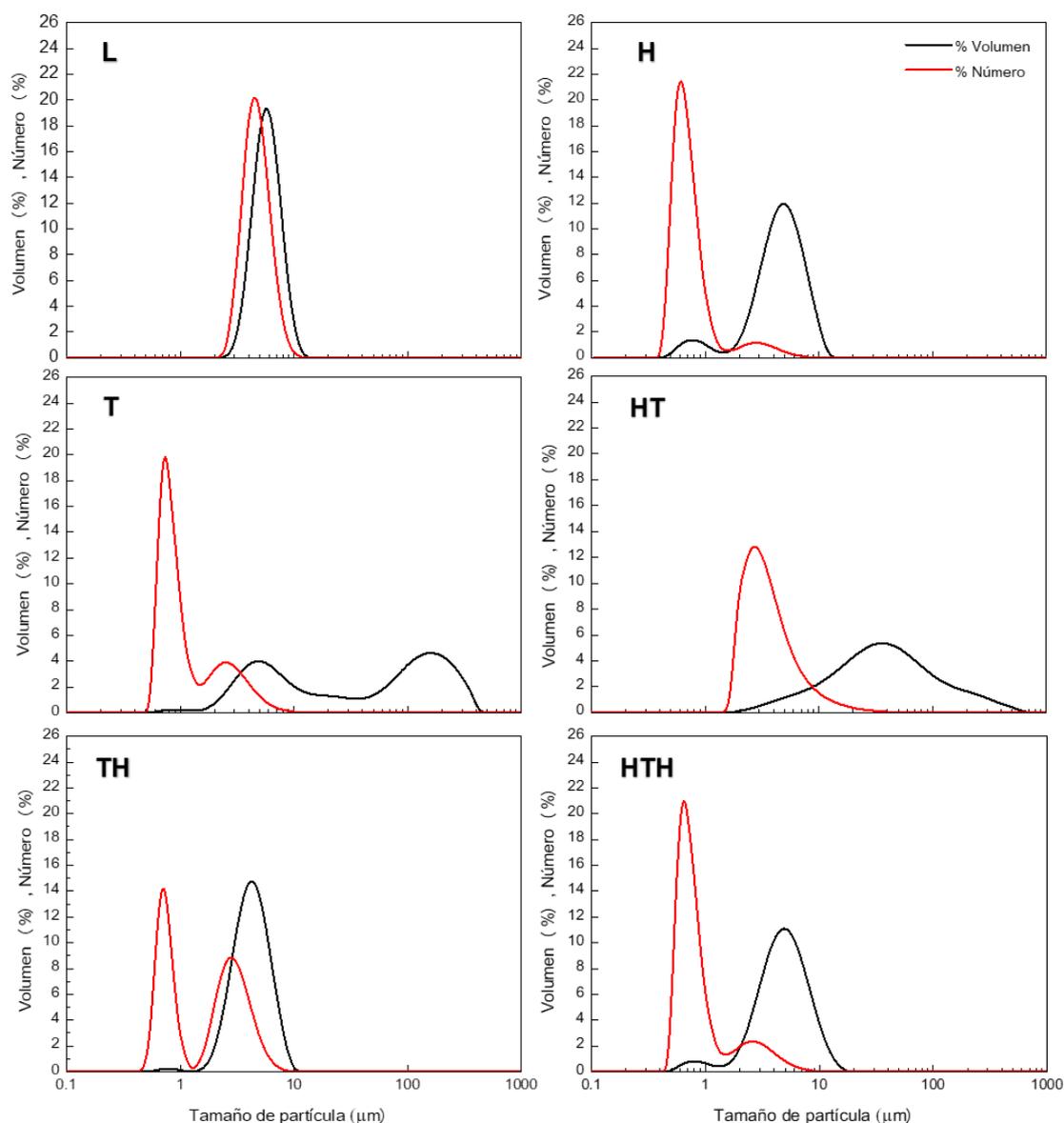
Por otro lado, en la muestra HT se observan los agregados que se formaron durante el tratamiento térmico, a partir de las proteínas citoplasmáticas, las mananoproteínas y los  $\beta$ -glucanos liberados durante la homogeneización. Como se describió anteriormente esta muestra tiene una viscosidad mucho más elevada que la del resto, que se explicaría por la retención de agua dentro de estas estructuras tridimensionales. En esta muestra también se observa la presencia de partículas de tamaño muy pequeño que quedan dispersas en la fase acuosa. En la muestra HTH, también se observan agregados en forma de red, pero son más pequeños y menos compactos, como consecuencia de la homogeneización [130].

#### **5.4. Distribución de tamaño de partícula**

En la **Figura 5.3** se observan las distribuciones de tamaño de partícula en volumen y en número de las muestras. Para poder cuantificar la cantidad de fragmentos de pared y de cápsulas enteras, las determinaciones se realizaron con un índice de refracción (IR) de 1,52.

La distribución en volumen de la muestra T es trimodal. La población de partículas con una moda de 0,8  $\mu\text{m}$  representa solo el 1,3% del total, pero corresponde al 72,4% de las partículas totales, como se puede observar en la distribución en número. Estas partículas serían fragmentos de pared celular que se desprenden por el tratamiento térmico. La segunda población de la distribución en volumen, que tiene una moda de 5  $\mu\text{m}$ , correspondería principalmente a cápsulas que mantienen su forma original, como se pudo corroborar en las micrografías ópticas. La distribución en número de esta población tiene

una moda de 2,5  $\mu\text{m}$ , que es menor al valor correspondiente a la muestra L (moda de 4,3  $\mu\text{m}$ ). Este resultado sugiere que, además de las células, hay partículas de un tamaño menor que podrían ser pequeños agregados formados a partir de las proteínas de pared y  $\beta$ -glucanos liberados durante el tratamiento térmico. La tercera población, solo se puede visualizar en la distribución en volumen y a pesar de que representa el 50% del total, corresponde a agregados celulares de gran tamaño (200  $\mu\text{m}$ ), que están en baja proporción.



**Figura 5.3.** Distribución de tamaño de partícula en volumen y en número de las muestras L, H, HT, HTH, T y TH.

En las distribuciones en volumen y en número de la muestra TH se observan solo dos poblaciones. La población de partículas micronizadas ( $0,8 \mu\text{m}$ ), corresponde solamente al 0,9% respecto del volumen total, pero representa el 45,7% de la distribución en número. Por otro lado, la cuantificación de las partículas de aproximadamente  $5 \mu\text{m}$  arrojó un valor de 54,3%, que es casi 7 veces mayor a la cantidad de partículas del mismo tamaño en la muestra H. Estos resultados confirman que el tratamiento térmico previo a la homogeneización aumenta la resistencia de las células a la micronización, debido a la formación de agregados en la pared celular que se discutió en la **Sección 5.3**.

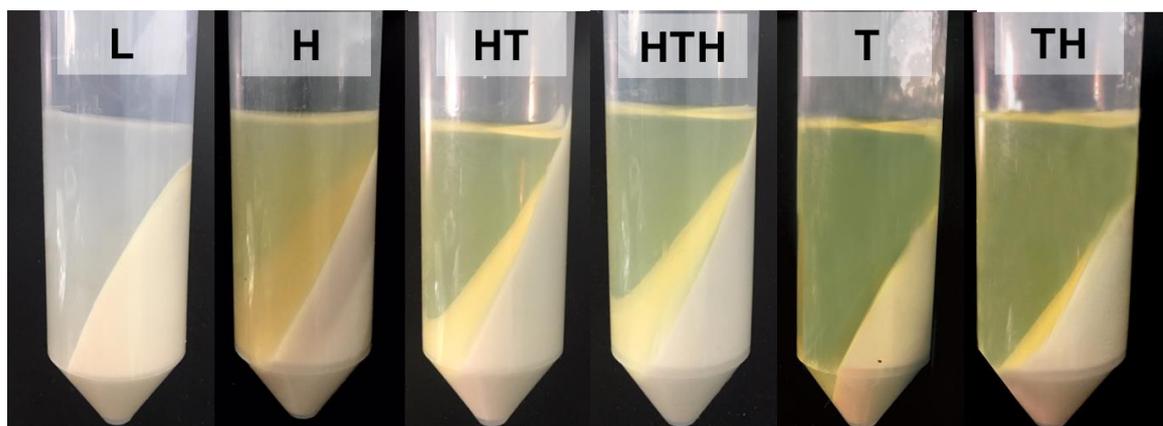
En la muestra HT, se puede calcular a partir de la distribución en número, que el 80% de las partículas tienen un tamaño entre  $1,9$  y  $6,7 \mu\text{m}$ , que corresponderían a pequeños agregados, fragmentos celulares y a algunas cápsulas sin micronizar. Por otro lado, la distribución en volumen muestra la presencia de agregados de mayor tamaño, de los cuales el 80% de ellos tienen un diámetro entre  $8$  y  $150 \mu\text{m}$ .

Por otro lado, en la distribución en número de la muestra HTH, el 82,3% de las partículas tienen un tamaño aproximado entre  $0,6$  y  $1,0 \mu\text{m}$ . La segunda población tiene un tamaño también pequeño, con partículas con tamaños promedio menores a  $4 \mu\text{m}$ . En la distribución en volumen se evidencia que los agregados son pequeños, con diámetros inferiores a  $12 \mu\text{m}$ .

### **5.5. Separación de sedimentos y sobrenadante por centrifugación.**

De igual manera que se procedió con las dispersiones homogeneizadas en el **Capítulo 3**, las dispersiones obtenidas luego de tratamientos combinados y sus controles, se sometieron a una centrifugación a fin de separar las fracciones que quedan insolubles de aquellas dispersables y/o solubles. En la **Figura 5.4** se observan los tubos de las muestras L, H, HT, HTH, T y TH luego de ser centrifugados. El sedimento de la muestra H, presenta dos capas de diferentes tonalidades, que como se discutió en el **Capítulo 3**, corresponden a partículas de diferentes tamaños, composición y grado de hidratación, que

sedimentan a velocidades diferentes. En cambio, en las muestras que fueron sometidas a un tratamiento térmico (independientemente del orden del tratamiento), el sedimento tiene una coloración homogénea, similar al de la muestra L, indicando que las proteínas y los polisacáridos estarían formando agregados con una densidad uniforme. Se observa además que las muestras T y TH tienen un volumen menor de sedimento que refleja la menor capacidad de retención de agua de estas muestras.



**Figura 5.4.** Fotografía de las muestras centrifugadas L, H, HT, HTH, T y TH.

En relación con los sobrenadantes, a simple vista se observa que todas las muestras que tuvieron algún tratamiento presentan un sobrenadante con una tonalidad amarillenta y levemente turbio, indicando la presencia de componentes solubles y dispersos. Para determinar la turbidez y la presencia de proteínas, se determinó la absorbancia a 550 nm y 280 nm, respectivamente.

#### 5.6. Determinación de absorbancia a 280 nm y a 550 nm.

En la **Tabla 5.1** se muestran los valores de absorbancia a 550 nm de las muestras y de sus sobrenadantes, que es proporcional a la turbidez de las dispersiones.

**Tabla 5.1.** Valores de absorbancia a 550 nm (turbidez) de las dispersiones y sobrenadantes, y de absorbancia a 280 nm de los sobrenadantes de las muestras L, H, HT, HTH, T y TH.

Muestra	Dispersiones*	Sobrenadantes**	
	550 nm	550 nm	280nm
L	0,600 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,000 ± 0,000 <sup>a</sup>	0,026 ± 0,005 <sup>a</sup>
H	0,185 ± 0,000 <sup>b</sup>	0,026 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,507 ± 0,010 <sup>b</sup>
HT	0,303 ± 0,033 <sup>c</sup>	0,006 ± 0,001 <sup>cd</sup>	0,298 ± 0,005 <sup>c</sup>
HTH	0,356 ± 0,000 <sup>c</sup>	0,006 ± 0,001 <sup>cd</sup>	0,280 ± 0,005 <sup>ce</sup>
T	0,470 ± 0,002 <sup>d</sup>	0,003 ± 0,001 <sup>c</sup>	0,194 ± 0,003 <sup>d</sup>
TH	0,565 ± 0,014 <sup>a</sup>	0,008 ± 0,001 <sup>d</sup>	0,233 ± 0,014 <sup>de</sup>

\*Factor de dilución 1/600

\*\*Factor de dilución 1/150.

Valores con diferentes letras en cada parámetro son significativamente diferentes (p<0,05)

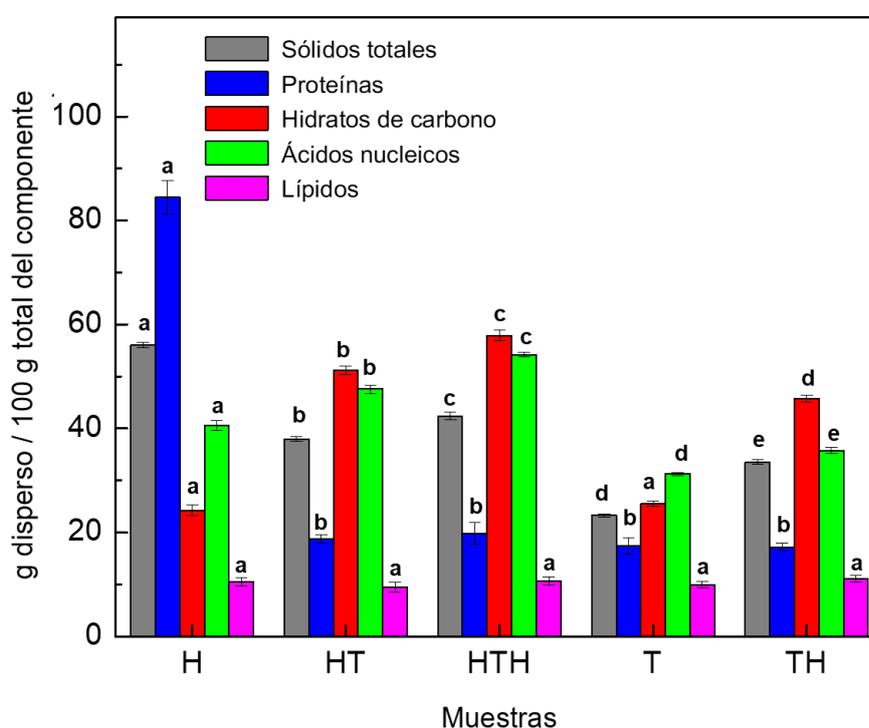
Como se discutió en el **capítulo 3**, la homogeneización de células viables disminuye la turbidez de las dispersiones, debido a la disminución de la concentración volumétrica de la fase dispersa. Sin embargo, cuando la homogeneización se realiza sobre una muestra previamente tratada térmicamente, la turbidez aumenta, como puede observarse al comparar las muestras T y TH. Este resultado se debe a que el proceso de homogeneización libera a los coágulos proteicos formados dentro de la célula durante el tratamiento térmico. Por otro lado, cuando los agregados se forman fuera de la célula, como ocurre en la muestra HT, la turbidez también aumenta, pero en menor medida que en la muestra TH. A partir de este resultado se infiere que los coágulos formados dentro de la célula, al estar confinados a un espacio reducido, son más compactos que aquellos formados fuera de ella. Por último, la homogeneización de la muestra HT (muestra HTH), reduce el tamaño de los coágulos, como se pudo observar en la **Figura 5.2**, pero no aumenta significativamente la turbidez respecto de HT. En relación con los sobrenadantes, todos presentan una turbidez muy baja, como se pudo observar a simple vista (**Figura 5.5**). Por otra parte, como se discutió en el **Capítulo 3**, la absorbancia a 280 en la muestra homogeneizada (H) se debe a la liberación de proteínas y ácidos nucleicos durante la homogeneización. En el resto de las muestras que fueron tratadas térmicamente (T, TH,

HT y HTH), la absorbancia a 280 nm disminuye marcadamente (entre 40 y 60%) debido a que la coagulación térmica disminuye la dispersabilidad proteica.

## 5.7. Caracterización química

### 5.7.1. Dispersabilidad de los componentes celulares

En la **Figura 5.5** se muestran los valores de dispersabilidad de hidratos de carbono, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y sólidos totales de las muestras.



**Figura 5.5.** Dispersabilidad de los componentes celulares de las muestras H, HT, HTH, T y TH. Valores con diferentes letras para cada componente son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Se puede observar que la dispersabilidad proteica de la muestra H es entre 4 y 5 veces mayor que la del resto de las muestras (que tuvieron un tratamiento térmico), entre las cuales no hubo diferencias significativas. En cambio, la dispersabilidad de hidratos de carbono y de ácidos nucleicos aumenta con los sucesivos tratamientos térmicos y de

homogeneización. Por otro lado, la dispersabilidad de los lípidos no presentó diferencias significativas entre las muestras.

En la muestra T, los valores de dispersabilidad de hidratos de carbono y proteínas sugieren que a altas temperaturas parte de los  $\beta$ -glucanos y mananoproteínas se desprenden de la pared [40] provocando un debilitamiento de ésta y favoreciendo la liberación de ácidos nucleicos como evidencia su dispersabilidad del 31,1%.

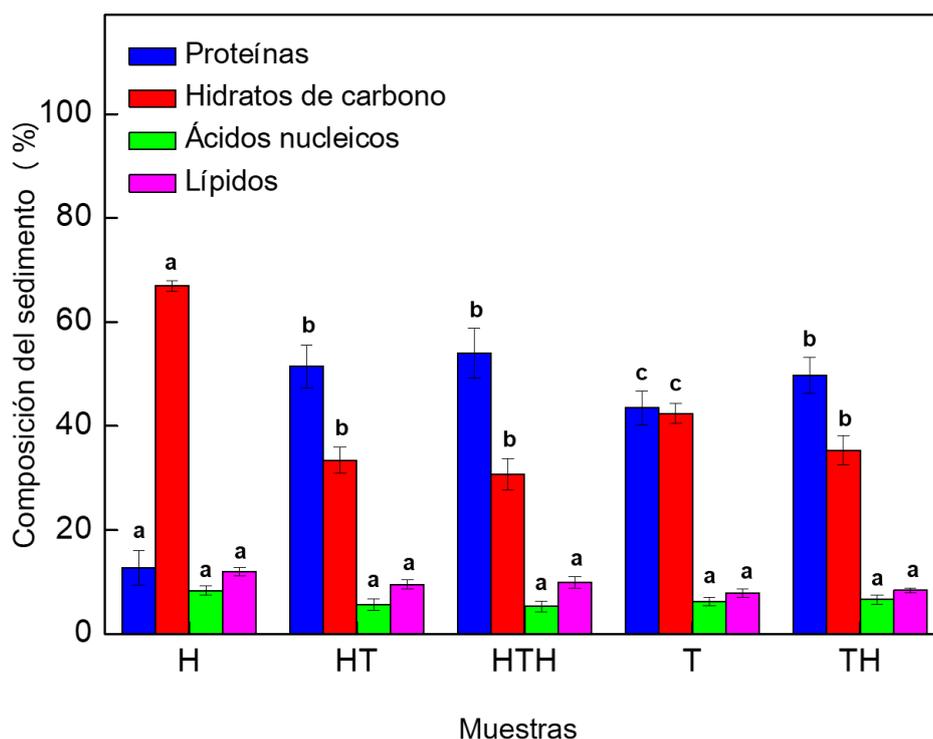
La homogeneización posterior (muestra TH), aumenta la dispersabilidad de los hidratos de carbono considerablemente (78%), pero no modifica el valor de proteínas. Este resultado indicaría que la homogeneización rompe la pared celular, pero no logra romper y dispersar los agregados que se formaron dentro de la célula durante el calentamiento.

Por otro lado, la muestra HT presenta un valor de dispersabilidad proteica mucho menor al de la muestra H, debido a la agregación térmica. En cambio, en los hidratos de carbono el tratamiento térmico tiene un efecto positivo en la dispersabilidad, independientemente de que la muestra esté previamente homogeneizada o no. Una segunda homogeneización (muestra HTH), no produce un aumento significativo de la dispersabilidad proteica, confirmando que la homogeneización no es suficiente para dispersar a las proteínas agregadas térmicamente. En cuanto a la dispersabilidad de hidratos de carbono y ácidos nucleicos, hubo un aumento significativo, alcanzando valores de 57,9 y 54,2% respectivamente, siendo estos los más altos de todas las muestras.

A partir de los valores de dispersabilidad de sólidos totales, se puede observar que la muestra H tiene mayor dispersabilidad y que al aplicar un tratamiento térmico, independientemente del orden en el cual se aplica, la cantidad de sólidos solubles o en dispersión disminuye. En las muestras tratadas térmicamente, como la dispersabilidad de proteínas y lípidos no se modifica significativamente, la tendencia de los sólidos totales depende de la dispersabilidad de hidratos de carbono y ácidos nucleicos, los cuales aumentan al aumentar la cantidad de tratamientos aplicados.

### 5.7.2. Composición de los sedimentos

En la **Figura 5.6** se muestra la composición porcentual de los sedimentos. Todas las muestras tuvieron cantidades similares de ácidos nucleicos y lípidos. Sin embargo, la proporción de proteínas y de hidratos de carbono varía según los tratamientos aplicados.



**Figura 5.6.** Composición porcentual de los sedimentos de las muestras H, HT, HTH, T y TH. Valores con diferentes letras para cada componente son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

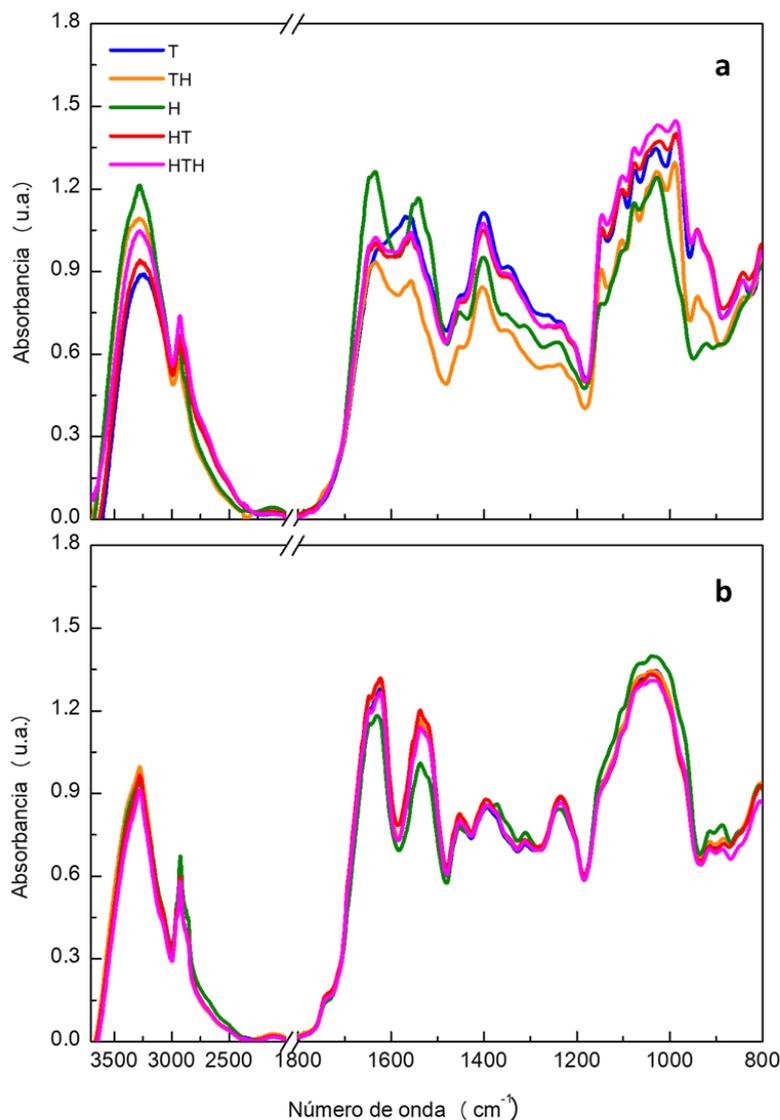
Todas las muestras que tuvieron un tratamiento térmico presentan mayor proporción de proteínas y menor proporción de hidratos de carbono que la muestra H, debido a la coagulación proteica y a la solubilización de  $\beta$ -glucanos. Se observa además, que las muestras que fueron sometidas a un tratamiento térmico y homogeneizadas (HT, HTH y TH), tienen sedimentos sin diferencias significativas entre sí en su composición. Por otro lado, en la muestra T, que es la única que no fue homogeneizada, el porcentaje de proteínas disminuye y el de hidratos de carbono aumenta, respecto de las tres muestras mencionadas anteriormente. La proporción entre ambos componentes es similar a la

observada en la muestra L (**Capítulo 3**), debido a que la dispersabilidad de los mismos durante el tratamiento térmico también fue similar.

### **5.7.3. Caracterización de las fracciones por espectroscopía infrarroja.**

En la **Figura 5.7** se muestran los espectros de FTIR de los sobrenadantes y de los sedimentos de las muestras con diferentes tratamientos. Se puede observar que en los sobrenadantes (**Figura 5.7a**), hay diferencias en las bandas amida I y amida II, que señalan diferencias en la estructura de las proteínas de cada fracción [100]. En particular, en la muestra T se observa un solo pico, en la posición de la banda amida II. Esta diferencia puede atribuirse a que en el sobrenadante de la muestra T, solo están presentes algunas proteínas de pared celular que se dispersaron durante el tratamiento térmico. En cambio en el resto de los sobrenadantes, también hay proteínas citoplasmáticas que se liberaron durante el proceso de homogeneización y se manifiestan en el pico amida I [131]. En las muestras H y TH, que no tuvieron un tratamiento térmico luego de la homogeneización, la banda amida I tiene mayor intensidad que la banda amida II, debido a la alta concentración de proteínas intracelulares. En cambio, en la muestra HT, la coagulación térmica de las proteínas citoplasmáticas y de pared, disminuyen la intensidad de la banda amida I, señalando la disminución en la movilidad de las cadenas de aminoácidos. En la muestra HTH, la posterior homogeneización de los agregados no modifica la relación amida I/amida II.

Por otro lado, excepto en la muestra H, todos los sedimentos presentan las mismas bandas de absorción, indicando que no hubo cambios estructurales en sus componentes (**Figura 5.7b**). En la muestra H, se observa que la intensidad de bandas amida I y amida II es menor que en el resto de las muestras, mientras que el pico asociado a  $\beta$ -glucanos tiene mayor intensidad. Estos resultados concuerdan con la composición de los sedimentos analizada anteriormente (**Figura 5.6**).

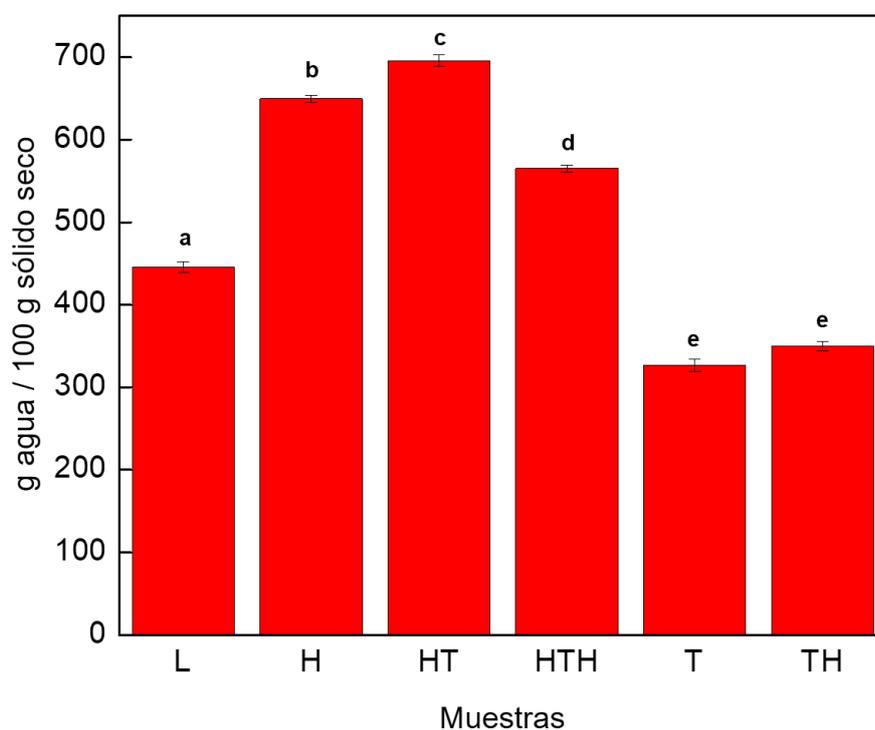


**Figura 5.7.** Espectros de FTIR de las fracciones de las muestras L, H, HT, HTH, T y TH. a) sobrenadante, b) sedimento.

### 5.8. Capacidad de retención de agua de la fracción insoluble

En la **Figura 5.8** se muestra la capacidad de retención de agua de las muestras tratadas. Tomando como referencia la muestra H, el tratamiento térmico posterior (muestra HT) aumenta la CRA y el sedimento es, a simple vista, mucho más compacto que el formado a partir de la muestra H, debido a la formación de estructuras tridimensionales, que fueron observadas por micrografía TEM (**Figura 5.2**). La homogeneización posterior

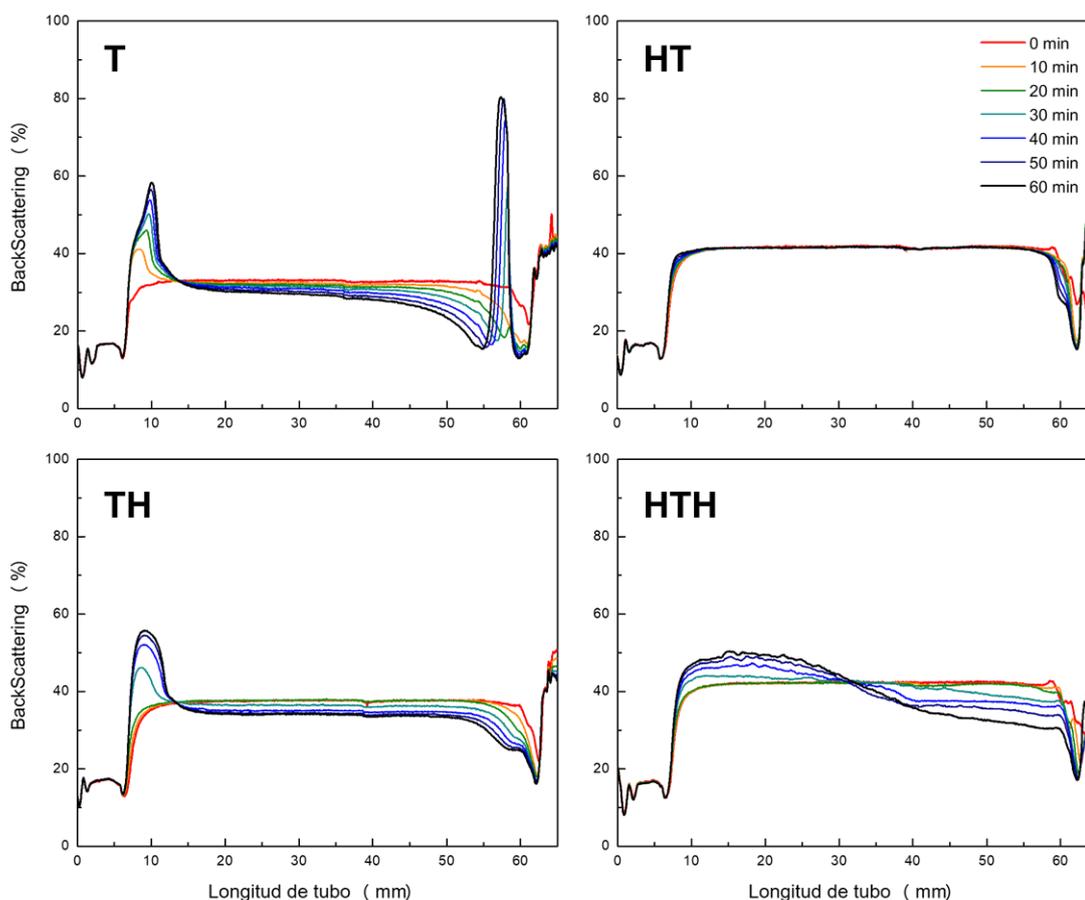
(muestra HTH) disminuye la CRA, debido a la ruptura de dichas estructuras. Aunque la muestra HTH tiene una distribución de tamaño de partícula similar a la muestra H, su CRA es menor que la de la muestra H. Esto se atribuiría a que el sedimento de la muestra H tiene mayor proporción de  $\beta$ -glucanos que la muestra HTH, los cuales tienen una alta CRA [39,48,49,120]. La muestra T, tiene menor CRA respecto de la muestra L. Este resultado podría deberse a que la desnaturalización térmica de las proteínas dentro de la célula, al estar en un espacio reducido y con una cantidad de agua libre limitada, genera agregados más compactos y menos hidratados. En la muestra TH, se observa que la homogeneización posterior, no modifica significativamente la CRA respecto a la muestra T. Esto confirmaría que los agregados formados térmicamente dentro de la célula tienen una baja CRA y aunque la célula se micronice, la muestra tiene una CRA menor que aquellas que no fueron tratadas térmicamente antes de la homogeneización [130].



**Figura 5.8.** Capacidad de retención de agua de las muestras L, H, HT, HTH, T y TH. Valores con diferentes letras para cada componente son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

### 5.9. Estabilidad frente a la sedimentación

En la **Figura 5.9**, se muestran los perfiles de %BS de las dispersiones con distintos tratamientos en función del tiempo durante 60 minutos. Como se detalló en el **Capítulo 3**, el ancho del pico en la zona inferior del tubo es una medida de la cantidad de sedimento formado, mientras que la intensidad de la señal da idea de la concentración de partículas en el mismo [105].



**Figura 5.9.** Perfiles de %BS de las muestras T, TH, HT y HTH.

En las muestras T y TH, los sedimentos formados tienen menor volumen que el de la muestra HTH pero son más compactos, debido a su menor capacidad para retener agua (**Figura 5.8**). Por otro lado, en estas tres muestras se produce una clarificación en la zona superior del tubo que se evidencia por la disminución de la señal de %BS, aunque solo la

muestra T presenta transmitancia en la zona superior (dato no mostrado), indicando una mayor clarificación de la suspensión en esta muestra.

En la muestra HT, se observa que la formación de sedimento es despreciable debido a la formación de estructuras tridimensionales de gran tamaño, que aumentan marcadamente la viscosidad del medio. Estos resultados demuestran que la cantidad de sedimento formado no depende únicamente del tamaño de las partículas, como se esperaría en una suspensión ideal.

En la **Figura 5.10** se muestran las cinéticas de sedimentación de las suspensiones. En la muestra T, se observa una elevada velocidad de sedimentación, que incluso es mayor a la de la muestra L. Esto se relaciona con el mayor tamaño de las partículas ( $D_{4,3} = 86 \mu\text{m}$ ) y menor hidratación de la muestra T. Por otro lado, la muestra HTH presenta una velocidad inicial de sedimentación muy baja, similar a la de la muestra H, pero luego de un tiempo de inducción, ambas aumentan rápidamente. Como se discutió en el **Capítulo 3**, este resultado se atribuye a la formación de agregados de mayor tamaño. En la muestra TH también se observa un periodo de inducción, pero incluso antes de este tiempo, la velocidad de sedimentación es mayor a la de las muestras H y HTH. Este resultado es esperable por la presencia de cápsulas de pared que no se logran micronizar durante el proceso de homogeneización. En la muestra HT, aunque el tamaño de partícula es grande ( $D_{4,3} = 62,6 \mu\text{m}$ ), se observa una velocidad de sedimentación muy baja, sin periodo de inducción durante el tiempo estudiado. Estos resultados refuerzan la idea de que las partículas micronizadas tienen tendencia a agregarse, mientras que aquellas tratadas térmicamente como único o último tratamiento, no poseen estas características.

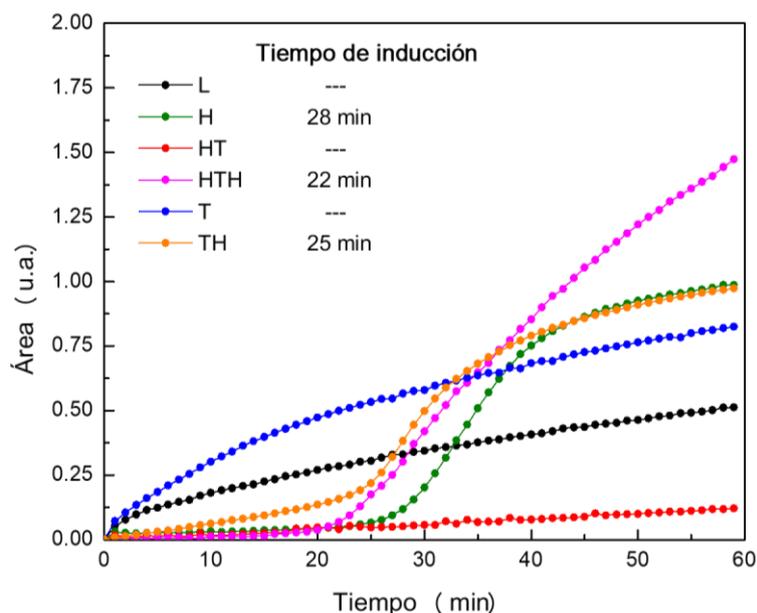


Figura 5.10. Cinética de sedimentación de las muestras L, H, HT, HTH, T y TH.

Luego de este análisis, se puede concluir que aplicando una combinación adecuada de tratamientos, es posible obtener sistemas estables a pesar de la presencia de partículas de gran tamaño.

### 5.10. Reología

Las características reológicas de una mezcla, como su viscosidad o su comportamiento de flujo, dependen de la concentración, distribución de tamaño, forma e interacciones entre las partículas. Aquellas partículas que puedan reducir la movilidad de la fase acuosa provocarán un mayor aumento en la viscosidad de la dispersión [132].

En la **Figura 5.11** se compara el comportamiento de flujo de las muestras L, H, HT, HTH, T y TH, que fueron ajustadas en forma satisfactoria con el modelo de Herschel – Bulkley ( $R^2 > 0,999$ ). Por otro lado, en la **Tabla 5.2** se muestran los índices de consistencia ( $k$ ) y de flujo ( $n$ ) y el umbral de fluencia ( $\tau_0$ ) obtenidos del ajuste de las curvas y la viscosidad relativa de las muestras que se calculó como el cociente entre la viscosidad aparente de las muestras medida a una velocidad de deformación de  $100 \text{ s}^{-1}$  y la viscosidad del agua.

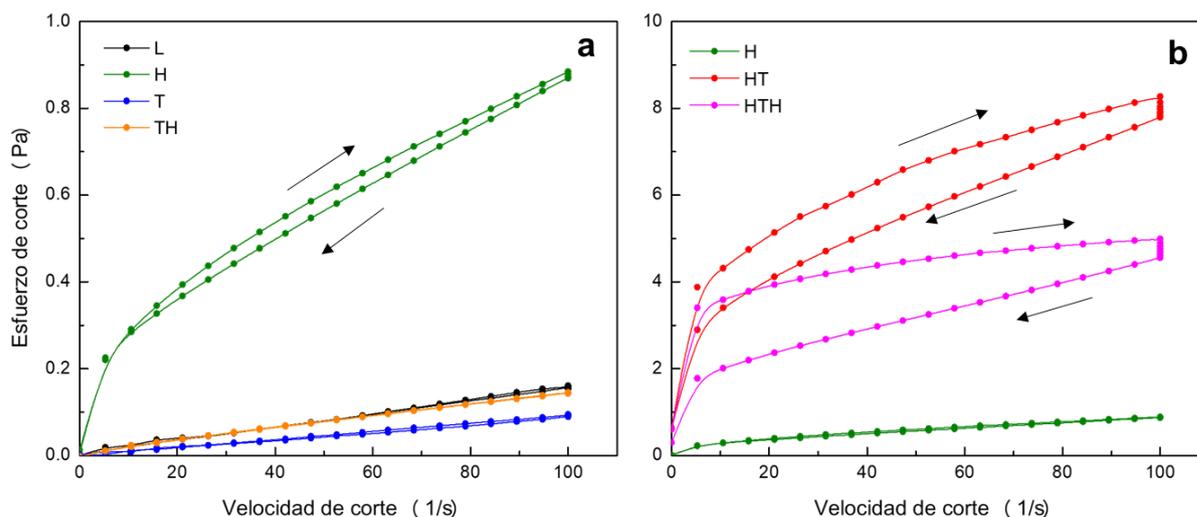


Figura 5.11. Curvas de comportamiento de flujo a) muestras L, H, T y TH, b) muestras H, HT y HTH.

Tabla 5.2. Parámetros del modelo de Herschel – Bulkley y viscosidad relativa de las muestras L, H, HT, HTH, T y TH.

Muestra	Parámetros del modelo de Herschel – Bulkley			Viscosidad relativa
	$\tau_0$	K (Pa.s)	n (adimensional)	
L	$6,27 \cdot 10^{-3}$	$1,14 \cdot 10^{-3}$	1,017	1,6
H	$3,06 \cdot 10^{-2}$	$5,81 \cdot 10^{-2}$	0,574	8,7
HT	$1,99 \cdot 10^{-1}$	$2,02 \cdot 10^0$	0,299	83
HTH	$2,27 \cdot 10^{-1}$	$6,51 \cdot 10^{-1}$	0,313	50
T	$8,38 \cdot 10^{-4}$	$7,50 \cdot 10^{-4}$	1,054	1,0
TH	$2,12 \cdot 10^{-4}$	$2,63 \cdot 10^{-3}$	0,870	1,4

En la Figura 5.11a se observa que las muestras L, T y TH presentan valores de esfuerzo de corte relativamente bajos en todo el rango de velocidad de corte estudiado. En las muestras L y T, la viscosidad aparente es similar a la del agua y los índices de flujo son cercanos a 1, característicos del comportamiento Newtoniano. Este resultado se atribuye a que las células y agregados celulares, al sedimentar rápidamente, no participan en la determinación. En la muestra TH, si bien la viscosidad relativa es muy baja, se observa un aumento en el índice de consistencia respecto de la muestra T, como consecuencia de la presencia de partículas micronizadas que permanecen en suspensión y que serían las responsables de reducir la movilidad de la fase acuosa. La muestra H, presenta un mayor índice de consistencia respecto de la muestra TH y un menor índice de flujo, indicando un

mayor nivel de pseudoplasticidad. Esto se relaciona con la mayor cantidad de partículas micronizadas con capacidad para formar agregados que reducen la movilidad de la fase continua. Estos resultados se correlacionan con la mayor capacidad de retención de agua de la muestra H respecto de la TH.

En la **Figura 5.11b** se observa que un tratamiento térmico posterior a la homogeneización (muestra HT), genera un aumento marcado de la viscosidad del sistema, debido a las redes tridimensionales formadas por agregados proteicos en interacción con polisacáridos de pared, capaces de retener parte de la fase acuosa, aumentando el volumen efectivo de las estructuras. El índice de consistencia es 35 veces mayor que el de la dispersión antes del tratamiento térmico (muestra H), así como la viscosidad relativa es casi 10 veces mayor luego del tratamiento térmico. Asimismo, el índice de flujo denota un mayor nivel de pseudoplasticidad que el resto de las dispersiones. La posterior homogeneización a alta presión (muestra HTH), rompe los agregados parcialmente, disminuyendo la viscosidad relativa del sistema a aproximadamente a la mitad del valor que tenía antes de la homogeneización. El índice de consistencia también se reduce, mientras que el índice de flujo corresponde a un fluido pseudoplástico. En el **Capítulo 3** se corroboró el efecto estabilizante que poseen los  $\beta$ -glucanos de pared celular [39,49]. A partir de los resultados obtenidos en las muestras HT y HTH se puede inferir que la formación de agregados tridimensionales durante el tratamiento térmico y el aumento de viscosidad de la fase continua que éstos provocan, pueden mejorar la estabilidad cinética de las emulsiones.

Respecto del cambio de viscosidad en el tiempo, tanto la muestra HT como la muestra HTH son tixotrópicas, ya que a velocidad de corte constante, la viscosidad aparente desciende con el tiempo, debido a la ruptura de interacciones entre partículas, por la acción de fuerza cizalla [103]. Aunque este comportamiento disminuiría la capacidad estabilizante de las dispersiones durante la homogeneización de la emulsión, la viscosidad de ambas dispersiones incluso luego de la agitación continúa siendo mucho más elevada

que la de la muestra H. Esta última muestra, en cambio, tiene un leve comportamiento tixotrópico, mientras que en las muestras L, T y TH, que poseen una baja viscosidad aparente, no presentan variaciones de viscosidad cuando se ejerce una velocidad de corte constante. Estos resultados se deben a la poca interacción entre las partículas de estas dispersiones.

### **5.11. Resumen de resultados y conclusiones parciales**

- Por combinación de tratamiento térmico y homogeneización a alta presión se obtuvieron las muestras H, HT, HTH, T y TH. El orden de los tratamientos influyó en forma significativa en las características de las dispersiones.
- La dispersabilidad proteica disminuye significativamente en las muestras con algún tratamiento térmico respecto de la muestra H, debido a la coagulación térmica de las proteínas. En cambio, la dispersabilidad de hidratos de carbono y de ácidos nucleicos aumenta con la cantidad de tratamientos, independientemente de su orden.
- Los espectros FTIR del sobrenadante señalan diferencias en las estructuras de las proteínas de esta fracción, especialmente en la muestra T debido a que solo habría proteínas de pared que se solubilizaron, a diferencia del resto de las muestras homogeneizadas que también liberan proteínas citoplasmáticas. Por otro lado, todos los sedimentos de las muestras con tratamiento térmico presentan las mismas bandas de absorción, indicando que no hubo cambios estructurales en sus componentes.
- El tratamiento térmico aplicado a las células de levadura (muestra T), permite la liberación de componentes celulares al medio. Sin embargo, la pared celular conserva su forma original y es más resistente a la micronización por homogeneización a alta presión, debido a la agregación proteica en la pared. Esta dispersión tiene baja CRA y sedimenta rápidamente.
- La homogeneización a alta presión aplicada post tratamiento térmico (muestra TH), aumenta significativamente la dispersabilidad de hidratos de carbono, pero no modifica los valores de proteína, debido a que los agregados intracelulares que se formaron no se rompen durante la homogeneización posterior. La CRA tampoco mejora respecto de la muestra T y el comportamiento frente a la sedimentación es

similar al de la muestra H, aunque a mayor velocidad debido a que tiene mayor porcentaje de cápsulas enteras.

- El tratamiento térmico aplicado a una dispersión de levadura micronizada (muestra HT) genera una red tridimensional formada por proteínas desnaturalizadas e hidratos de carbono, que tienen una elevada capacidad para retener a la fase acuosa, generando una dispersión con una viscosidad mucho más elevada que la del resto de las dispersiones. Esta red genera además, que sus partículas sean más estables frente a la sedimentación.
- La homogeneización posterior de los agregados (muestra HTH) reduce su tamaño y en consecuencia la viscosidad de la dispersión, aunque sigue siendo elevada respecto de las otras muestras. A pesar de la homogeneización, no aumenta significativamente la dispersabilidad de ninguno de sus componentes respecto de la muestra HT.
- Las muestras HT y HTH, debido a la elevada viscosidad y estabilidad frente a la sedimentación, son potencialmente buenos agentes estabilizantes de emulsiones.

# **CAPÍTULO 6**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **EMULSIONES CON LEVADURA TRATADA TÉRMICAMENTE Y/U HOMOGENEIZADA A ALTA PRESIÓN**

## CAPÍTULO 6: RESULTADOS Y DISCUSIÓN. EMULSIONES CON LEVADURA TRATADA TÉRMICAMENTE Y/U HOMOGENEIZADA A ALTA PRESIÓN

En el **Capítulo 5** se discutió como los diferentes componentes de levadura, según el orden del tratamiento de homogeneización a 1250 bar y tratamiento térmico que recibieron, tienen diferencias estructurales que modifican sus características, tales como tamaño de partícula, dispersabilidad de sus componentes, capacidad de retención de agua y estabilidad frente a la sedimentación. En este capítulo se estudiaron las propiedades de estas dispersiones en la formación y estabilización de emulsiones o/w.

En el **Capítulo 4** se observó que las dispersiones de levadura homogeneizadas tienen la capacidad de formar emulsiones y la estabilidad de éstas depende del grado de ruptura de la pared celular, de las concentraciones de aceite y de levadura homogeneizada. En este capítulo se continuó trabajando con emulsiones con un  $\phi_m$  de 0,3 y una concentración de levadura de 2,5% b.s. en la fase acuosa, debido a que estas condiciones, aunque no son las óptimas teniendo en cuenta la estabilidad, permiten estudiar en periodos de tiempo más cortos las diferencias entre las muestras con distintos tratamientos.

De la misma manera que en el **Capítulo 4**, la nomenclatura para las emulsiones que se utilizó fue la letra E seguida del nombre de la dispersión de levadura utilizada. Por ejemplo, la emulsión preparada con la muestra L se denomina  $E_L$  y la preparada con la dispersión HTH se denomina  $E_{HTH}$ .

### 6.1. Tensión interfacial

La tensión interfacial es una medida de la tensión que se genera en la interfase aceite-agua, mientras que la presión interfacial se define como la diferencia entre la tensión interfacial del agua pura y la tensión interfacial de la dispersión con emulsionante. Cuando un componente con actividad interfacial se adsorbe en la interfase, reduce la tensión entre

ambas fases y por lo tanto aumenta la presión interfacial [111]. Por tal motivo, el uso de emulsionantes que aumenten la presión interfacial es uno de los factores determinantes para la formación de emulsiones con gotas de aceite pequeñas, que sean cinéticamente más estables [79].

En la **Tabla 6.1** se muestran los valores de presión interfacial de las muestras L, H, HT, HTH, T y TH. Se puede observar que la muestra L no aumenta de manera significativa la presión interfacial respecto del agua. En las muestras T y TH, si bien la presión interfacial aumenta, los valores son menores que los de aquellas muestras que primero tuvieron un tratamiento de homogeneización (H, HT y HTH). Este resultado se atribuye a que las proteínas que formaron coágulos compactos dentro de la célula (muestras T y TH), no tendrían buena capacidad para adsorberse en la interfase. Por el contrario, la muestra que solo fue homogeneizada (H), la cual posee una elevada dispersabilidad proteica (**Sección 5.7.1**), presenta mejores propiedades tensioactivas que las muestras T y TH. No obstante, aunque la presión interfacial de la muestra H es relativamente buena comparada con los valores del resto de las muestras, la degradación enzimática que se produce durante el almacenamiento (**Sección 3.4**), limita el uso de esta dispersión como emulsionante. El tratamiento térmico aplicado a la muestra H, además de aumentar la estabilidad frente a la degradación enzimática, aumenta la presión interfacial. Dado que la dispersabilidad proteica de la muestra HT es considerablemente menor que la de la muestra H, se infiere que los agregados tridimensionales insolubles formados por la desnaturalización de proteínas y el desplegamiento de los  $\beta$ -glucanos, se adsorben más eficientemente en la interfase que las mananoproteínas, proteínas citoplasmáticas y fosfolípidos dispersados durante la homogeneización. La estabilización de emulsiones por complejos proteína-polisacáridos insolubles han sido reportada por varios autores [88,124,133]. Adicionalmente, la fracción de proteínas que permanece dispersa (alrededor del 20%) también contribuiría al aumento de la presión interfacial de la muestra.

Continuando con el análisis, entre las dispersiones HT y HTH no se encontraron diferencias significativas en la presión interfacial, indicando que este parámetro no es modificado por el tamaño de los agregados. Los valores de presión interfacial de estas dos muestras son comparables con la de los polisacáridos insolubles de soja, que están en el rango de 7,5 y 8,4 mN/m a pH 3 y entre 8,0 y 9,0 mN/m a pH 7 [124]. Como los valores obtenidos dependen de la concentración de emulsionante y de la técnica utilizada, no hay mucha información disponible que sea comparable con estas muestras. Sin embargo, la comparación entre las dispersiones de levadura con distintos tratamientos permite determinar que el tipo y el orden del tratamiento aplicado, incide en la capacidad emulsionante de la dispersión.

**Tabla 6.1.** Valores de presión interfacial de las muestras L, H, HT, HTH, T y TH.

Muestra	Presión interfacial (mN/m)
L	0,02 ± 0,02 <sup>a</sup>
H	6,35 ± 0,05 <sup>b</sup>
HT	7,20 ± 0,04 <sup>c</sup>
HTH	7,15 ± 0,03 <sup>c</sup>
T	2,65 ± 0,05 <sup>d</sup>
TH	3,45 ± 0,02 <sup>e</sup>

Valores con diferentes letras en cada parámetro son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

## 6.2. Microscopía óptica de las emulsiones

En la **Figura 6.1** se observan las micrografías ópticas de las emulsiones  $E_L$ ,  $E_H$ ,  $E_{HT}$ ,  $E_{HTH}$ ,  $E_T$  y  $E_{TH}$ . En la muestra  $E_L$ , completamente desestabilizada, no se observa la formación de gotas, pero sí la presencia de células de levadura y la interfase que limita la fase acuosa y la lipídica. Este resultado se atribuye a que las células no tienen capacidad tensioactiva, y aunque podrían adsorberse en la interfase por un efecto Pickering como se discutió en el **Capítulo 4**, permitiendo la formación de gotas grandes, la emulsión es tan inestable que no es posible visualizar las gotas en el microscopio, debido al tiempo que lleva la preparación de la muestra para microscopía. En la muestra  $E_T$ , el resultado es

similar, aunque se distingue la presencia de algunas gotas de forma irregular. Este resultado se atribuye a la liberación de mananoproteínas y  $\beta$ -glucanos de pared durante el tratamiento térmico. Estas moléculas con actividad interfacial desplazarían de la interfase a las cápsulas de levadura que quedaron intactas [134], pero debido a la baja concentración de estos componentes, la emulsión que se forma tiene gotas de gran tamaño.

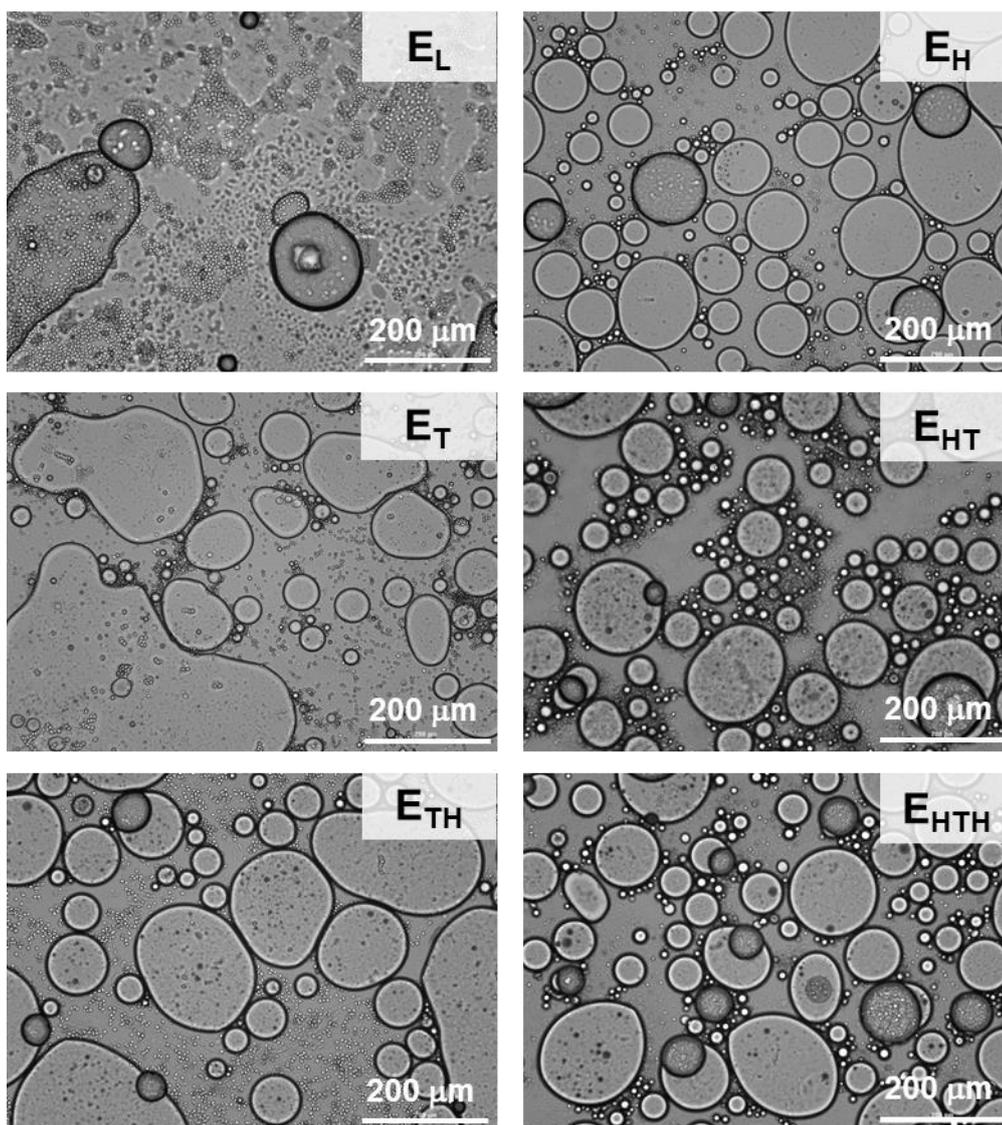


Figura 6.1. Micrografías ópticas de las muestras EL, EH, EHT, EHTH, ET y ETH.

En la muestra ETH, se observa una emulsión con gotas de menor tamaño y más esféricas que en la muestra ET. La reducción del tamaño de gota se atribuye principalmente

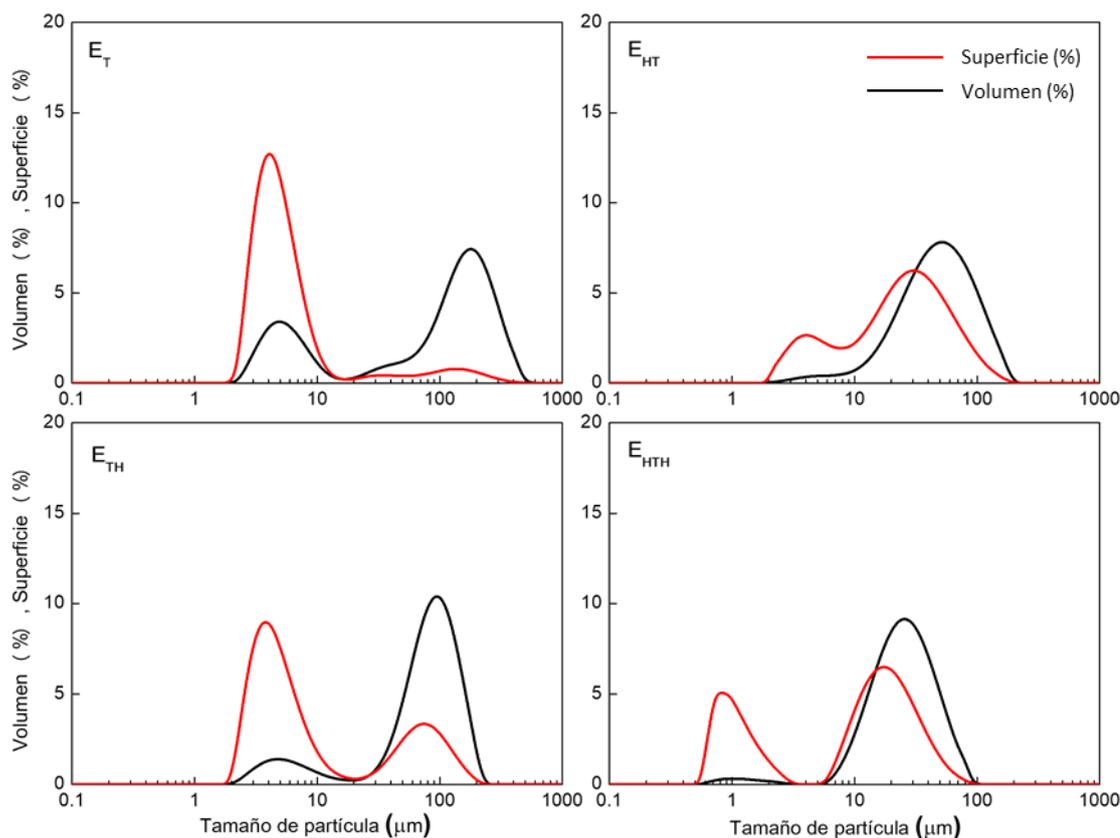
a la acción de mananoproteínas y  $\beta$ -glucanos de pared que se liberan durante la micronización [18,51,52,123]. Las proteínas citoplasmáticas, al haber coagulado dentro de la célula y tener una baja dispersabilidad, tendrían una menor participación en la formación de la emulsión.

En las muestras  $E_H$ ,  $E_{HT}$  y  $E_{HTH}$  se observan gotas que en promedio tienen menor tamaño que el de las gotas de las tres muestras descritas anteriormente. Estos resultados se correlacionan con el mayor aumento de la presión interfacial que generan las dispersiones H, HT y HTH, discutida en la sección anterior. Se observa además en las cinco emulsiones preparadas con dispersiones de levadura con algún tratamiento, que la distribución de gotas no es monomodal, existiendo al menos dos poblaciones con tamaños considerablemente diferentes.

### 6.3. Distribución de tamaño de partícula

Para corroborar los resultados obtenidos a partir de las micrografías, se determinó el tamaño de partícula en volumen y en superficie de las emulsiones  $E_{HT}$ ,  $E_{HTH}$ ,  $E_T$  y  $E_{TH}$  (**Figura 6.2**). Todas las muestras presentaron dos poblaciones, tanto en la distribución en superficie como en volumen.

En las distribuciones de tamaño de partícula en volumen, comparando las poblaciones de la derecha de cada muestra, que se atribuyen a las gotas de aceite de mayor tamaño, se observa que la muestra  $E_T$  tiene una moda de 182  $\mu\text{m}$ , la cual es mucho mayor que la del resto de las emulsiones preparadas con levadura tratada, pero menor a la de la muestra  $E_L$  (240  $\mu\text{m}$ , dato mostrado en el **Capítulo 4**). Aunque en esta población también pueden contribuir algunos agregados celulares, se confirma que las gotas de aceite son de mayor tamaño que las del resto de las emulsiones.



**Figura 6.2.** Distribuciones de tamaño de partícula en superficie y en volumen de las muestras  $E_T$ ,  $E_{HT}$ ,  $E_{TH}$  y  $E_{HTH}$ .

En la muestra  $E_{TH}$ , el tamaño de partícula se reduce a la mitad respecto de la muestra  $E_T$ , demostrando la capacidad emulsionante de los componentes liberados durante la homogeneización. Sin embargo, la moda es entre 5 y 6 veces mayor que la de la muestra  $E_H$  (16  $\mu\text{m}$ , dato mostrado en el **Capítulo 4**), lo cual refleja la disminución de la capacidad emulsionante cuando se realiza un tratamiento térmico previo a la homogeneización. En la muestra  $E_{HT}$ , la moda es de 53  $\mu\text{m}$ , mientras que en la muestra  $E_{HTH}$  se reduce a 23  $\mu\text{m}$ , valor que es levemente mayor al de la muestra  $E_H$ . Como las partículas presentes en la emulsión no son solo gotas de aceite sino también agregados insolubles provenientes de la levadura, el mayor tamaño promedio de las partículas de la muestra  $E_{HT}$  respecto de  $E_{HTH}$  está sesgado por la presencia de agregados de gran tamaño. Sin embargo, como la emulsión tiene un porcentaje mucho mayor de aceite que de

levadura, el aporte de estos agregados no puede ser el único causante del mayor tamaño de partícula y se puede inferir que las gotas de aceite de la emulsión  $E_{HT}$  son de mayor tamaño que las de la emulsión  $E_{HTH}$ .

A partir de las distribuciones de tamaño de partícula se pudo confirmar lo observado en las micrografías; las tres dispersiones que tuvieron un primer tratamiento de homogeneización (H, HT y HTH) forman emulsiones con un menor tamaño de gota.

Son varios los factores que determinan el tamaño de gota de una emulsión. Como se explicó en la sección anterior, se correlaciona con la actividad tensioactiva del emulsionante. Aquellas sustancias que aumentan más la presión interfacial, favorecerán la formación de gotas de menor tamaño. Esto explica por qué en las emulsiones  $E_L$ ,  $E_T$  y  $E_{TH}$ , al aumentar la presión interfacial disminuye el tamaño de gota. En cambio, en las emulsiones con tamaños de gota más chicas ( $E_H$ ,  $E_{HT}$  y  $E_{HTH}$ ), la relación entre la presión interfacial y el tamaño de gota fue inverso. Esto se debe a que además de la presión interfacial, influyen otros factores como por ejemplo, la velocidad de migración del emulsionante a la interfase y la viscosidad del film interfacial. Los emulsionantes que migran más rápidamente a la interfase permiten la formación de gotas de menor tamaño mientras que aquellos que aumentan la viscosidad del film interfacial, dificultan la ruptura de las gotas durante la homogeneización, dando lugar a la formación de gotas de mayor tamaño [79,123]. Esto explica por qué las dispersiones HT y HTH si bien generaron un mayor aumento de la presión interfacial respecto de la dispersión H, formaron una emulsión con tamaño de gota mucho mayor que  $E_H$ . Los agregados de alto peso molecular presentes en las dispersiones HT y HTH migrarían más lentamente a la interfase que las partículas micronizadas de la muestra H, y además el aumento de viscosidad de la fase continua podría dificultar la formación de gotas durante la homogeneización de la emulsión. Este efecto fue más marcado en la muestra HT que en la HTH, debido al mayor tamaño de los agregados [79].

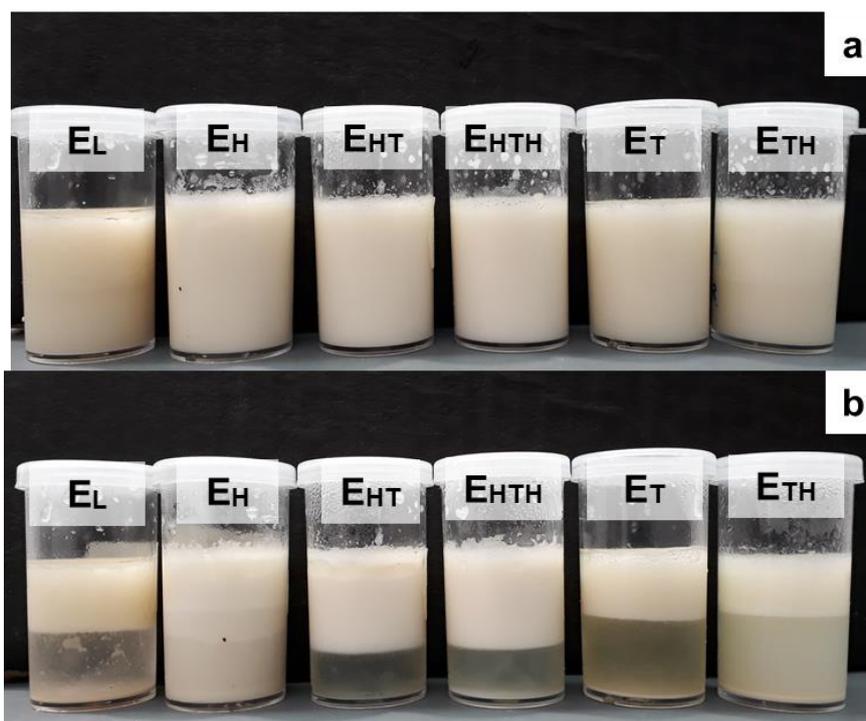
Con los ensayos realizados hasta el momento, se puede afirmar que las dispersiones H, HT y HTH exhiben mejores propiedades emulsionantes que las dispersiones T y TH.

Continuando con el análisis de la **Figura 6.2** y como se observó en la **Figura 6.1**, en todas las emulsiones con levadura tratada hay una población de gotas de aceite de tamaño muy pequeño, con una moda entre 4 y 5  $\mu\text{m}$  para las muestras  $E_T$ ,  $E_{TH}$  y  $E_{HT}$  y de 1  $\mu\text{m}$  para la muestra  $E_{HTH}$ . Estas poblaciones, que se evidencian más en las distribuciones en superficie, también podrían contener cápsulas de pared, fragmentos o agregados no incorporados a la interfase.

#### **6.4. Estabilidad física de las emulsiones**

En la **Figura 6.3** se observan las emulsiones  $E_L$ ,  $E_H$ ,  $E_{HT}$ ,  $E_{HTH}$ ,  $E_T$  y  $E_{TH}$  recién preparadas y luego de 24 horas de almacenamiento. Todas las emulsiones recién preparadas son opacas con una coloración blanca o beige. Luego de 24 horas la muestra  $E_H$  analizada en el **Capítulo 4**, se separa en tres fases. Por el contrario, las muestras con algún tratamiento térmico se separan solamente en dos fases: la fase superior o fase crema, concentrada en gotas de aceite y la fase inferior acuosa que contiene a los componentes que no se integraron en la emulsión. Se observa además que las muestras  $E_{HT}$  y  $E_{HTH}$  poseen una fase crema de apariencia más homogénea pero de volumen similar a la de la muestra  $E_H$  y de mayor volumen que las fases crema de las muestras  $E_L$ ,  $E_T$  y  $E_{TH}$ . Estos resultados se correlacionan con la mayor capacidad de retención de agua de las dispersiones H, HT y HTH respecto de las otras tres muestras, discutida en la **Sección 5.8**. También se observa que la fase acuosa de ambas muestras es más traslúcida, lo cual indica que los agregados formados durante el tratamiento térmico quedan retenidos en la fase acuosa ocluida entre las gotas o en la interfase de la emulsión, en concordancia con los resultados mostrados en la **Sección 5.9**, donde se observó que la muestra HT es muy estable frente a la sedimentación y la muestra HTH, aunque sedimenta, lo hace de manera

más lenta que el resto de las muestras. En las muestras  $E_L$  y  $E_T$  en cambio, la fase acuosa es bastante translúcida, pero se observa en el fondo, la presencia de partículas sedimentadas. Por último, en la muestra  $E_{TH}$ , el volumen de fase crema es similar al de la muestra  $E_T$ , aunque la fase acuosa es más turbia debido a la presencia de partículas micronizadas que permanecen en suspensión.



**Figura 6.3.** Fotografía de las emulsiones  $E_L$ ,  $E_H$ ,  $E_T$ ,  $E_{HT}$ ,  $E_{TH}$  y  $E_{HTH}$ . a) recién preparadas, b) almacenadas durante 24 horas.

La estabilidad global de las emulsiones se estudió a partir de los perfiles de %BS y %T determinados con un analizador óptico vertical (Quick Scan).

En las **Figuras 6.4** se muestran los perfiles de la emulsión  $E_T$  durante 24 horas. Esta muestra, al igual que la muestra  $E_L$  descrita en el **Capítulo 4**, es una emulsión muy inestable. Se evidencia un marcado proceso de cremado y de coalescencia debido al gran tamaño de las gotas (**Figura 6.1**), sumado a la clarificación en la zona inferior del tubo y sedimentación de las cápsulas de pared. Con estos resultados que respaldan lo observado

a simple vista y en la micrografía, se puede confirmar que las células de levadura tratadas térmicamente, pero sin ningún tratamiento de homogeneización, tienen escasas propiedades emulsionantes.

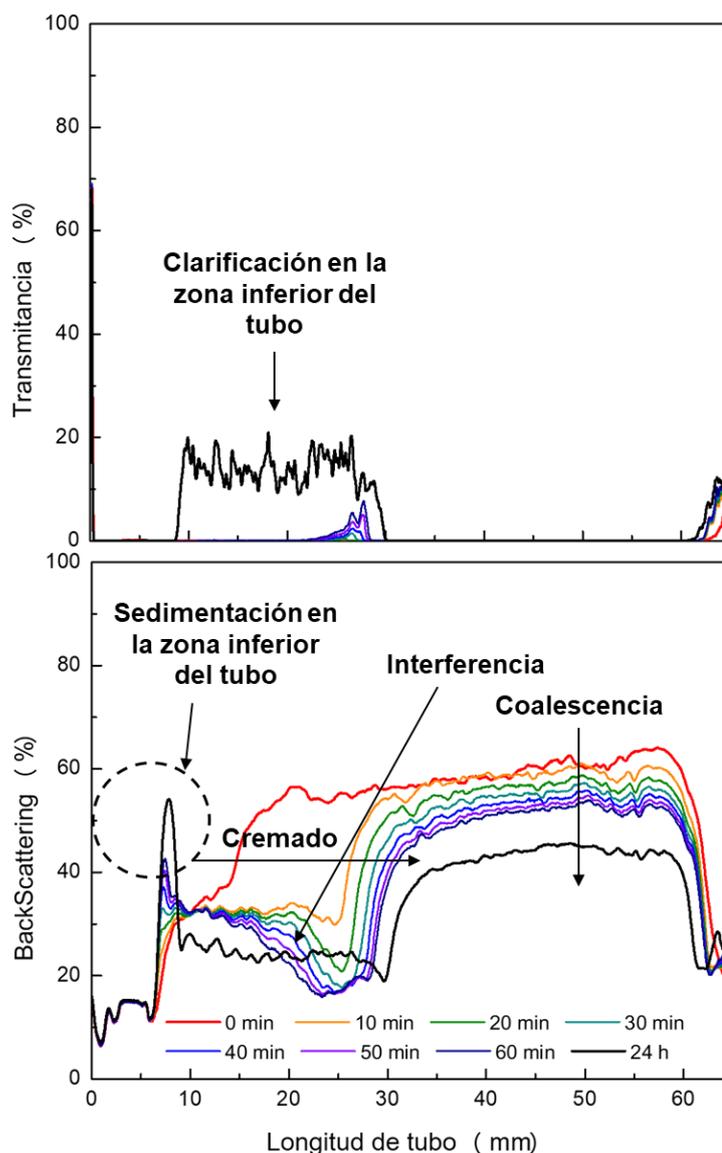
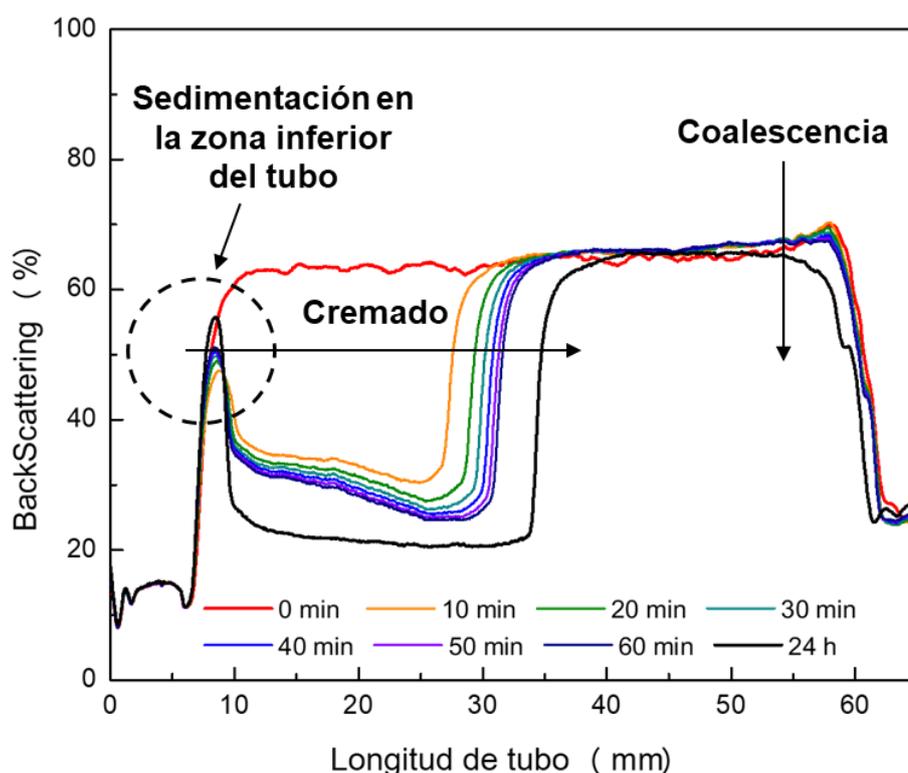


Figura 6.4. Perfiles %BS y %T en función del tiempo de la muestra E<sub>T</sub>.

En la **Figura 6.5** se muestra el perfil de %BS de la muestra  $E_{TH}$ . Esta muestra no presentó %T durante las 24 horas de almacenamiento, debido a la turbidez que presenta (**Figura 6.3**). La homogeneización posterior de la levadura tratada térmicamente mejoró las propiedades emulsionantes de la dispersión. Aunque la emulsión crema rápidamente, es mucho más estable frente a la coalescencia que la muestra  $E_T$ . Además, en el perfil de %BS se observa la presencia de un pico en la zona inferior del tubo, que indica la presencia de sedimento de poco volumen y poco hidratado, asociado a la sedimentación de cápsulas de pared sin micronizar.



**Figura 6.5.** Perfil %BS en función del tiempo de la muestra  $E_{TH}$ .

En la **Figura 6.6**, se muestran los perfiles de %BS y %T de la muestra  $E_{HT}$ . Comparando con el perfil de %BS de la muestra  $E_H$  (**Capítulo 4**), se puede corroborar que la muestra  $E_{HT}$  es más estable a la coalescencia, aunque también tiene una alta velocidad de cremado. La ausencia de un pico de %BS en la zona inferior del tubo y el elevado valor de %T en la fase acuosa inferior, confirman la ausencia de sedimento y de partículas en

suspensión debido a una completa incorporación de los agregados en la fase crema. Tal como se discutió en el **Capítulo 5**, los agregados de alto peso molecular presentes en esta muestra son estables frente a la sedimentación.

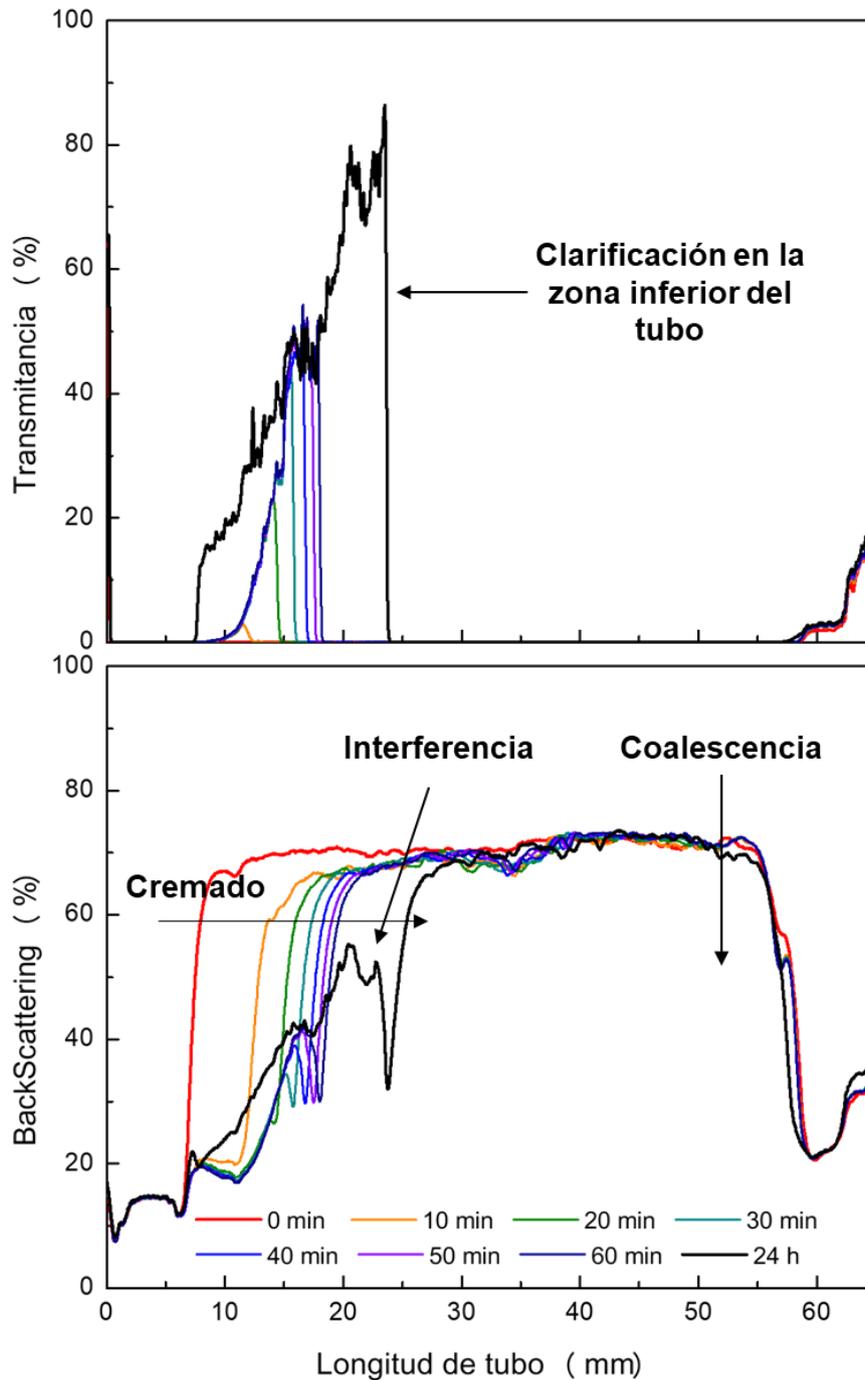
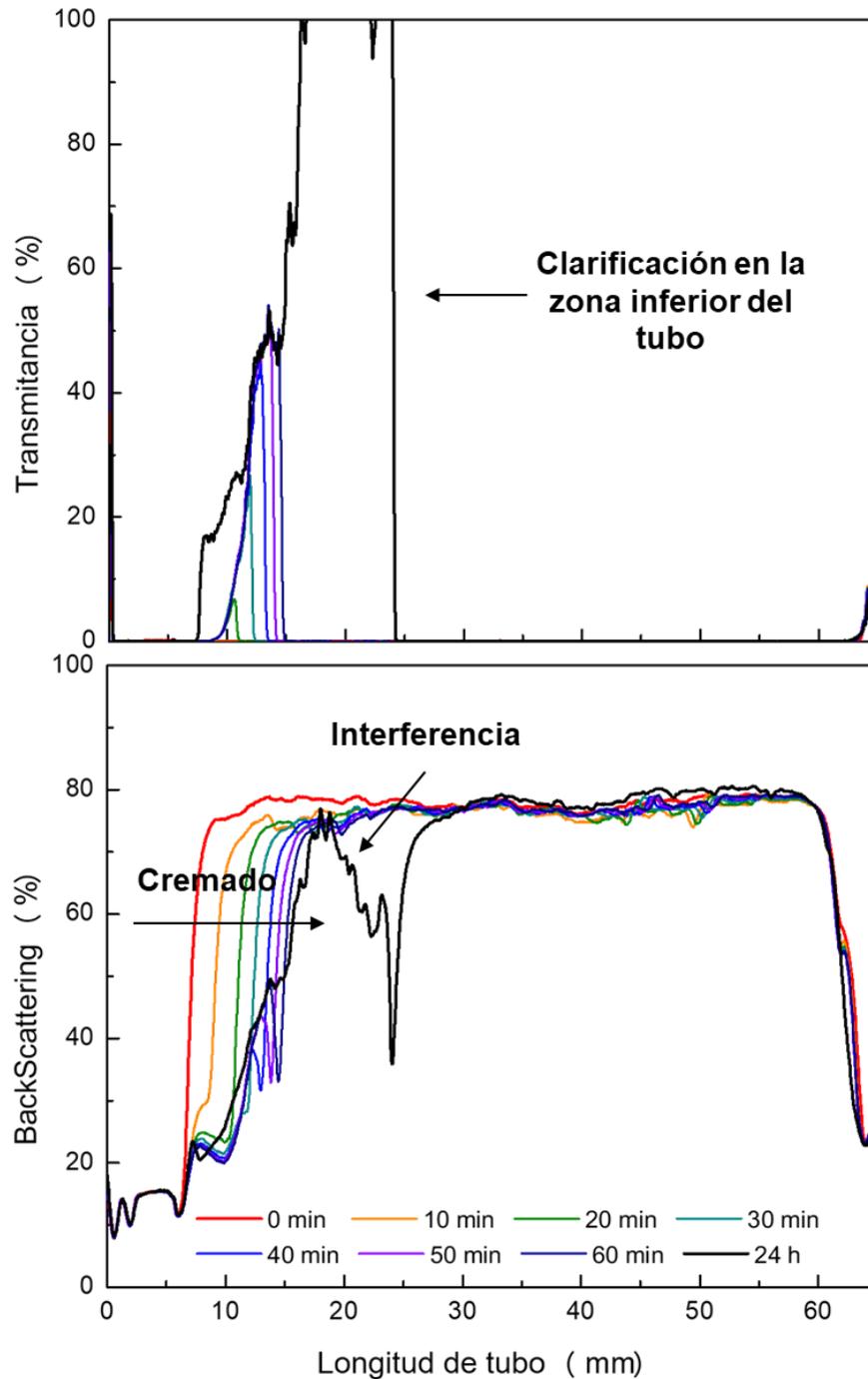


Figura 6.6. Perfiles de %BS y %T en función del tiempo de la muestra EHT.

Por último, en la **Figura 6.7**, se observa que la muestra  $E_{HTH}$  tiene menor velocidad de cremado que la muestra  $E_{HT}$  y también es estable frente a la coalescencia. Al igual que la muestra anterior, sus partículas se incorporan a la fase crema, dando una fase acuosa inferior traslúcida y sin sedimento.



**Figura 6.7.** Perfiles de %BS y %T en función del tiempo de la muestra  $E_{HTH}$ .

#### 6.4.1. Sedimentación

Los perfiles de %BS pudieron corroborar lo que se observó en la **Figura 6.3**. Solamente las muestras  $E_T$  y  $E_{TH}$ , que contienen cápsulas de levadura sin micronizar ( $E_{TH}$  en mucha menor proporción), presentaron un sedimento de poco volumen, pero compacto, similar al observado en la muestra  $E_L$  (**Capítulo 4**). Además, la turbidez de la fase acuosa inferior de la muestra  $E_{TH}$  (**Figura 6.3**) da indicios de que el proceso de sedimentación va a continuar en el tiempo. En las muestras  $E_{HT}$  y  $E_{HTH}$  en cambio, la ausencia de sedimento y la traslucidez de la fase acuosa inferior, indican una mayor incorporación de los componentes celulares en la interfase y en la fase acuosa ocluida entre las gotas de la emulsión, respecto de la emulsión  $E_H$  que se analizó en el **Capítulo 4**.

Comparando los perfiles de %BS de la emulsión  $E_{HTH}$  mostrados en esta sección con los de la dispersión acuosa HTH (**Capítulo 5**), se observa que la sedimentación de las partículas en la emulsión (**Figura 6.7**) es menor que en la dispersión acuosa (**Figura 5.9**). Este resultado se atribuye a que parte de los agregados se adsorberían en la interfase aumentando la presión interfacial, como se discutió en la **Sección 6.1**. A su vez, los agregados que no son adsorbidos en la interfase estarían anclados en la fase acuosa, formando una estructura tipo red entre las gotas de aceite lo cual evitaría su sedimentación. Este mismo comportamiento tendrían los agregados de la muestra HT, que no sedimentan ni en dispersión acuosa (**Figura 5.9**) ni en la emulsión (**Figura 6.6**).

Por otro lado, la estabilidad de las emulsiones  $E_{HT}$  y  $E_{HTH}$  frente a la sedimentación mantiene constante las concentraciones de moléculas con actividad interfacial y con capacidad estabilizante en la fase acuosa de la emulsión, lo cual favorecería la estabilidad frente a otros procesos como cremado y coalescencia.

#### 6.4.2. Cremado y coalescencia

En la **Tabla 6.2**, se muestran los porcentajes de fase crema de las emulsiones, que fueron calculados como se describió en la **Sección 4.2.2**. Como se observó en la **Figura**

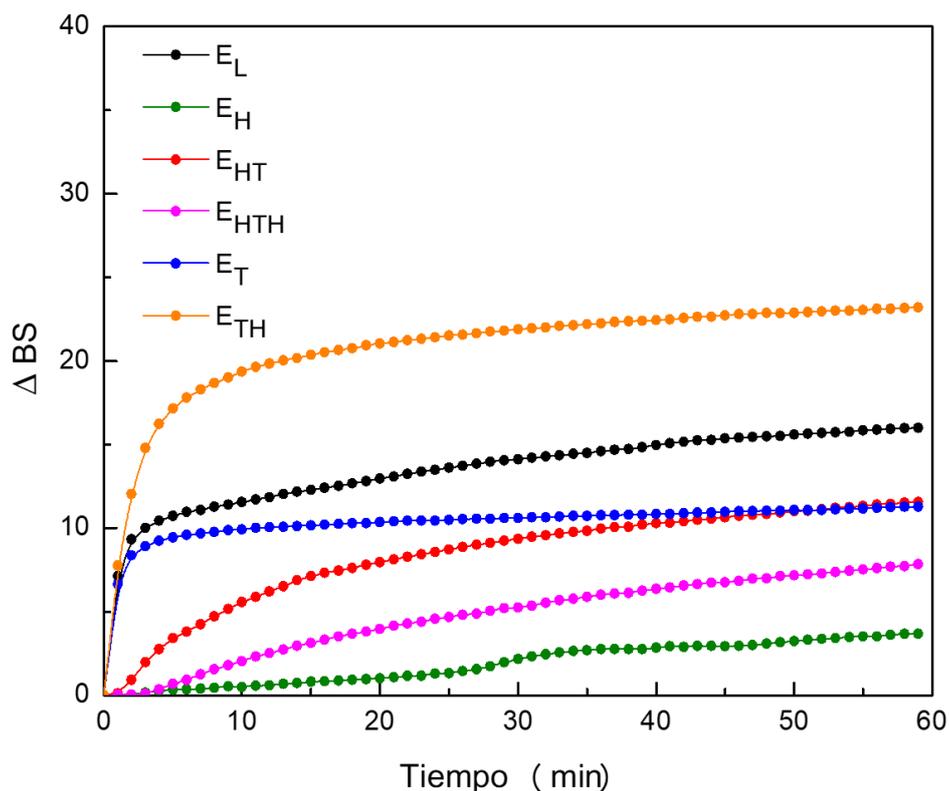
6.3, las tres emulsiones preparadas con dispersiones con un primer tratamiento de homogeneización (H, HT y HTH) que poseen mayor capacidad de retención de agua, forman emulsiones con fases crema más hidratadas y por lo tanto de mayor volumen.

**Tabla 6.2.** Porcentaje de fase crema a las 24 h de las muestras E<sub>H</sub>, E<sub>HT</sub>, E<sub>HTH</sub>, E<sub>T</sub> y E<sub>TH</sub>.

Muestra	% Fase crema
E <sub>H</sub>	65,8 ± 2,5 <sup>a,b</sup>
E <sub>HT</sub>	62,4 ± 2,1 <sup>a</sup>
E <sub>HTH</sub>	67,3 ± 1,5 <sup>b</sup>
E <sub>T</sub>	42,5 ± 2,3 <sup>c</sup>
E <sub>TH</sub>	45,7 ± 2,1 <sup>c</sup>

Valores con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05)

En la **Figura 6.8** se muestra la cinética de cremado de las emulsiones. Se observa que las muestras E<sub>L</sub>, E<sub>T</sub> y E<sub>TH</sub> presentan una velocidad de cremado elevada, que se explica por el gran tamaño de las gotas de aceite y la mayor velocidad de sedimentación de las partículas insolubles que estabilizaban la emulsión, mientras que las emulsiones E<sub>H</sub>, E<sub>HT</sub> y E<sub>HTH</sub>, con menor tamaño de gota, más estables frente a la sedimentación y con fases crema más hidratadas, fueron también más estables al cremado.



**Figura 6.8.** Cinética de cremado de las muestras  $E_L$ ,  $E_H$ ,  $E_{HT}$ ,  $E_{HTH}$ ,  $E_T$  y  $E_{TH}$ .

En la **Figura 6.9**, se muestra la estabilidad frente a la coalescencia de la fase crema durante un almacenamiento de 18 días. El descenso en la señal de %BS indica que disminuye el número de gotas debido a la coalescencia de las mismas [105]. La muestra  $E_T$  no solo cremó rápidamente (**Figura 6.8**) sino que la fase crema fue inestable desde los primeros minutos de almacenamiento. Los resultados obtenidos son similares a los observados en la muestra  $E_L$ , demostrando la baja estabilidad de la emulsión preparada con levadura tratada térmicamente sin homogeneizar. En la muestra  $E_{TH}$ , se manifiesta una mayor estabilidad durante los primeros minutos respecto de  $E_T$ , pero la muestra no es estable frente a la coalescencia en almacenamiento prolongado. El film interfacial en esta muestra, formado por proteínas y polisacáridos liberados durante el tratamiento térmico, tiene una baja capacidad emulsionante, formando una emulsión con gotas grandes y además no es lo suficientemente resistente para mantenerlas estables en el tiempo.

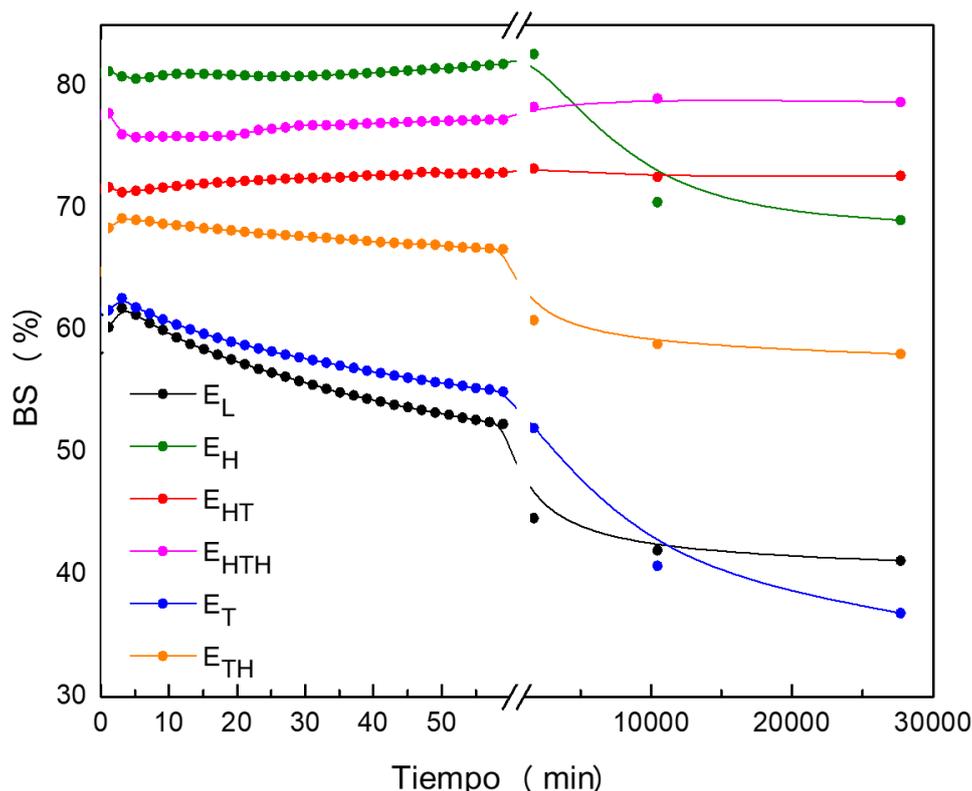


Figura 6.9. Estabilidad de la fase crema de las muestras EL, EH, EHT, EHTH, ET y ETH.

Por otro lado, en las muestras EHT y EHTH se observa que el %BS es constante durante el almacenamiento prolongado, señalando la mayor estabilidad a la coalescencia de estas muestras, incluso respecto de la muestra EH que fue más estable al cremado. Estos resultados confirmarían que los agregados tridimensionales formados durante el tratamiento térmico entre proteínas y polisacáridos, se adsorben de manera fuerte en la interfase, formando un film más resistente que el de las partículas micronizadas de la muestra EH [124]. Sumado a esto, las partículas no adsorbidas en la interfase forman estructuras tipo red tridimensional que inmovilizan a las gotas de aceite, evitando su movimiento. Este efecto es mayor cuando la concentración de partículas insolubles no adsorbidas es elevada y cuando hay interacciones suficientes entre ellas para formar una red estable [135]. En la emulsión EH, si bien inicialmente se obtiene una fase crema hidratada, las partículas sedimentan rápidamente favoreciendo la coalescencia de las gotas de aceite. Además de las diferencias estructurales entre la muestra H y las muestras

HT y HTH, otro factor que puede causar la coalescencia a largo plazo de la muestra E<sub>H</sub>, es la actividad enzimática de la dispersión. Como se discutió en el **Capítulo 3**, las enzimas presentes en esta dispersión pueden hidrolizar proteínas y otros componentes celulares y modificar el pH de la dispersión. Estos cambios contribuirían también al debilitamiento del film interfacial y a la coalescencia de las gotas de aceite durante un almacenamiento prolongado.

## 6.5. Resumen de resultados y conclusiones parciales

- Aunque la composición porcentual de las dispersiones de levadura no se modifica, el tipo de tratamiento y el orden aplicado determinan las propiedades emulsionantes de las dispersiones de levadura.
- Las dispersiones que fueron tratadas térmicamente antes de la homogeneización (T y TH) formaron coágulos compactos dentro de las células, los cuales poseen baja actividad interfacial. Las emulsiones formadas a partir de estas dispersiones tuvieron tamaños de gota mayores que la muestra E<sub>H</sub> y fueron muy inestables frente al cremado y a la coalescencia. Además, debido a la baja hidratación de estas partículas insolubles y la presencia de cápsulas de pared sin micronizar (en la muestra TH en menor proporción que en la muestra T), las emulsiones E<sub>T</sub> y E<sub>TH</sub> también fueron inestables frente a la sedimentación.
- En las dispersiones que fueron tratadas térmicamente después de la homogeneización (HT y HTH), la coagulación de proteínas citoplasmáticas y mananoproteínas y el desplegamiento de los β-glucanos durante el tratamiento térmico permitió la formación de agregados con estructuras tridimensionales abiertas. A pesar de que la dispersabilidad proteica fue mucho menor que la de la muestra H, estas dispersiones generaron un mayor aumento de la presión interfacial respecto del resto de las dispersiones, demostrando la actividad interfacial de los agregados insolubles.
- Las dispersiones HT y HTH, aunque generaron un mayor aumento de la presión interfacial, formaron emulsiones con tamaño de gota más grande que el de la muestra E<sub>H</sub>. Sin embargo, gracias a la formación de redes tridimensionales que retienen gran cantidad de agua e inmovilizan a las gotas de aceite, estas emulsiones son más estables frente a los procesos de sedimentación y coalescencia durante el almacenamiento prolongado. Además, estas emulsiones a

diferencia de la  $E_H$ , son estables a cambios producidos enzimáticamente durante el almacenamiento.

- Entre las dispersiones HT y HTH no se encontraron diferencias significativas respecto de la presión interfacial ni en la estabilidad frente a la coalescencia o a la sedimentación de las emulsiones que forman, durante el tiempo de almacenamiento estudiado. La emulsión  $E_{HTH}$  presentó una fase crema más hidratada y menor tamaño de gota, que favorecerían la estabilidad de la emulsión en un periodo de tiempo más prolongado. Por otro lado, la dispersión HT generó un mayor aumento de la viscosidad de la fase continua y debido al mayor tamaño de sus agregados formaría redes tridimensionales más estables capaces de inmovilizar a las gotas de aceite, logrando una mayor estabilidad. Por lo tanto, ambas muestras poseen atributos favorables para la formación y estabilización de una emulsión.

# **CAPÍTULO 7**

## **CONCLUSIONES GENERALES**

## CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES GENERALES

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es una buena fuente de proteínas e hidratos de carbono no asimilables ( $\beta$ -glucanos y mananos). Sin embargo, debido a su estructura que cuenta con una rígida pared celular, sus componentes tienen reducida digestibilidad y no poseen buenas propiedades funcionales.

Se demostró en este trabajo que la homogeneización a una presión igual o superior a 1000 bar es un método efectivo para lograr la ruptura celular y micronización de la pared, siendo 1250 bar la condición óptima de ruptura, con un mayor porcentaje de micronización y menor aumento de temperatura durante este proceso.

La homogeneización a alta presión de la levadura permite la solubilización o dispersabilización de componentes con actividad interfacial, como proteínas citoplasmáticas,  $\beta$ -glucanos y mananoproteínas de pared celular y fosfolípidos de membrana. Estos componentes permiten la formación de emulsiones con tamaños de gota relativamente chicos. Por otro lado, los  $\beta$ -glucanos insolubles, con alta capacidad de hidratación, aumentan la viscosidad de la fase continua, aumentando la estabilidad de la emulsión. Sin embargo, estos componentes insolubles sedimentan rápidamente, lo cual favorece al cremado y a la coalescencia de las emulsiones. Aunque la estabilidad de las emulsiones preparadas con levadura micronizada ( $E_{H1000}$ ,  $E_{H1250}$  y  $E_{H1500}$ ) fue mayor que la de la muestra  $E_{H750}$ , todas las emulsiones fueron bastante inestables físicamente. Adicionalmente, las dispersiones de levadura homogeneizadas conservan sus enzimas activas (proteasas, peptidasas, glucanasas, entre otras) degradando a la muestra durante el almacenamiento. Esta degradación de los componentes celulares contribuiría también a la desestabilización física de las emulsiones.

A partir del tratamiento térmico solo o combinado con la homogeneización a alta presión, se obtuvieron las muestras T, TH, HT y HTH, estables frente a la degradación enzimática. La dispersabilidad de los componentes celulares de estas dispersiones varía

según el tipo de tratamiento aplicado. La dispersabilidad proteica disminuye con el tratamiento térmico, mientras que la dispersabilidad de hidratos de carbono y ácidos nucleicos aumentan con la cantidad de tratamientos realizados, independientemente si son térmicos o de homogeneización. Se demostró además que las características de las dispersiones, como tamaño de partícula, capacidad de retención de agua, estabilidad frente a la sedimentación y acción tensioactiva dependen fuertemente del tipo y orden de los tratamientos aplicados.

El tratamiento térmico sin previa homogeneización (muestra T) provoca la coagulación de las proteínas intracelulares y de pared, formando agregados compactos que la hacen más resistente a la homogeneización posterior. La dispersabilidad proteica de la muestra que solo tuvo tratamiento térmico fue baja al igual que la de la muestra obtenida a partir de su homogeneización (muestra TH). Los agregados proteicos compactos formados dentro de la célula en ambas dispersiones tienen baja actividad interfacial, dando emulsiones ( $E_T$  y  $E_{TH}$ ) con tamaños de gota mucho mayores que los de la muestra  $E_H$  y que se desestabilizan por cremado y coalescencia rápidamente. Sumado a esto, las partículas poco hidratadas sedimentan a gran velocidad, favoreciendo la desestabilización global de las emulsiones.

El tratamiento térmico aplicado a la levadura homogeneizada (muestra HT) forma agregados insolubles, formados por proteínas y polisacáridos, con actividad tensioactiva y gran capacidad de retención de agua. La emulsión formada con esta dispersión se desestabiliza por cremado pero forma una fase crema hidratada y estable frente a la coalescencia y sedimentación, debido a que los agregados tienen estructuras tridimensionales abiertas que se colocan en la interfase y aumentan la presión interfacial, estabilizando a la emulsión. Adicionalmente, los agregados que no se adsorben en la interfase, quedan anclados en la fase acuosa ocluida entre las gotas, inmovilizando a las gotas de aceite, contribuyendo a la estabilidad de la emulsión.

La dispersión HTH, presentó una menor viscosidad respecto de la muestra HT debido a la disminución de tamaño de partícula de los agregados. Sin embargo, las propiedades tensioactivas se conservaron y formó emulsiones con tamaño de gota más pequeño que  $E_{HT}$ . Durante el periodo de almacenamiento estudiado, no hubo diferencias significativas en la estabilidad frente a la coalescencia y sedimentación respecto de la muestra  $E_{HT}$ , demostrando que aunque disminuya el tamaño de los agregados, mantienen las mismas características emulsionantes y estabilizantes. Sin embargo, teniendo en cuenta el mayor tiempo de preparación de esta muestra y los costos asociados a una segunda homogeneización si el proceso se realizara a escala industrial, la muestra HT sería una opción más viable que la muestra HTH.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que las dispersiones de levadura, con tratamientos térmicos y de homogeneización adecuados, son sistemas multicomponentes naturales, capaces de formar y estabilizar emulsiones. Además, los componentes solubles e insolubles actúan de forma sinérgica, siendo esta una ventaja ya que no son necesarias etapas de separación y purificación de componentes aislados. Teniendo en cuenta que la levadura es un microorganismo *GRAS* y que la tecnología utilizada es escalable a nivel industrial, la dispersión HT es un ingrediente con gran potencial para ser utilizado como emulsionante y estabilizante en emulsiones alimenticias. Debido a su origen, este ingrediente podría utilizarse en alimentos veganos y en emulsiones aptas para personas alérgicas al huevo y sus derivados. Además representa una buena fuente de proteínas de elevada calidad y  $\beta$ -glucanos y mananoproteínas con demostrada actividad prebiótica.

Durante la realización de esta tesis, los resultados parciales obtenidos permitieron abrir nuevas líneas de investigación en el campo de las emulsiones, las cuales se mencionan a continuación:

- *Mejora nutricional de sopa enlatada a base de vegetales y carne picada (Super Sopa) por el agregado de levadura de cerveza nutricional.* A partir de este trabajo

se evidenció que el agregado de levadura a la sopa, no solo mejoraba las propiedades nutricionales del producto, sino que modificaba las características sensoriales como aroma, sabor, color y consistencia. Se demostró que el tratamiento térmico aplicado al producto enlatado (autoclavado) liberaba compuestos de la célula de levadura que mejoraban la emulsificación del producto, otorgando una consistencia más cremosa y homogénea [136].

- *Aderezo emulsionado bajo en valor lipídico a base de levadura homogeneizada:* Este trabajo se desarrolló en base a los primeros resultados de esta tesis. Se logró obtener una emulsión similar mayonesa, utilizando levadura homogeneizada a alta presión como agente emulsionante y estabilizada con goma guar, goma xantán y almidón modificado. El producto obtenido tuvo una consistencia similar a una mayonesa y fue estable frente a la coalescencia durante al menos 28 días. Para aumentar la vida útil del producto se realizó un tratamiento térmico leve (80 °C – 5 min) antes de la homogeneización y se adicionó ácido sórbico como conservante [137].
- *Postre sabor chocolate a base de levadura homogeneizada:* en este trabajo se desarrolló un postre emulsionado a base de levadura homogeneizada a alta presión. El producto obtenido fue pasteurizado para aumentar la vida útil y este tratamiento térmico aplicado luego de realizada la emulsión demostró aumentar la estabilidad frente a la coalescencia respecto del postre no tratado térmicamente. En la formulación se utilizó goma xantán como estabilizante y la consistencia del producto fue similar a la de postres lácteos encontrados en el mercado [138].

Los tres trabajos mencionados fueron presentados como trabajos finales de la carrera Ingeniería en Alimentos y junto con los resultados de esta tesis demuestran la potencialidad del uso de levadura para la formulación de emulsiones alimenticias dulces y saladas.

# Bibliografía

## Bibliografía

- [1] Kurtzman, C., Fell, J.W. and Boekhout, T. (2011) *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.
- [2] McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A. et al. (2004) Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, National Acad Sciences. 101, 17593–8.
- [3] Samuel, D. (1996) Archaeology of ancient Egyptian beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Taylor & Francis. 54, 3–12.
- [4] Almazán Del Olmo, O Y Cabello Balbín, A. (2008) Historia de las levaduras, los hitos y el estado del arte. In: Wagner, J.R. Otero Rambla M. y GL, editor. *Las Levaduras y Sus Productos Derivados Como Ingredientes En La Industria de Alimentos*, Universidad Nacional de Quilmes, Quilmes.
- [5] Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N.A. and Guevara-Rodríguez, C.A. (2016) Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. 50, 20–8.
- [6] Lodolo, E.J., Kock, J.L.F., Axcell, B.C. and Brooks, M. (2008) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - The main character in beer brewing. *FEMS Yeast Research*, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK. 8, 1018–36.
- [7] Wagner J., Sceni P. y Otero Rambla, M. (2008) Aislamiento, propiedades térmicas y funcionales de proteínas de levadura. In: Wagner, J.R, Otero Rambla, M.A y Guerrero Legarreta I, editor. *Las Levaduras y Sus Productos Derivados Como Ingredientes En La Industria de Alimentos*, Universidad Nacional de Quilmes, Quilmes.

- [8] Müller, S. and Lösche, A. (2004) Population profiles of a commercial yeast strain in the course of brewing. *Journal of Food Engineering*, Elsevier. 63, 375–81.
- [9] Walker, G.M. (1998) Yeast physiology and biotechnology. John Wiley & Sons.
- [10] Srinorakutara, T. (1998) Determination of yeast cell wall thickness and cell diameter using new methods. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Elsevier. 86, 253–60.
- [11] Ayazi Shamlou, P., Siddiqi, S.F. and Titchener-Hooker, N.J. (1995) A physical model of high-pressure disruption of bakers' yeast cells. *Chemical Engineering Science*, Elsevier. 50, 1383–91.
- [12] García, R. (2008) Estructura celular y funciones. In: Wagner, J.R, Otero Rambla, M.A y Guerrero Legarreta I, editor. *Las Levaduras y Sus Productos Derivados Como Ingredientes En La Industria de Alimentos*, Universidad Nacional de Quilmes, Quilmes.
- [13] Lesage, G. and Bussey, H. (2006) Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Am Soc Microbiol. 70, 317–43.
- [14] Gow, N.A.R., Latge, J.-P. and Munro, C.A. (2017) The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *The Fungal Kingdom*, Wiley Online Library. 267–92.
- [15] Kapteyn, J.C., Van Den Ende, H. and Klis, F.M. (1999) The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, Elsevier. 1426, 373–83.
- [16] Moran, C.A. (2004) Functional components of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*: applications for yeast glucan and mannan. *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries Proceedings of Alltech's 20th Annual Symposium: Re-Imagining the Feed Industry*, Nottingham University Press. 283–96.
- [17] Schreuder, M.P., Mooren, A.T.A., Toschka, H.Y., Verrips, C.T. and Klis, F.M. (1996)

- Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. *Trends in Biotechnology*, Elsevier Current Trends. 14, 115–20.
- [18] Barriga, J.A.T., Cooper, D.G., Idziak, E.S. and Cameron, D.R. (1999) Components of the bioemulsifier from *S. cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, Elsevier. 25, 96–102.
- [19] Magnelli, P., Cipollo, J.F. and Abeijon, C. (2002) A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and  $\beta$ -1,6-glucan fine structure. *Analytical Biochemistry*, Elsevier. 301, 136–50.
- [20] Liu, X.Y., Wang, Q., Cui, S.W. and Liu, H.Z. (2008) A new isolation method of  $\beta$ -d-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Hydrocolloids*, Elsevier. 22, 239–47.
- [21] Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K. and Brul, S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK. 26, 239–56.
- [22] Pardo, M. and Nurse, P. (2005) The nuclear rim protein Amo1 is required for proper microtubule cytoskeleton organisation in fission yeast. *Journal of Cell Science*, The Company of Biologists Ltd. 118, 1705–14.
- [23] Jach, M.E. and Serefko, A. (2018) Nutritional yeast biomass: Characterization and application. *Diet, Microbiome and Health*, Elsevier. p. 237–70.
- [24] Birch, A.N., Petersen, M.A., Arneborg, N. and Hansen, Å.S. (2013) Influence of commercial baker's yeasts on bread aroma profiles. *Food Research International*, Elsevier. 52, 160–6.
- [25] Wehrle, K. and Arendt, E.K. (1998) Rheological changes in wheat sourdough during controlled and spontaneous fermentation. *Cereal Chemistry*, Wiley Online Library. 75, 882–6.

- [26] Otero Rambla, M.A. (2008) Levaduras residuales. In: Wagner, J.R, Otero Rambla, M.A y Guerrero Legarreta I, editor. *Las Levaduras y Sus Productos Derivados Como Ingredientes En La Industria de Alimentos*, Universidad Nacional de Quilmes, Quilmes.
- [27] Ferreira, I.M.P.L.V.O., Pinho, O., Vieira, E. and Tavela, J.G. (2010) Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends in Food Science and Technology*, Elsevier. 21, 77–84.
- [28] Bekatorou, A., Psarianos, C. and Koutinas, A.A. (2006) Production of food grade yeasts. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 407–15.
- [29] Valles, B.S., Bedriñana, R.P., Tascón, N.F., Simón, A.Q. and Madrera, R.R. (2007) Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology*, Elsevier. 24, 25–31.
- [30] Carrau, F.M. (2005) Levaduras Nativas Para Enología De Mínima Intervención. *Agrociencia-Sitio En Reparación*, IX, 389.
- [31] Soriano Santos, J. y Guerrero Legarreta, I. (2008) Levadura como complemento alimentario para humanos. In: Wagner, J.R, Otero Rambla, M.A y Guerrero Legarreta I, editor. *Las Levaduras y Sus Productos Derivados Como Ingredientes En La Industria de Alimentos*, Universidad Nacional de Quilmes, Quilmes.
- [32] Yamada, E.A. and Sgarbieri, V.C. (2005) Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) protein concentrate: Preparation, chemical composition, and nutritional and functional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ACS Publications. 53, 3931–6.
- [33] Pacheco, M.T.B., Caballero-Córdoba, G.M. and Sgarbieri, V.C. (1997) Composition and nutritive value of yeast biomass and yeast protein concentrates. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, Center for Academic Publications Japan. 43, 601–12.

- [34] Nasserri, A.T., Rasoul-Amini, S., Morowvat, M.H. and Ghasemi, Y. (2011) Single cell protein: Production and process. *American Journal of Food Technology*, Academic Journals. 6, 103–16.
- [35] Halász, A. and Lásztity, R. (2017) Use of yeast biomass in food production. *Use Yeast Biomass Food Prod.* Routledge.
- [36] Cabello Balbín, A.J. (2008) Las levaduras como alimento. In: Wagner, J.R., Otero Rambla, M.A y Guerrero Legarreta I, editor. *Las Levaduras y Sus Productos Derivados Como Ingredientes En La Industria de Alimentos*, Universidad Nacional de Quilmes, Quilmes.
- [37] Edozien, J.C., Udo, U.U., Young, V.R. and Scrimshaw, N.S. (1970) Effects of high levels of yeast feeding on uric acid metabolism of young men. *Nature*, Nature Publishing Group. 228, 180.
- [38] Onofre, S.B., Bertoldo, I.C., Abatti, D. and Refosco, D. (2017) Chemical Composition of the Biomass of *Saccharomyces cerevisiae* - (Meyen ex E. C. Hansen, 1883) Yeast obtained from the Beer Manufacturing Process. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, AI Publications. 2, 558–62.
- [39] Thammakiti, S., Suphantharika, M., Phaesuwan, T. and Verduyn, C. (2004) Preparation of spent brewer's yeast  $\beta$ -glucans for potential applications in the food industry. *International Journal of Food Science and Technology*, Wiley Online Library. 39, 21–9.
- [40] Freimund, S., Sauter, M., Käppeli, O. and Dutler, H. (2003) A new non-degrading isolation process for 1,3- $\beta$ -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Polymers*, Elsevier. 54, 159–71.
- [41] Borchani, C., Fonteyn, F., Jamin, G., Paquot, M., Blecker, C. and Thonart, P. (2014) Enzymatic process for the fractionation of baker's yeast cell wall (*Saccharomyces cerevisiae*). *Food Chemistry*, Elsevier. 163, 108–13.

- [42] Kogan, G. (2000) 1-3, 1-6 Beta D-Glucans of yeasts and fungi and their biological activity. *Science*, Elsevier. p. 107–52.
- [43] Li, J., Karboune, S., Sedman, J. and Ismail, A. (2020) Characterization of the structural properties of mannoproteins isolated from selected yeast-based products upon the enzymatic treatment. *Lwt*, Elsevier. 131, 109596.
- [44] Pacheco, M.T.B. and Sgarbieri, V.C. (1998) Hydrophilic and rheological properties of Brewer's yeast protein concentrates. *Journal of Food Science*, Wiley Online Library. 63, 238–43.
- [45] Otero Rambla, M.A. and Cabello Balbín, A.. (2007) Procesamiento de levadura para la obtención de derivados. Diferentes alternativas. *ICIDCA : Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. 41, 2–11.
- [46] Bzducha-Wróbel, A., Błazejak, S., Kawarska, A., Stasiak-Rózańska, L., Gientka, I. and Majewska, E. (2014) Evaluation of the efficiency of different disruption methods on yeast cell wall preparation for  $\beta$ -glucan isolation. *Molecules*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute. 19, 20941–61.
- [47] Otero, M.A., Guerrero, I., Wagner, J.R., Cabello, A.J., Sceni, P., Garcíá, R. et al. (2011) Yeast and its derivatives as ingredients in the food industry. *Biotechnologia Aplicada*, 28, 272–5.
- [48] Zhu, F., Du, B. and Xu, B. (2016) A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocolloids*, Elsevier. 52, 275–88.
- [49] Worrasinchai, S., Supphantharika, M., Pinjai, S. and Jamnong, P. (2006)  $\beta$ -Glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. *Food Hydrocolloids*, Elsevier. 20, 68–78.
- [50] Fernandez, V.E., Palazolo, G.G., Bosisio, N.A., Martínez, L.M. and Wagner, J.R.

- (2012) Rheological properties and stability of low-in-fat dressings prepared with high-pressure homogenized yeast. *Journal of Food Engineering*, Elsevier. 111, 57–65.
- [51] Da Silva Araújo, V.B., De Melo, A.N.F., Costa, A.G., Castro-Gomez, R.H., Madruga, M.S., Souza, E.L. De et al. (2014) Followed extraction of  $\beta$ -glucan and mannoprotein from spent brewer's yeast (*Saccharomyces uvarum*) and application of the obtained mannoprotein as a stabilizer in mayonnaise. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Elsevier. 23, 164–70.
- [52] Li, J. and Karboune, S. (2018) A comparative study for the isolation and characterization of mannoproteins from *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell wall. *International Journal of Biological Macromolecules*, Elsevier. 119, 654–61.
- [53] Martínez, J.M., Cebrián, G., Álvarez, I. and Raso, J. (2016) Release of mannoproteins during *saccharomyces cerevisiae* autolysis induced by pulsed electric field. *Frontiers in Microbiology*, Frontiers. 7, 1435.
- [54] De Iseppi, A., Curioni, A., Marangon, M., Vincenzi, S., Kantureeva, G. and Lomolino, G. (2019) Characterization and emulsifying properties of extracts obtained by physical and enzymatic methods from an oenological yeast strain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Wiley Online Library. 99, 5702–10.
- [55] Chalier, P., Angot, B., Delteil, D., Doco, T. and Gunata, Z. (2007) Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chemistry*, Elsevier. 100, 22–30.
- [56] Huang, Y.T. and Kinsella, J.E. (1986) Functional Properties of Phosphorylated Yeast Protein: Solubility, Water-Holding Capacity, and Viscosity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ACS Publications. 34, 670–4.
- [57] Huang, Y.T. and Kinsella, J.E. (1987) Effects of Phosphorylation on Emulsifying and Foaming Properties and Digestibility of Yeast Protein. *Journal of Food Science*, Wiley Online Library. 52, 1684–8.

- [58] Chae, H.J., Joo, H. and In, M.J. (2001) Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: Effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. *Bioresource Technology*, Elsevier. 76, 253–8.
- [59] Champagne, C.P., Barrette, J. and Goulet, J. (1999) Interaction between pH, autolysis promoters and bacterial contamination on the production of yeast extracts. *Food Research International*, Elsevier. 32, 575–83.
- [60] Chisti, Y. and Moo-Young, M. (1986) Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme and Microbial Technology*, Elsevier. 8, 194–204.
- [61] Geciova, J., Bury, D. and Jelen, P. (2002) Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - A review. *International Dairy Journal*, Elsevier. 12, 541–53.
- [62] Middelberg, A.P.J. (1995) Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology Advances*, Elsevier. 13, 491–551.
- [63] Bookman, J.S.. (1974) Mechanism of cell disintegration in a high pressure homogenizer. *Biotechnology and Bioengineering*, Wiley Online Library. 16, 371–83.
- [64] Islam, M.S., Aryasomayajula, A. and Selvaganapathy, P.R. (2017) A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute. 8, 83.
- [65] Liu, D., Ding, L., Sun, J., Boussetta, N. and Vorobiev, E. (2016) Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds — A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Elsevier. 36, 181–92.
- [66] Spiden, E.M., Scales, P.J., Kentish, S.E. and Martin, G.J.O. (2013) Critical analysis of quantitative indicators of cell disruption applied to *Saccharomyces cerevisiae* processed with an industrial high pressure homogenizer. *Biochemical Engineering*

- Journal*, Elsevier. 70, 120–6.
- [67] Wagner J., Sceni P. y Otero Rambla, M. (2008) Ruptura celular y fraccionamiento. In: Wagner, J.R, Otero Rambla, M.A y Guerrero Legarreta I, editor. *Las Levaduras y Sus Productos Derivados Como Ingredientes En La Industria de Alimentos*, Universidad Nacional de Quilmes, Quilmes.
- [68] Lörincz, A. (2004) Ultrasonic cellular disruption of yeast in water-based suspensions. *Biosystems Engineering*, Elsevier. 89, 297–308.
- [69] Cameron, D.R., Cooper, D.G. and Neufeld, R.J. (1988) The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Applied and Environmental Microbiology*, Am Soc Microbiol. 54, 1420–5.
- [70] Laroche, C. and Michaud, P. (2008) New developments and prospective applications for  $\beta$  (1, 3) glucans. *Recent Patents on Biotechnology*, Bentham Science Publishers. 1, 59–73.
- [71] Tanguler, H. and Erten, H. (2008) Utilisation of spent brewer's yeast for yeast extract production by autolysis: The effect of temperature. *Food and Bioproducts Processing*, Elsevier. 86, 317–21.
- [72] Suphantharika, M., Khunrae, P., Thanardkit, P. and Verduyn, C. (2003) Preparation of spent brewer's yeast  $\beta$ -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Bioresource Technology*, Elsevier. 88, 55–60.
- [73] Magnani, M., Calliari, C.M., de Macedo, F.C., Mori, M.P., de Syllos Cólus, I.M. and Castro-Gomez, R.J.H. (2009) Optimized methodology for extraction of (1  $\rightarrow$  3)(1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative. *Carbohydrate Polymers*, Elsevier. 78, 658–65.

- [74] Dimopoulos, G., Tsantes, M. and Taoukis, P. (2020) Effect of high pressure homogenization on the production of yeast extract via autolysis and beta-glucan recovery. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Elsevier. 62, 102340.
- [75] Wagner J., Sceni P. y Otero Rambla, M. (2008) Polisacáridos estructurales de levadura. Glucanos y mananos. In: Wagner, J.R, Otero Rambla, M.A y Guerrero Legarreta I, editor. *Las Levaduras y Sus Productos Derivados Como Ingredientes En La Industria de Alimentos*, Universidad Nacional de Quilmes, Quilmes.
- [76] Kinsella, J.E. and Damodaran, S. (1984) Dissociation of Yeast Nucleoprotein Complexes by Chemical Phosphorylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ACS Publications. 32, 1030–2.
- [77] Schramm, L.L. (2014) Emulsions, Foams, Suspensions, and Aerosols: Microscience and Applications, 2nd Edition. Emuls. Foam. Suspens. Aerosols Microscience Appl. 2nd Ed. John Wiley & Sons.
- [78] Benichou, A., Aserin, A. and Garti, N. (2007) O/W/O double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide conjugates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Elsevier. 297, 211–20.
- [79] McClements, D.J. (2015) Food emulsions: principles, practices, and techniques. CRC press.
- [80] Palazolo, G.G. (2006) Formación y estabilidad de emulsiones o/w preparadas con proteínas nativas y desnaturalizadas de soja. Universidad Nacional de La Plata.
- [81] Tadros, T.F. (2009) Emulsion Science and Technology. *Emulsion Science and Technology*, Wiley Online Library. 1, 1–326.
- [82] Danner, T. and Schubert, H. (2007) Coalescence processes in emulsions. *Food Colloids*, 116–24.

- [83] McClements, D.J. and Jafari, S.M. (2018) Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, Elsevier. 251, 55–79.
- [84] Damodaran, S., Parkin, K.L. (Kirk L. and Fennema, O.R. (2008) Fennema's food chemistry; Food chemistry. 5ta ed. CRC Press.
- [85] Davis, H.T. (1994) Factors determining emulsion type: Hydrophile-lipophile balance and beyond. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Elsevier. 91, 9–24.
- [86] Muñoz, J., Alfaro, M.D.C. and Zapata, I. (2007) Avances en la formulación de emulsiones. *Grasas y Aceites*, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Instituto de la Grasa. 58, 64–73.
- [87] Castellani, O., Belhomme, C., David-Briand, E., Guérin-Dubiard, C. and Anton, M. (2006) Oil-in-water emulsion properties and interfacial characteristics of hen egg yolk phospholipids. *Food Hydrocolloids*, Elsevier. 20, 35–43.
- [88] Goh, K.K.T., Teo, A., Sarkar, A. and Singh, H. (2020) Milk protein-polysaccharide interactions. *Milk Proteins*, Elsevier. p. 499–535.
- [89] Firoozmand, H. and Rousseau, D. (2016) Microbial cells as colloidal particles: Pickering oil-in-water emulsions stabilized by bacteria and yeast. *Food Research International*, Elsevier. 81, 66–73.
- [90] Yang, Y., Fang, Z., Chen, X., Zhang, W., Xie, Y., Chen, Y. et al. (2017) An overview of Pickering emulsions: solid-particle materials, classification, morphology, and applications. *Frontiers in Pharmacology*, Frontiers. 8, 287.
- [91] Perrin, L., Gillet, G., Gressin, L. and Desobry, S. (2020) Interest of Pickering Emulsions for Sustainable Micro/Nanocellulose in Food and Cosmetic Applications. *Polymers*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute. 12, 2385.

- [92] Berton-Carabin, C.C. and Schroën, K. (2015) Pickering emulsions for food applications: background, trends, and challenges. *Annual Review of Food Science and Technology*, Annual Reviews. 6, 263–97.
- [93] Association of Official Analytical Chemists. (2000) Official Methods of Analysis. AOAC International Gaithersburg.
- [94] Rut, M. (1973) Determination of nucleic acids in yeast. *Kvasny Prumysl*, 19, 131–3.
- [95] Nkonge, C. and Ballance, G.M. (1982) A Sensitive Colorimetric Procedure for Nitrogen Determination in Micro-Kjeldahl Digests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ACS Publications. 30, 416–20.
- [96] Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, ACS Publications. 28, 350–6.
- [97] Pilosof, A.M.R. and Bartholomai, G.B. (2000) Caracterización Funcional y Estructural de Proteínas. *CYTE–Eudeba, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina*.
- [98] Benitez, E.I., Genovese, D.B. and Lozano, J.E. (2007) Scattering efficiency of a cloudy apple juice: Effect of particles characteristics and serum composition. *Food Research International*, Elsevier. 40, 915–22.
- [99] Ramírez-Hernández, A., Aguilar-Flores, C. and Aparicio-Saguilán, A. (2019) Análisis en la huella dactilar de espectros FTIR de polímeros que contienen etileno/Fingerprint analysis of FTIR spectra of polymers containing vinyl acetate. *Dyna*, Universidad Nacional de Colombia. 86, 198.
- [100] Burattini, E., Cavagna, M., Dell’Anna, R., Campeggi, F.M., Monti, F., Rossi, F. et al. (2008) A FTIR microspectroscopy study of autolysis in cells of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Vibrational Spectroscopy*, Elsevier. 47, 139–47.

- [101] Kuligowski, J., Quintás, G., Herwig, C. and Lendl, B. (2012) A rapid method for the differentiation of yeast cells grown under carbon and nitrogen-limited conditions by means of partial least squares discriminant analysis employing infrared micro-spectroscopic data of entire yeast cells. *Talanta*, Elsevier. 99, 566–73.
- [102] TA Instruments. (2007) Differential Scattering Calorimeter (DSC). Getting Starting Guide.
- [103] Ramírez-Navas, J.S. (2006) Introducción a la reología de los alimentos. Revista ReCiTeIA.
- [104] Rawle, A. (2003) Basic of principles of particle-size analysis. *Surface Coatings International Part A, Coatings Journal*, Surfex. 86, 58–65.
- [105] Mengual, O., Meunier, G., Cayré, I., Puech, K. and Snabre, P. (1999) TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*, Elsevier. 50, 445–56.
- [106] Lemarchand, C., Couvreur, P., Vauthier, C., Costantini, D. and Gref, R. (2003) Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan. *International Journal of Pharmaceutics*, Elsevier. 254, 77–82.
- [107] Palazolo, G.G., Sorgentini, D.A. and Wagner, J.R. (2004) Emulsifying properties and surface behavior of native and denatured whey soy proteins in comparison with other proteins. Creaming stability of oil-in-water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Springer. 81, 625–32.
- [108] Palazolo, G.G., Sorgentini, D.A. and Wagner, J.R. (2005) Coalescence and flocculation in o/w emulsions of native and denatured whey soy proteins in comparison with soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, Elsevier. 19, 595–604.
- [109] Sceni, P. and Wagner, J.R. (2007) Study on sodium caseinate foam stability by multiple light scattering. *Food Science and Technology International*, Sage

- Publications Sage UK: London, England. 13, 461–8.
- [110] Pan, L.G., Tomás, M.C. and Añón, M.C. (2002) Effect of sunflower lecithins on the stability of water-in-oil and oil-in-water emulsions. *Journal of Surfactants and Detergents*, Springer. 5, 135–43.
- [111] Maldonado Valderrama, J. (2006) Caracterización interfacial de proteínas y tensioactivos: aplicación a dispersiones alimentarias. Granada: Universidad de Granada.
- [112] Gómez, M.P. (2011) Obtención y aplicaciones de la tensión superficial e interfacial de líquidos mediante el tensiómetro DCAT 11EC en el Laboratorio Nacional de Nanotecnología LANOTEC- CENAT-CONARE.
- [113] Sceni, P., Palazolo, G.G., del Carmen Vasallo, M., Puppo, M.C., Otero, M.A. and Wagner, J.R. (2009) Thermal and surface behavior of yeast protein fractions from *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT-Food Science and Technology*, Elsevier. 42, 1098–106.
- [114] Martínez-Rodríguez, A.J., Polo, M.C. and Carrascosa, A. V. (2001) Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines. *International Journal of Food Microbiology*, Elsevier. 71, 45–51.
- [115] Hoekstra, A., Maltsev, V. and Videen, G. (2007) Optics of biological particles. Springer Science & Business Media.
- [116] Salman, A., Tsrur, L., Pomerantz, A., Moreh, R., Mordechai, S. and Huleihel, M. (2010) FTIR spectroscopy for detection and identification of fungal phytopathogenes. *Spectroscopy*, IOS press. 24, 261–7.
- [117] Mihoubi, W., Sahli, E., Gargouri, A. and Amiel, C. (2017) FTIR spectroscopy of whole cells for the monitoring of yeast apoptosis mediated by p53 over-expression and its suppression by *Nigella sativa* extracts. *PLoS One*, Public Library of Science San

- Francisco, CA USA. 12, e0180680.
- [118] Delgado, J.F., Peltzer, M.A., Salvay, A.G., de la Osa, O. and Wagner, J.R. (2018) Characterization of thermal, mechanical and hydration properties of novel films based on *Saccharomyces cerevisiae* biomass. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Elsevier. 48, 240–7.
- [119] Kong, J. and Yu, S. (2007) Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, Wiley Online Library. 39, 549–59.
- [120] Araújo, D., Alves, V.D., Lima, S.A.C., Reis, S., Freitas, F. and Reis, M.A.M. (2020) Novel hydrogels based on yeast chitin-glucan complex: Characterization and safety assessment. *International Journal of Biological Macromolecules*, Elsevier. 156, 1104–11.
- [121] Azema, N. (2006) Sedimentation behaviour study by three optical methods—granulometric and electrophoresis measurements, dispersion optical analyser. *Powder Technology*, Elsevier. 165, 133–9.
- [122] Santipanichwong, R. and Suphantharika, M. (2007) Carotenoids as colorants in reduced-fat mayonnaise containing spent brewer's yeast  $\beta$ -glucan as a fat replacer. *Food Hydrocolloids*, Elsevier. 21, 565–74.
- [123] Salgado, M., Rodríguez-Rojo, S. and Cocero, M.J. (2017) Barley and yeast  $\beta$ -glucans as new emulsifier agents for the development of aqueous natural antifungal formulations. *Carbohydrate Polymers*, Elsevier. 174, 1114–20.
- [124] Porfiri, M.C., Vaccaro, J., Stortz, C.A., Navarro, D.A., Wagner, J.R. and Cabezas, D.M. (2017) Insoluble soybean polysaccharides: Obtaining and evaluation of their O/W emulsifying properties. *Food Hydrocolloids*, Elsevier. 73, 262–73.
- [125] Cabezas, D.M., Madoery, R., Diehl, B.W.K. and Tomás, M.C. (2012) Emulsifying

- properties of different modified sunflower lecithins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Springer. 89, 355–61.
- [126] Feng, H., Kang, W., Wu, H., Li, Z., Chen, J., Zhou, Q. et al. (2018) Study on the relationship between emulsion stability and droplet dynamics of a spontaneous emulsion for chemical enhanced oil recovery. *Journal of Dispersion Science and Technology*, Taylor & Francis. 39, 1214–22.
- [127] Zalewska, A., Kowalik, J. and Grubecki, I. (2019) Application of turbiscan lab to study the effect of emulsifier content on the stability of plant origin dispersion. *Chemical and Process Engineering*, 40, 399–409.
- [128] Borchani, C., Fonteyn, F., Jamin, G., Paquot, M., Thonart, P. and Blecker, C. (2016) Physical, functional and structural characterization of the cell wall fractions from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, Elsevier. 194, 1149–55.
- [129] Novák, M., Synytsya, A., Gedeon, O., Slepíčka, P., Procházka, V., Synytsya, A. et al. (2012) Yeast  $\beta$  (1-3),(1-6)-d-glucan films: preparation and characterization of some structural and physical properties. *Carbohydrate Polymers*, Elsevier. 87, 2496–504.
- [130] Delgado, J.F., Sceni, P., Peltzer, M.A., Salvay, A.G., de la Osa, O. and Wagner, J.R. (2016) Development of innovative biodegradable films based on biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Elsevier. 36, 83–91.
- [131] Delgado, J.F. (2020) Desarrollo de películas multicomponentes a base de levadura, estudio de sus propiedades físicas y aplicaciones potenciales (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Quilmes.
- [132] Luckham, P.F. and Ukeje, M.A. (1999) Effect of particle size distribution on the rheology of dispersed systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, Elsevier. 220, 347–56.

- [133] Evans, M., Ratcliffe, I. and Williams, P.A. (2013) Emulsion stabilisation using polysaccharide–protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, Elsevier. 18, 272–82.
- [134] Moreira, T.C.P., da Silva, V.M., Gombert, A.K. and da Cunha, R.L. (2016) Stabilization mechanisms of oil-in-water emulsions by *Saccharomyces cerevisiae*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Elsevier. 143, 399–405.
- [135] Yan, X., Ma, C., Cui, F., McClements, D.J., Liu, X. and Liu, F. (2020) Protein-stabilized pickering emulsions: Formation, stability, properties, and applications in foods. *Trends in Food Science & Technology*, Elsevier.
- [136] Rabey, M. (2007) Elaboración de sopa concentrada con agregado de levadura de cerveza deshidratada. Universidad Nacional de Quilmes.
- [137] Bosisio, N.A. and Fernandez, V.E. (2009) Utilización de levadura *saccharomyces cerevisiae* en aderezos sin colesterol de reducido contenido lipídico. Universidad Nacional de Quilmes.
- [138] Di Marco, O. (2012) Estudio de las propiedades interfaciales de la levadura panadera para su aplicación en el desarrollo de alimentos. Universidad Nacional de Quilmes.