

## P6

### DESARROLLO DE GELES BIOACTIVOS BASADOS EN RESIDUOS DE LA INDUSTRIA DEL ARROZ

Felix, M., Perez-Puyana, V., Romero, A., Guerrero, A. Tecnología y Diseño de Productos Multicomponentes (TEP-229). Departamento de Ingeniería Química. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Sevilla.

#### RESUMEN

La industria arrocera produce aproximadamente unos 100 millones de toneladas de residuos cada año. Aunque estos residuos tengan un alto contenido proteico, habitualmente se incineran debido a su alto poder calorífico. Sin embargo, existe una continua y creciente demanda de fuentes de proteína con el fin de poder satisfacer las necesidades de alimentación de la creciente población mundial. Una alternativa interesante sería el uso de concentrados proteicos provenientes de estos residuos para desarrollar productos alimentarios. En este sentido, se ha comprobado que la obtención de hidrolizados proteicos a partir de los concentrados proteicos puede ser una vía altamente interesante, aumentando la funcionalidad de estos sistemas. Por otra parte, en el caso de los productos alimentarios, las propiedades mecánicas no son las únicas que importan. De especial relevancia son las propiedades antioxidantes de estos productos. La evaluación de la capacidad antioxidante de estos sistemas puede llevarse a cabo mediante el empleo de diferentes técnicas. La presente contribución hace uso de un concentrado proteico de arroz (RPC) y dos hidrolizados (RPHA and RPHB) para el desarrollo de geles alimentarios. La caracterización llevada a cabo comprende tanto a la estructura de los sistemas, como a las de las propiedades antioxidantes de los mismos.

**Palabras clave:** *Geles alimentarios, Arroz, Reología, Antioxidante.*

#### ABSTRACT

Rice industry produces around 100 million tons of wastes every year. Although, these wastes generally exhibits a high protein content, they are burned due to its high calorific value. However, scientific community claims continuously for new protein sources in order to satisfy worldwide food requirements. In this sense, one alternative could be the use of protein concentrates from protein surpluses and wastes to develop new food products. Additionally, the use of protein hydrolysates could be very relevant since the functionality of protein may increase. Otherwise, not only the functionality of proteins is relevant in food products, but also the bioactive properties of them is a key factor. Among these bioactive properties, the evaluation of antioxidant properties of food products could involve the increase in value of these by-products. This work deals with the evaluation of a protein concentrate (RPC) and two different protein hydrolysates (RPHA and RPHB) in order to develop food-grade gels. The characterisation carried out include mechanical properties and antioxidant activity of the final gels.

**Keywords:** *Food Gels, Rice, Rheology, Antioxidants.*

#### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La proteína de arroz, presente en la cascara de arroz, es uno de los mayores subproducto de la industria arrocera. La cascarilla de arroz es un residuo agrícola que se producen en grandes cantidades, aproximadamente de cada 100 kg de arroz se obtienen 20 kg de cascarilla. Los mayores productores mundiales son la India, China, Tailandia y Bangladesh (Ferrero y Tinarelli, 2007). En Europa, España junto con Italia son los mayores productores, generándose en España unas 100.000 Tm de cascarilla de arroz. Actualmente la cascarilla de arroz se trata como residuo de la producción, y es incinerada con fines energéticos. El cultivo del arroz en España está muy concentrado, entre cinco comunidades se reparte el 97% del total. Andalucía es la comunidad que produce mayor cantidad con el 40% del total, le sigue Extremadura, con el 23%, la Comunidad Valenciana, con el 15,5%, Cataluña, con el 15%, y Aragón 5,75%. En Andalucía, Sevilla es la primera provincia española en producción de arroz, con 35.000 hectáreas, y especialmente se concentra en las marismas del Guadalquivir, concretamente en los municipios de Isla

Mayor, Puebla del Río, Coria del Río, Los Palacios y Villamanrique de la Condesa. Debido a la importancia del sector del arroz en Andalucía, es de gran utilidad darle un valor añadido a la cascara de arroz. Una de las más interesantes alternativas de estos productos es la producción de productos alimentarios resolviendo un problema de contaminación ambiental (Li, Liu, Liao y Yan, 2010). Si se compara el comportamiento de la proteína de arroz, con otras tradicionalmente utilizadas, se demuestra que la proteína de arroz es una materia prima adecuada para este uso (Romero y col., 2012).

Por otra parte, el uso de este tipo de proteínas podría ser altamente interesante para el desarrollo de productos alimentarios tipo gel (Gosal y Ross-Murphy, 2000). La gelificación proteica es un proceso altamente conocido en el que las proteínas de un sistema se entrelazan mediante interacciones químicas y/o físicas para formar una estructura tridimensional en la que una gran parte de agua queda ocluida en su interior (Clark, Kavanagh y Ross-Murphy, 2001). Para conseguir este fenómeno, se han descrito diversos procedimientos que van desde el cambio de la concentración de sal en el sistema, hasta la modificación de pH o un tratamiento térmico. En cualquier caso, la desnaturalización proteica, y el desarrollo de interacciones proteicas tienen lugar. Entre los procedimientos anteriormente mencionados, el tratamiento térmico ha sido uno de los más empleados tradicionalmente, ya que es bastante versátil y permite una reordenación previa de las cadenas proteicas antes de su posterior desarrollo de interacciones (Sano, Noguchi, Matsumoto y Tsuchiya, 1990).

Además de las propiedades funcionales de las proteínas, las cuales permiten el desarrollo del sistema tipo gel anteriormente mencionado, las proteínas también son conocidas por tener una gran actividad bioactiva (Foegeding y Davis, 2011). Así, las proteínas son conocidas por su capacidad antihipertensiva, hipocolesterémica o antioxidante. Entre ellas, las propiedades antioxidantes de los alimentos no solamente están relacionadas con su conservación, sino que también han sido relacionadas con su capacidad de prevenir el daño celular, el cual está relacionado con el envejecimiento y con el desarrollo de enfermedades graves (Elias, Kellerby y Decker, 2008).

El objetivo del presente trabajo es el estudio y caracterización de geles alimentarios obtenidos a partir de un concentrado proteico procedente de la cascarrilla de arroz (RPC), así como de dos hidrolizados provenientes de dicho concentrado (RPHA y RPHB). Para la evaluación de estos geles, se han empleado técnicas reológicas, para determinar la estructura y análisis químicos que han permitido determinar las interacciones entre las distintas proteínas, así como la capacidad antioxidante de estos compuestos.

## METODOLOGÍA

Para desarrollar los geles a partir de la proteína proveniente de la cascarrilla de arroz, se empleó un concentrado proteico de arroz suministrado por industrias Remy (Lovaina, Bélgica). Además de este sistema proteico, se desarrollaron dos hidrolizados. Para la obtención de hidrolizados se empleó tripsina pancreática en un ratio 1:10 (E/S) durante 10 y 120 minutos a 50°C, obteniendo dos grados diferentes de hidrólisis (RPHA y RPHB, respectivamente). La enzima fue inactivada mediante el sometimiento de la dispersión proteica en un baño de agua a 80°C durante 15 min.

Los geles fueron obtenidos mediante un procesado térmico de dispersiones proteicas al 10%. De este modo, dichas dispersiones se sometieron a una rampa de calentamiento desde 20 °C hasta 90 °C a una velocidad de 5°C/min. Posteriormente, el sistema se mantuvo a 90 °C durante 30 min. Finalmente, se produjo el enfriamiento de las dispersiones hasta 20 °C a una velocidad de 5°C/min.

Distintas técnicas fueron empleadas para la caracterización de los geles. Por una parte, el proceso de gelificación fue simulado in-situ en un reómetro. De este modo se pudo obtener el cambio de estructura de dichos sistemas mediante el seguimiento de la evolución de los módulos viscoelásticos en función de la temperatura. Para llevar a cabo este proceso se empleó un reómetro Kinexus (Inglaterra, Malvern) equipado con una geometría de platos paralelos de 60 mm a una frecuencia constante de 1 Hz y esfuerzo dentro del intervalo viscoelástico lineal. El sistema se equipó de una trampa de disolvente para evitar cualquier la evaporación de agua.

Tras la caracterización de la estructura desarrollada durante estos ensayos, se procedió a determinar tanto las interacciones proteicas más relevantes, como la capacidad antioxidante que muestra estos geles. La primera caracterización se llevó a cabo mediante la medida de solubilidad proteica en 5 disoluciones tampón diferentes. Las disoluciones fueron: (A) 0,05 M NaCl; (B) 0,6 M NaCl; (C) 0,6 M NaCl + 1,5 M Urea; (d) 0,6 M NaCl + 8 M Urea; (e) 0,6 M NaCl + 8 M Urea + 0,5 M  $\beta$ -Mercaptoetanol. De este

modo, la diferencia de solubilidad observada entre las disoluciones a y b estaría relacionada con las interacciones iónicas, entre b y c con los puentes de hidrógeno, entre c y d con interacciones hidrofóbicas y entre d y e con puentes de disulfuro.

Seguidamente a la determinación de las interacciones proteicas, se llevó a cabo la determinación de la capacidad antioxidante mediante el empleo de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Este reactivo se caracteriza por tener forma de radical en disolución acuosa, y por cambiar de color cuando este radical se protona. Así, de acuerdo con el método de Brand-Williams y col. (1995), el día antes del ensayo se preparó una disolución 0,1 M de este compuesto, la cual se mantuvo agitando en oscuridad durante toda la noche a 4°C. 0,1 mL de las dispersiones acuosas de la muestra se hicieron reaccionar dentro del intervalo de concentraciones adecuado con 2,9 mL de reactivo. Como estándar se empleó propil galato, el cual es un antioxidante ampliamente utilizado en la industria. La absorbancia de las mezclas DPPH/dispersiones proteicas se midieron a 515 nm.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se muestra la evolución del módulo elástico para los tres sistemas proteicos estudiados (RPC, RPHA y RPHB) durante el tratamiento térmico aplicado a las dispersiones proteicas. De manera general, puede observarse el siguiente comportamiento: inicialmente puede los módulos disminuyen como consecuencia de la agitación térmica que tiene lugar. En este caso, la movilidad de las cadenas proteicas aumenta y por tanto disminuyen las interacciones físicas. Tras esta primera etapa, la subida de temperatura conlleva el desarrollo de nuevas interacciones, que tiene lugar como consecuencia de la desnaturalización de la proteína. Dicha desnaturalización conlleva la apertura de la misma, la exposición de grupos hidrofóbicos y por tanto la posibilidad que nuevas interacciones tengan lugar. El incremento de la temperatura tiene como consecuencia el desarrollo de interacciones covalentes fuertes, que dan lugar a los mayores valores de módulos. Por último el descenso en temperatura tiene como consecuencia el desarrollo de nuevas interacciones físicas que dan lugar a un incremento del módulo elástico. Esta respuesta del módulo elástico ha sido anteriormente observadas para proteínas miofibrilares (Acton y Dick, 1988).

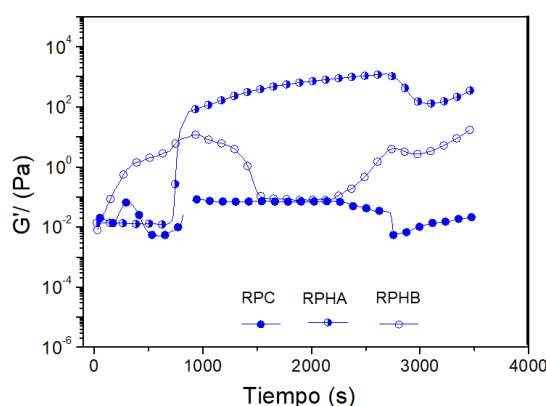
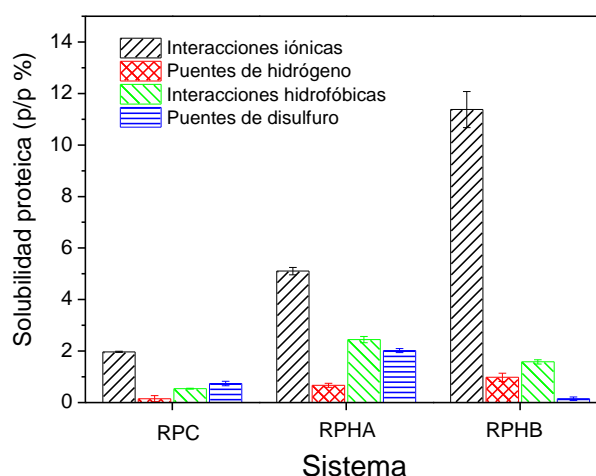


Figura 25: Evolución del módulo elástico en función del tratamiento térmico aplicado.

Además de la tendencia general observada para todos los módulos independientemente del sistema proteico empleado, es importante destacar el efecto del grado de hidrólisis. De este modo, puede observarse cómo los valores más bajo del módulo se obtuvieron para la proteína sin hidrolizar, mientras que los valores más altos se obtuvieron para el sistema proteico con un grado de hidrólisis intermedio (RPHA). Estos resultados pueden deberse a que por lo general la hidrólisis proteica conlleva un aumento de la funcionalidad de la proteína, permitiendo la desagregación de la misma y promoviendo el desarrollo de nuevas interacciones ya sean de tipo físico o covalente. Sin embargo, un elevado grado de hidrólisis, puede conllevar a una pérdida de la funcionalidad de la misma, debido a la elevada reducción del peso molecular de las cadenas polipeptídicas que tiene lugar (Chotikachinda y col., 2013.).

La figura 2 muestra las interacciones proteicas obtenidas para estos sistemas tipo gel en función del grado de hidrólisis. Como puede ser observado, las interacciones cambian en intensidad y en naturaleza dependiendo del tipo del tipo de sistema proteico empleado.



**Figura 2:** Evolución del módulo elástico en función del tratamiento térmico aplicado.

Esta figura muestra que las interacciones iónicas aumentan su valor conforme aumenta el grado de hidrólisis. Este resultado es esperable ya que la hidrólisis aumenta el número de cadenas terminales cargadas. Del mismo modo, esta figura también confirma que los mayores valores del módulo elástico observados en la figura anterior se corresponden con el desarrollo de un mayor número de puentes de disulfuro. Este tipo de interacciones hidrofóbicas se han relacionado precisamente con el desarrollo de una estructura permanente más fuerte. Por último, en relación a las interacciones hidrofóbicas es destacable señalar que las interacciones hidrofóbicas alcanzan su máximo nivel para un grado bajo de hidrólisis. Este proceso puede estar relacionado con una apertura inicial de la proteína, como consecuencia de un bajo grado de hidrólisis. Esta apertura permite el desarrollo de interacciones hidrofóbicas. No obstante, un excesivo grado de hidrólisis podría conllevar a un aumento de la hidrofilia de la proteína, por lo que las posibles interacciones hidrofóbicas disminuirían.

Finalmente, la Tabla 1 muestra los valores obtenidos para los ensayos de actividad antioxidante medidos con el reactivo DPPH.

Sistema	mmoles Eq. propil galato
RPC	417,1 ± 16,3
RPHA	547,1 ± 37,8
RPHB	466,1 ± 13,6

**Tabla 9:** Actividad antioxidante de los geles obtenidos medidas con DPPH y expresada como mmoles Eq. propil galato.

Como puede observarse, la actividad antioxidante de estos geles alcanza unos valores elevados en todos los casos, indicando que la proteína tiene una elevada capacidad para donar un protón al radical formado. En este caso habría que considerar que el sistema proteico se encuentra próximo al punto isoeléctrico (Souza y col., 2016), por lo que a este valor de pH el gel estabilizado por el sistema proteico empleado tiene suficiente capacidad para donar protones. Además es interesante observar que si bien es cierto que a un valor intermedio de hidrólisis, la actividad antioxidante es ligeramente superior, ésta es elevada en todos los casos y las diferencias pueden deberse principalmente a la diferente exposición de los grupos hidrofóbicos de la proteína como consecuencia de la hidrólisis llevada a cabo. En este caso, la actividad antioxidante no se ve afectada por la aparición de péptidos debido a que el mecanismo predominante es la donación de protones, el cual no está ligado a la aparición de estas especies.

## CONCLUSIONES

Este trabajo muestra cómo a partir de los residuos provenientes de la cascarilla de arroz es posible desarrollar geles alimentarios con propiedades bioactivas. Además, es especialmente interesante la obtención de hidrolizados, ya que un adecuado grado de hidrólisis conlleva la formación de geles con un módulo elástico deseable. Por otra parte, la estructura reológica observada se corresponde con las interacciones fisicoquímicas observadas, ya que el mayor número de interacciones se obtiene para el sistema con un mayor módulo elástico. Finalmente, la caracterización relacionada con la capacidad antioxidante de estos geles refleja que todos ellos tienen unos valores adecuados para el tipo de sistema con el que se está trabajando, donde además el desarrollo de hidrolizados no afecta negativamente a dicha capacidad.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Sevilla la contribución económica llevada a cabo mediante la ejecución de un contrato de acceso perteneciente al V Plan propio.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acton, J.C., Dick, R.L. (1988). Functional roles of heat induces protein gelation in processed meat. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 497.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.* 28, 25–30.
- Clark, A.H., Kavanagh, G.M., Ross-Murphy, S.B. (2001). Globular protein gelation - theory and experiment. *Food Hydrocoll.* 15, 383–400.
- Chotikachinda, R., Tantikitti, C., Benjakul, S., Rustad, T., Kumarnsit, E. (2013). Production of protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) viscera as feeding attractants for Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquac. Nutr.* 19, 773–784.
- Elias, R.J., Kellerby, S.S., Decker, E.A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48, 430–441.
- Ferrero, A., Tinarelli, A. (2007). Chapter 1 - Rice Cultivation in the E.U. Ecological Conditions and Agronomical Practices, in: Karpouzias, E.C. (Ed.), *Pesticide Risk Assessment in Rice Paddies*. Elsevier, Amsterdam, pp. 1–24.
- Foegeding, E.A., Davis, J.P. (2011). Food protein functionality: A comprehensive approach. *Food Hydrocoll.* 25, 1853–1864.
- Gosal, W.S., Ross-Murphy, S.B. (2000). Globular protein gelation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 5, 188–194.
- Li, J., Liu, J., Liao, S., Yan, R. (2010). Hydrogen-rich gas production by air–steam gasification of rice husk using supported nano-NiO/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 7399–7404.
- Romero, A., Beaumal, V., David-Briand, E., Cordobes, F., Guerrero, A., Anton, M. (2012). Interfacial and emulsifying behaviour of rice protein concentrate. *Food Hydrocoll.* 29, 1–8.
- Sano, T., Noguchi, S.F., Matsumoto, J.J., Tsuchiya, T. (1990). Thermal Gelation Characteristics of Myosin Subfragments. *J. Food Sci.* 55, 55–58.
- Souza, D. de, Sbardelotto, A.F., Ziegler, D.R., Marczak, L.D.F., Tessaro, I.C. (2016). Characterization of rice starch and protein obtained by a fast alkaline extraction method. *Food Chem.* 191, 36–44.