



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE UN ALIMENTO IMPRESO EN 3D FORMULADO
CON PROTEÍNAS OBTENIDAS A PARTIR DE RESIDUOS DE
CERVECERÍA.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

ESAÚ GONZÁLEZ CONTRERAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: GÁLVEZ MARISCAL MARÍA AMANDA

VOCAL: Profesor: CONCA TORRES ARMANDO

SECRETARIO: Profesor: HERNÁNDEZ MELÉNDEZ OSCAR

1er. SUPLENTE: Profesor: GARCÍA GARIBAY JOSÉ MARIANO

2° SUPLENTE: Profesor: AGUILAR OSORIO JOSÉ GILLERMO DE JESUS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

LABORATORIO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL, LABORATORIO DE INGENIERÍA QUÍMICA, EDIFICIO A, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM, CTO. ESCOLAR S/N, C.U., COYOACÁN, 04510 CIUDAD DE MÉXICO, CDMX.

ASESOR DEL TEMA:

HERNÁNDEZ MELÉNDEZ OSCAR

SUSTENTANTE:

GONZÁLEZ CONTRERAS ESAÚ

Tabla de contenido.

Tabla de contenido.....	3
Abreviaciones y simbología.....	6
1. Introducción.....	8
1.1. Planteamiento del problema.	8
1.2. Objetivo.....	9
1.2.1. Objetivos particulares.....	9
1.3. Hipótesis.	9
2. Marco teórico.....	11
2.1. Residuos agrícolas.....	11
2.1.1. Residuos agrícolas de la industria cervecera.....	12
2.2. Proteínas.....	14
2.2.1. Proteínas en residuos agrícolas.....	16
2.2.2. Proteínas en grano de malta gastada de cervecería.....	18
2.3. Obtención de proteínas a partir de residuos agrícolas.....	20
2.3.1. Métodos de extracción de proteínas.	21
2.3.1.1. Extracción con disolventes orgánicos.	23
2.3.1.2. Extracción alcalina.	23
2.3.1.3. Extracción asistida por enzimas.....	24
2.3.1.4. Extracción con agua subcrítica.	26
2.3.1.5. Extracción por extrusión de doble tornillo.	26
2.3.1.6. Extracción asistida por ultrasonido.....	28
2.3.1.7. Extracción asistida por campo eléctrico pulsado.....	29
2.3.1.8. Extracción asistida por microondas.....	29
2.3.1.9. Extracción asistida por alta presión.....	30
2.3.2. Obtención de proteína unicelular (SCP) usando residuos agrícolas como sustrato.	30
2.3.2.1. SCP a partir de residuos agrícolas de la industria cervecera.....	33
2.4. Purificación de las proteínas.	35
2.5. Impresión en 3D.....	39
2.5.1. Impresión 3D basada en extrusión.....	42

2.5.1.1. Materiales y capacidad de impresión.	45
2.5.1.2. Texturización de las proteínas en impresoras 3D mediante impresión basada en extrusión.....	47
2.5.1.2.1. Productos impresos en 3D formulados con proteínas.....	48
3. Materiales y equipos.	50
3.1. Materia prima.	50
3.2. Reactivos.	50
3.3. Equipos.	50
4. Desarrollo experimental.....	52
4.1. Acondicionamiento y análisis de la materia prima.....	52
4.1.2. Análisis Químico Proximal (AQP).....	52
4.1.2.1. Análisis de humedad.	52
4.1.2.2. Análisis de cenizas.....	53
4.1.2.3. Análisis de grasa.....	53
4.1.2.4. Análisis de proteína.....	54
4.1.2.5. Análisis de carbohidratos.	56
4.1.2.5.1. Análisis de carbohidratos totales.....	56
4.1.2.5.2. Análisis de fibra.	58
4.2. Elección del método adecuado para la extracción de proteínas.	59
4.2.1. Tratamiento hidrotermal.	60
4.2.2. Tratamiento alcalino.	60
4.2.3. Extrusión de doble tornillo.....	61
4.2.4. Tratamiento alcalino asistido por ultrasonido.	62
4.3. Producción de proteínas.	62
4.3.1. Producción a pequeña escala.....	62
4.3.2. Producción a mayor escala.....	64
4.4. Impresión en 3D.....	65
4.4.1. Elección de la formulación para impresión en 3D y propiedades reológicas.....	65
4.4.2. Impresión de la formulación en 3D.....	66
5. Resultados y análisis de resultados.	68
5.1. AQP	68

5.1.1. Análisis de humedad.....	69
5.1.2. Análisis de cenizas.....	69
5.1.3. Análisis de grasa.....	70
5.1.4. Análisis de proteínas.....	70
5.1.5. Análisis de carbohidratos.....	72
5.1.5.1. Análisis de carbohidratos totales.....	72
5.1.5.2. Análisis de fibra.....	74
5.2. Elección del método de extracción de proteínas adecuado.....	76
5.3. Producción de proteínas.....	79
5.4. Impresión en 3D.....	86
5.4.1. Elección de la formulación para impresión en 3D y propiedades reológicas.....	87
5.4.2. Impresión de la formulación en 3D.....	92
Conclusiones.....	95
Anexo 1. Ecuaciones para el cálculo de los componentes del AQP.....	96
Anexo 2. Análisis estadístico para elegir el método de extracción de proteínas adecuado.....	99
Anexo 3. Balances de materia y cálculos concernientes a la producción de proteínas.....	104
Anexo 4. Datos acerca de la impresión en 3D.....	108
Referencias.....	116

Abreviaciones y simbología.

%CV: Porcentaje de coeficiente de variabilidad.

°C: Temperatura en grados Celsius.

3D: Tercera dimensión.

AcOH: Ácido acético.

ADF: Fibra Detergente Ácido (Acid detergent Fiber).

ANOVA: Análisis de Varianza (Analysis of Variance)

AQP: Análisis Químico Proximal.

ATR: Reflectancia Total Atenuada.

BSA: Albúmina Sérica Bovina (Bovine Serum Albumin).

BSG: Grano Gastado de malta de Cervecería (Brewer's Spent Grain).

CAD: Diseño Asistido por Computadora (Computer-Aided Design).

cm: Longitud en centímetros.

cm⁻¹: Longitud de onda en el espectro de infrarrojo en cm a la inversa.

CO₂: Dióxido de carbono.

cP: Viscosidad en centiPoises

FTIR: Espectroscopía de Infrarrojo por la Transformada de Fourier.

g: Masa en gramos.

G': Modulo de almacenamiento.

G'': Módulo de pérdida.

GHz: Frecuencia en gigaHertz.

h: Tiempo en horas.

H₂SO₄: Ácido sulfúrico.

HCl: Ácido clorhídrico.

HMF: Hidroximetil furfural.

kcal: Contenido energético en kilocalorías.

kDa: Unidad de masa atómica en kiloDaltons

kg: Masa en kilogramos.

kgf: Fuerza en kilogramo-fuerza

kHz: Frecuencia en kiloHertz.

kJ: Contenido energético en kiloJoules.

KMnO₄: Permanganato de potasio.

kV: Diferencia de potencial eléctrico en kiloVolts.

L: Volumen en litros.

LSD: Diferencia Mínima Significativa (Least Significant Difference).

m/v: Relación masa/volumen.

M: Concentración molar.

mg: Masa en miligramos.

MHz: Frecuencia en megaHertz.

min: Tiempo en minutos.

mL: Volumen en mililitros.

mM: Concentración milimolar.

mm: Longitud en milímetros.

MPa: Presión en megaPascales.

n: índice de comportamiento de flujo.

N₂: Nitrógeno.

NaCl: Cloruro de Sodio.

NaOH: Hidróxido de sodio.

NDF: Fibra Detergente Neutro (Neutral Detergent Fiber).

pH: Potencial de hidrógeno.

PLA: Ácido poliláctico (polylactic acid).

ppm: Concentración en partes por millón).

R²: Coeficiente de determinación.

rpm: Velocidad angular o velocidad de corte en revoluciones por minuto.

s: Tiempo en segundos.

s⁻¹: Velocidad de corte en segundos a la inversa

SCP: Proteína Unicelular (Single Cell Protein).

Tan (δ): Tangente de pérdida mecánica.

USAI: Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación.

V: Diferencia de potencial eléctrico en Volts.

W: Potencia en Watts.

μg: Masa en microgramos.

μL: Volumen en microlitros.

μm: Longitud en micrómetros

1. Introducción.

1.1. Planteamiento del problema.

En México se producen y comercializan una gran diversidad de alimentos de origen vegetal, durante la cosecha y post cosecha se generan cantidades importantes de residuos, estos residuos conformados principalmente por biomasa lignocelulósica tienen un impacto ambiental considerable por su compleja degradación (Cortés, 2014; Mejías *et al.*, 2016).

La cerveza es el producto agroalimentario principal de exportación en México, incluso México ocupa el primer lugar en exportación de cerveza a nivel mundial, así también produce cantidades importantes de esta bebida para consumo local (Gutiérrez, 2021; Forbes México, 2021). Para la elaboración de la cerveza se producen cientos de miles de toneladas de malta (964 mil toneladas en 2019 previo a la pandemia causada por la COVID 19), después de la producción de cerveza quedan cantidades similares de grano gastado de malta (INEGI, 2020), estos residuos tienen gran potencial para ser aprovechados para la obtención de productos de valor agregado.

Por otra parte, la población mundial aumenta cada vez más, lo que implica una creciente demanda de alimentos y, con ello, una creciente demanda de proteínas. Las proteínas son macronutrientes compuestos por largas cadenas de aminoácidos indispensables para el mantenimiento de la vida. Hay aminoácidos que el cuerpo humano sólo puede adquirir a través de la dieta (aminoácidos esenciales) ((Belitz & Schieberle, 2009; Gálvez *et al.*, 2013). Ante la creciente demanda de alimentos, las fuentes convencionales de proteína de buena calidad biológica como la leche, el huevo y la carne no se darán abasto en un futuro para cubrir la demanda mundial de proteínas, por lo que es necesario desarrollar fuentes alternativas de proteínas que contribuyan a cubrir dicha demanda (Qin *et al.*, 2018).

Se busca que las fuentes alternativas de proteínas sean sostenibles y sean amigables con el medio ambiente, pues se sabe que las fuentes convencionales de proteína de buena calidad biológica como la carne tienen suministros limitados y se

relacionan con problemáticas ambientales como el cambio climático, uso excesivo de agua dulce y pérdida de la biodiversidad (Kumar *et al.*, 2021).

Cada individuo posee requerimientos nutricionales diferentes debido a su actividad física, estado de salud, edad, etc., incluso cada individuo tiene sus propios gustos. Los alimentos que encontramos en el mercado se producen en masa, por lo que no pueden cubrir las necesidades y gustos de toda la población, de tal manera que tecnologías como la impresión de alimentos en 3D comienzan a emerger con gran fuerza gracias a que con este tipo de tecnología se pueden elaborar alimentos personalizados, alimentos que cubran las requerimientos nutricionales y deseos de cada individuo (Jiang *et al.*, 2019).

1.2. Objetivo.

Desarrollar un producto de valor agregado a partir de residuos de cervecería.

1.2.1. Objetivos particulares.

- Determinar el método de extracción más adecuado para la extracción de las proteínas del grano gastado de malta de cervecería.
- Explorar de manera teórica una alternativa a los métodos de extracción para la obtención de proteínas a partir de residuos de cervecería.
- Diseñar una formulación óptima para impresión en 3D.
- Desarrollar un alimento formulado con proteínas obtenidas a partir de residuos de cervecería y producido mediante la innovadora tecnología de impresión de alimentos en 3D basada en extrusión.

1.3. Hipótesis.

A partir de los residuos de malta gastada de cervecería, posterior al secado y mediante el proceso de extracción más adecuado, se lograrán obtener proteínas útiles para la formulación de un material capaz de extruirse en una impresora 3D, obteniendo un alimento en 3D rico en proteínas de buena calidad biológica y una apariencia agradable diseñada a través de un programa CAD. Este alimento beneficiará a la sociedad por el aprovechamiento de los residuos cerveceros, podría llegarse a considerar como una alternativa a las fuentes convencionales de

proteínas y su producción no tendrá los efectos ambientales negativos que llega a tener la producción de las fuentes de proteínas comunes como la carne, por poner un ejemplo.

2. Marco teórico.

2.1. Residuos agrícolas.

Los residuos generados por la agroindustria han adquirido una gran importancia debido a que buena parte de sus componentes pueden ser utilizados como materia prima para la producción de nuevos productos con valor agregado, tal importancia actual se prevé que continúe a futuro principalmente para disminuir el impacto ambiental que estos residuos ocasionan (Mejías *et al.*, 2016).

En las industrias que procesan alimentos, una gestión sensata puede garantizar que los nutrientes y otros recursos se recuperen en la mayor medida posible de los residuos generados, esto incluye también el alcance de reprocesamiento y la mejora de la productividad (Jagadiswaran *et al.*, 2021).

En México se producen y comercializan en fresco o en productos procesados: Frutas, verduras, tubérculos, cereales, vainas, semillas, raíces y hojas. Durante la cosecha y post cosecha se produce una gran cantidad de residuos en sus cadenas de producción de la agroindustria, los cuales en su mayoría constituyen biomasa lignocelulósica y lipídica, que, a pesar de que su degradación es compleja, pueden ser tratados por métodos físicos, químicos, biológicos o combinaciones de estos para el fraccionamiento de sus componentes (Mejías *et al.*, 2016). Estos residuos pueden ser aprovechados para la generación de productos como biocombustibles y productos químicos de importancia comercial (Cortés, 2014).

Para obtener biocombustibles y productos químicos de valor comercial a partir de residuos agrícolas, se requiere su procesamiento en biorrefinerías. El concepto de biorrefinería es similar al de las refinerías de petróleo, en las refinerías de petróleo se fracciona este recurso no renovable para la obtención de productos químicos, energía y combustibles; lo mismo ocurre en las biorrefinerías, la diferencia radica en que las biorrefinerías no usan recursos no renovables como el petróleo, al contrario, se usan recursos renovables (Ferreira, 2017), entre estos recursos renovables se encuentran los residuos agrícolas.

Se puede decir que las zonas rurales tienen el potencial suficiente para abastecer biorrefinerías con la capacidad de revalorizar los subproductos que se obtienen de la agroindustria (Contreras *et al.*, 2019).

En la *Ilustración 1* se puede observar un esquema que ejemplifica el concepto de biorrefinería, donde la biomasa por medio de tratamientos físicos, químicos y/o biológicos se transforma en productos de valor agregado.

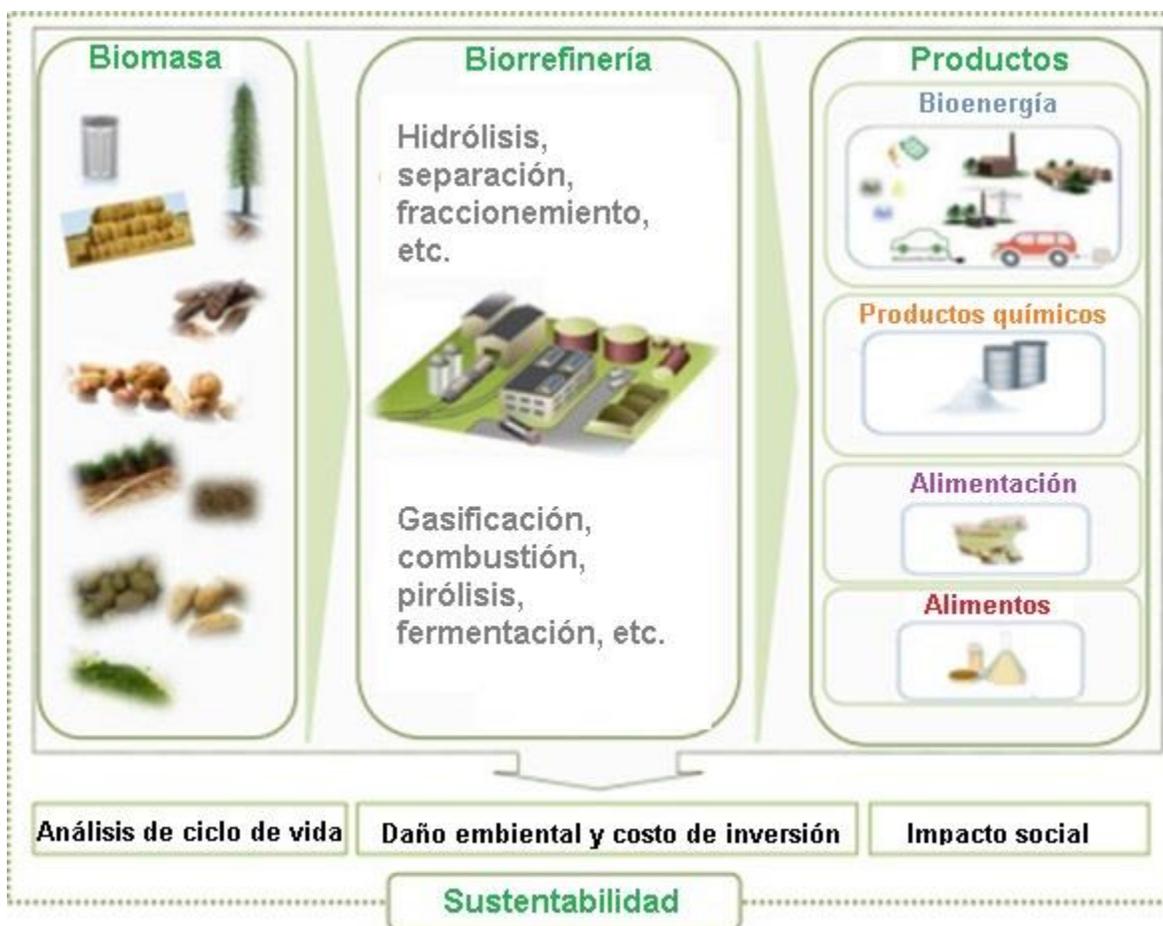


Ilustración 1. Concepto de biorrefinería (traducido de Ferreira, 2017).

2.1.1. Residuos agrícolas de la industria cervecera.

Los residuos de la industria cervecera se componen principalmente de cáscara, salvado y residuos de endospermo de cebada y otros granos utilizados como adjuntos en la elaboración de cerveza (He *et al.*, 2021).

El grano gastado de malta de cervecería (BSG por sus siglas en inglés) es el subproducto que permanece después del proceso de maceración y filtración del mosto (Riaño *et al.*, 2021). Esta materia lignocelulósica es abundante en componentes como la celulosa (12-15%), hemicelulosa (20-35%) y lignina (7-28%), conformando a la fibra, el componente mayoritario con valores alrededor de 50 hasta 70%, mientras que el segundo componente mayoritario está conformado por las proteínas con valores entre 14-30% del peso seco (He *et al.*, 2021), además contiene carbohidratos solubles como el almidón en cantidades variables que van desde 2% (Qin *et al.*, 2018) hasta 21% (Parchami *et al.*, 2021), así también se puede encontrar en muy poca cantidad el β -glucano (cerca del 1%) (Qin *et al.*, 2018); una pequeña cantidad de lípidos (5-11%) (Ikram *et al.*, 2017), compuestos fenólicos (1.2%) (Riaño *et al.*, 2021), vitaminas y minerales (silicio, fósforo y calcio, principalmente) (He *et al.*, 2021).

El BSG es la corriente secundaria más abundante de la industria cervecera, se genera un aproximado de 20 kg de grano gastado en forma húmeda por cada 100 L de cerveza producida, lo que representa aproximadamente el 85% del total de subproductos generados (Ikram *et al.*, 2017; Qin *et al.* 2018; He *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021; Riaño *et al.*, 2021). Este subproducto se genera tanto en grandes como en pequeñas empresas, su valorización abre oportunidades a que las empresas cerveceras se incorporen al concepto de biorrefinería (Riaño *et al.*, 2021).

Por lo general el BSG se vende o se dona para alimentación animal, manteniendo a este residuo fuera del flujo de desechos, sin embargo, se descompone con facilidad por su alto contenido de nutrimentos y alto contenido de humedad (alrededor de 70%), por ello se puede considerar como un material de desecho, su vida útil varía de 2-10 días en climas cálidos, dificultando su almacenamiento y transporte (Ikram *et al.*, 2017; He *et al.*, 2021).

También se han intentado usos alternativos para el BSG como materia prima para la producción de oligosacáridos, xilitol, ácido láctico, polifenoles y flavonoides, incluso en la producción de alimentos funcionales y suplementos alimenticios (He *et al.*, 2021).

Para la alimentación humana, el BSG puede considerarse como un ingrediente ideal debido a su fácil disponibilidad, bajo costo, y es rico en nutrimentos. Puede agregarse a productos como panes, galletas, muffins y bocadillos que necesiten mejorar su contenido de fibra (asociada al aumento de excreción del colesterol y grasas, y a la mejora del tránsito digestivo), polifenoles (con actividad antioxidante) y proteínas (buena fuente de aminoácidos esenciales (Ver sección 2.2.2., *Ilustración 2*)) (Ikram *et al.*, 2017).

México ocupa el primer puesto en exportación de cerveza por arriba de países como Alemania y Países Bajos (Gutiérrez, 2021) a pesar de que la producción tuvo una caída del 4.7% y una caída en la exportación del 6.2% en 2020 atribuidas a la situación sanitaria ocasionada por la COVID 19, enfermedad generada por el virus SARS-CoV-2. En dicho año 118.7 millones de hectolitros fueron producidos y 37.6 millones de hectolitros fueron exportados, estas cifras mantienen a la cerveza como el principal producto agroalimentario de exportación en México (Forbes México, 2021), La elaboración de cerveza genera una enorme cantidad de residuos de BSG, residuos de los cuales pueden obtenerse grandes cantidades de proteínas y otros productos de interés comercial, pues según el INEGI (2020) desde 2016 se ha mantenido la producción de malta cervecera arriba de las 900 mil toneladas por año.

2.2. Proteínas.

El ácido desoxirribonucleico que constituye a los genes donde se almacena la información estructural y metabólica de los seres vivos, son transcritos para formar distintos tipos de ácido ribonucleico, el cual es traducido en los ribosomas para la síntesis de proteínas. El código genético tiene la información para sintetizar 20 α -aminoácidos, los cuales son aquellas unidades, que, como “eslabones”, se unen mediante el grupo amino de uno al grupo carboxilo del siguiente (enlace peptídico), formando péptidos, cuando se forman cadenas polipeptídicas de altos pesos moleculares se les denomina a estas estructuras como proteínas (Gálvez *et al.*, 2013).

Los α -aminoácidos se clasifican de diferentes maneras, dado que sus cadenas laterales son factores importantes en las interacciones inter e intramoleculares de

las proteínas y, por lo tanto, en sus propiedades. Pueden clasificarse como: aminoácidos con cadenas laterales no polares y no cargadas, por ejemplo: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina y triptófano (estos dos últimos también se clasifican como aminoácidos aromáticos); aminoácidos con cadenas polares no cargadas, por ejemplo: serina, treonina, cisteína, tirosina (clasificado también como aminoácido aromático), asparagina y glutamina; aminoácidos con cadenas laterales cargadas, por ejemplo: ácido aspártico y glutámico, histidina, lisina y arginina. Otra manera en que pueden clasificarse es de acuerdo con sus funciones nutricionales/fisiológicas, donde se dividen en aminoácidos esenciales y aminoácidos no esenciales. Los aminoácidos esenciales son aquellos que no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano, por lo tanto, deben obtenerse a través de la dieta, entre ellos se encuentran: valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, triptófano, metionina, treonina, histidina (esencial para infantes), lisina y arginina (semiesencial); por otra parte, los aminoácidos no esenciales son aquellos que el cuerpo humano puede sintetizar, entre ellos se encuentran: glicina, alanina, prolina, serina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácidos aspártico y glutámico (Belitz & Schieberle, 2009).

Los aminoácidos, péptidos y proteínas, desempeñan un papel importante en los sistemas biológicos y son muy versátiles. Tienen todo tipo de funciones como: estructura, transporte, motilidad, defensa, reconocimiento, almacenamiento y función catalítica (enzimas) (Gálvez *et al.*, 2013). En los alimentos son componentes de gran importancia, contribuyen al sabor por ser precursores de compuestos aromáticos, imparten color gracias a las reacciones térmicas o enzimáticas que ocurren durante la producción, procesamiento y almacenamiento, también influyen de manera significativa en las propiedades físicas de los alimentos a través de su capacidad para formar o estabilizar geles, espumas, emulsiones y estructuras fibrilares (Belitz & Schieberle, 2009).

La hidrólisis del enlace peptídico de las proteínas aumenta el número de aminoácidos libres y grupos carboxilo, incrementa la solubilidad, digestibilidad y propiedades funcionales de estos compuestos, formando péptidos bioactivos, es

decir, péptidos que confieren funciones biológicas que van más allá de su valor nutricional (Hou, *et al.*, 2017).

Energéticamente, aportan un valor similar al de los carbohidratos (17 kJ/g o 4 kcal/g). Entre las fuentes alimenticias más importantes de proteínas, se encuentran: carne, leche, cereales, oleaginosas, legumbres, incluso pueden considerarse las algas y proteínas de organismos unicelulares (SCP por sus siglas en inglés), por ejemplo, levaduras y bacterias (Belitz & Schieberle, 2009).

Se puede decir que las proteínas alimenticias son aquellas que son fácilmente digeribles, no son tóxicas, nutricionalmente adecuadas, funcionalmente útiles en los alimentos y disponibles en abundancia (Gálvez *et al.*, 2013).

2.2.1. Proteínas en residuos agrícolas.

La obtención de bioproductos basados en proteínas extraídas de residuos agrícolas, puede ayudar a diversificar los ingresos en las biorrefinerías, pues se pueden utilizar en su forma completa o como hidrolizados por sus propiedades nutricionales, bioactivas y tecno-funcionales (Contreras *et al.*, 2019) obteniendo productos de valor agregado.

La demanda de proteínas a nivel mundial va en aumento de manera proporcional al incremento de la población y, por lo tanto, de alimentos. En un futuro las fuentes de proteínas convencionales no podrán cubrirla. Una buena alternativa para resolver esta problemática es la extracción de proteínas a partir de biomasa lignocelulósica, de esta manera se puede proporcionar una mayor cantidad de estos componentes alimentarios para satisfacer una demanda futura (Qin *et al.*, 2018).

A parte de satisfacer la demanda de proteínas, las proteínas obtenidas a partir de residuos agrícolas tienen potencial para sustituir a las proteínas animales, que son caras, tienen suministro limitado y están relacionadas con el agotamiento del agua dulce, el cambio climático, pérdida de la biodiversidad y, a menudo, se relacionan con enfermedades humanas (Kumar *et al.*, 2021).

El uso cada vez más frecuente de nuevos métodos alternativos ecoinnovadores para la obtención de proteínas de residuos agrícolas, permite alcanzar no sólo los

objetivos del procesamiento moderno de alimentos (garantía de producción rentable, sostenible y respetuosa con el medio ambiente), sino que parece más alcanzable el concepto de “desperdicio de cero alimentos” (Pojić *et al.*, 2018).

Se estima que los residuos de la industria agroalimentaria contienen entre 10-40% de proteínas, hay productos que pueden tener más, como lo es el caso de las algas rojas, que llegan a contener hasta un 50% de proteínas en peso seco (Álvarez-Viñas *et al.*, 2021).

Las proteínas obtenidas de los residuos agrícolas pueden utilizarse como ingredientes por sus propiedades tecno-funcionales (por ejemplo, gelificantes, aglutinantes y espumantes) y como nutrimentos para la fortificación de alimentos y suplementos alimenticios (Pojić *et al.*, 2018). Las propiedades nutricionales de las proteínas que pueden aislarse de algunos residuos agrícolas podrían ser tan adecuadas como algunas fuentes de proteína que se consumen actualmente, y que contienen la mayoría de los aminoácidos esenciales (Mechmeche, 2017).

La limitante del uso de algunas proteínas vegetales para el consumo humano son la alergenicidad, toxicidad, mal sabor, presencia de alta cantidad de fibra en los extractos y factores antinutricionales como, por ejemplo, taninos, ácido fítico, glucosinolatos, fitatos, ácido erúxico, inhibidores de tripsina, entre otros (Pojić *et al.*, 2018).

Se puede clasificar a los residuos agrícolas de acuerdo con su contenido de proteínas, los residuos agrícolas relativamente ricos en proteínas contienen una cantidad mayor al 20% en base seca, entre ellos se encuentran los residuos del procesamiento de arroz, soya, harinas de semillas, granos de destilerías de cereales, entre otros; aquellos residuos con contenido medio son aquellos que contienen de 10-20% en base seca, entre ellos se encuentran las semillas de las frutas, cáscaras, salvado de cereales, entre otros; por último, los residuos con bajo contenido de proteínas, son aquellos que contienen menos de 10% en base seca, estos residuos son conformados por hojas de plantas, tallos, paja, entre otros (Contreras *et al.*, 2019).

2.2.2. Proteínas en grano de malta gastada de cervecería.

Un alto contenido de proteína es deseable para aplicaciones alimentarias, en el caso de la elaboración de cerveza es deseable un contenido bajo de estas macromoléculas, pues el contenido de proteínas y el contenido de almidón están inversamente relacionados, a mayor contenido de proteínas, menor contenido de almidón, lo que se traduce en bajos rendimientos de extracto de malta, sin embargo, tampoco se desea un contenido muy bajo de proteínas, pues la levadura requiere aminoácidos para su nutrición y, por ende, para poder realizar de manera adecuada el proceso de fermentación; incluso un bajo contenido de proteínas conduce a una baja actividad enzimática, lo que se traduce en una cantidad baja de azúcares fermentables. La cantidad de proteína ideal en malta cervecera va del 10-12%, con una cantidad de almidón aproximadamente de 60% (Jaeger *et al.*, 2021).

El malteado provoca que las proteínas se degraden parcialmente en aminoácidos solubles y péptidos debido a las peptidasas endógenas del grano de cebada, sin embargo, la mayoría permanecen insolubles (74-78% del total). Gracias a la solubilización del endospermo durante la maceración, el contenido de proteínas aumenta en el grano gastado de malta de cervecería de 10 a 24% en peso seco (Rommi *et al.*, 2018).

El BSG contiene una gran cantidad de proteínas en su composición, esta cantidad oscila entre 18 y 30%, varía dependiendo de la materia prima, coadyuvantes y el proceso llevado a cabo en la industria (Qin *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2021), incluso estos factores de variación pueden ampliar el intervalo de 14-30% (He *et al.*, 2021).

El contenido de proteína del BSG es mucho más alto en comparación con otros residuos o subproductos agrícolas, esto ha provocado que en los últimos años se le haya prestado atención para obtener proteínas mediante métodos como la extracción alcalina o la extracción asistida por enzimas (Qin *et al.*, 2018).

Estas proteínas tienen potencial para estabilizar emulsiones acuosas y oleosas, además se ha demostrado que los péptidos que se pueden obtener de este residuo tienen alta bioactividad *in vitro* como la actividad antioxidante, lo que proporciona información para la aplicación de estas proteínas como ingredientes en alimentos

funcionales. Sin embargo, es complicado obtener proteínas con altos rendimientos, pues componentes como la lignina y la celulosa forman una red compleja donde las proteínas quedan atrapadas (Li *et al.*, 2021).

Las proteínas del BSG están compuestas principalmente por hordeínas (prolaminas) (alrededor de 50%), seguidas por las glutelinas en menor cantidad, el resto (hasta 20%) se conforma por albúminas y globulinas (Riaño *et al.*, 2021).

De acuerdo con la extractabilidad secuencial de Osborn, utilizando la técnica de extracción de mosto acuoso durante el proceso de elaboración de cerveza, se ha logrado obtener 43% de hordeína (separada con alcoholes en presencia de un agente reductor), 21.5% de glutelina (separada con soluciones alcalinas diluidas en presencia de un agente reductor, agentes caotrópicos y/o detergentes) y pequeñas cantidades (7.5%) de globulina y albúmina (solubles en agua con sal) (Ikram *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2021).

El BSG es una buena fuente de aminoácidos esenciales (constituyen aproximadamente el 30% de la proteína total), siendo la lisina de particular interés porque generalmente es un aminoácido limitante en cereales para consumo humano (Jaeger *et al.*, 2021). Los aminoácidos esenciales en el BSG se encuentran en cantidades significativas (>263 mg/100 g) en comparación con su contenido en frijoles, chícharos, míz, trigo, arroz, papa y coliflor (Qin *et al.*, 2018), en la *Ilustración 2* se puede apreciar un aminograma del BSG. Desde luego, el BSG también es fuente de aminoácidos no esenciales. Entre los aminoácidos esenciales más abundantes se encuentran: metionina, fenilalanina, triptófano, histidina, lisina y leucina; por otra parte, entre los aminoácidos no esenciales más abundantes se encuentran: serina, alanina, glicina, prolina, glutamina y asparagina (Ikram *et al.*, 2017). Cabe mencionar que las oleaginosas presentan bajos niveles de metionina y lisina, mientras que los cereales presentan bajos niveles de lisina, triptófano y treonina (Gálvez *et al.*, 2013), por lo que las proteínas del BSG pueden complementar a las oleaginosas y cereales aportando algunos aminoácidos deficientes en estos alimentos.

Aminoácidos	Composición (mg/100 g BSG)
leucina	672.4
lisina	477.0
Valina	352.6
Fenilalanina	428.9
tirosina	281.3
isoleucina	302.2
Treonina	263.0
metionina	125.8
Histidina	137.3
Arginina	483.6
serina	442.0
4-hidroxi prolina	15.4
Glicina	582.8
alanina	585.3
prolina	592.5
Ácido aspártico	979.0
Ácido glutámico	810.0
cisteína	69.7
Total	7600.9

Ilustración 2. Aminograma del BSG (Qin et al., 2018).

2.3. Obtención de proteínas a partir de residuos agrícolas.

Para obtener proteínas a partir de los residuos agrícolas de manera convencional, primeramente, se debe elegir el método de extracción/solubilización, tales métodos se clasifican en químicos, bioquímicos y físicos o fisicoquímicos, también es plausible la combinación de estos; posteriormente se separan las proteínas de los extractos, se concentran y si se requiere, se lleva a cabo una purificación adicional

(Contreras *et al.*, 2019). Las etapas de obtención de proteínas en una biorrefinería se ejemplifican en la *Ilustración 3*.

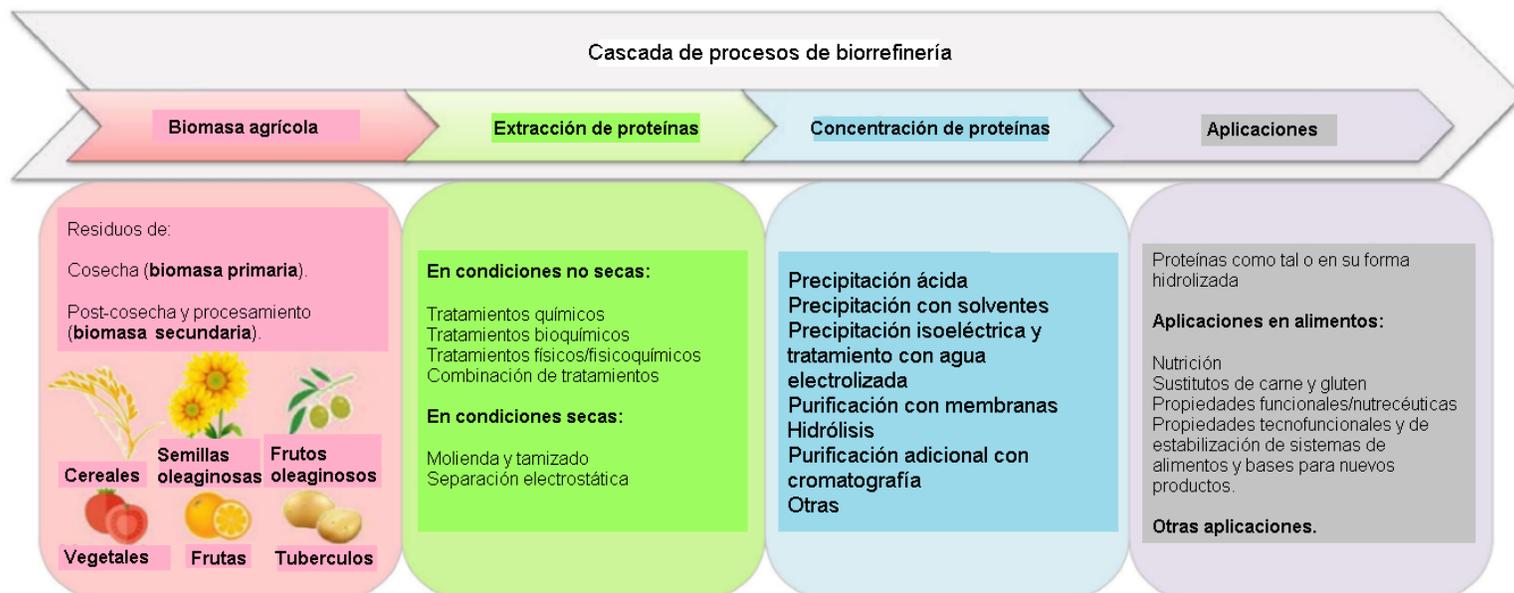


Ilustración 3. Obtención de proteínas en biorrefinerías (traducido de Contreras et al., 2019).

Una alternativa para el aprovechamiento de residuos agrícolas para la producción de proteínas es el uso de microorganismos para producir SCP, convirtiéndose en una buena práctica cada vez más viable e interesante para convertir los desechos alimentarios en productos de valor agregado. Residuos agrícolas ricos en azúcares fermentables y no fermentables, como aquellos derivados de la industria cítrica, han sido aprovechados como sustrato para la producción de SCP, ayudando a reducir la contaminación por esta clase de residuos, y también se obtienen proteínas útiles para la producción de alimentos (Gervasi *et al.*, 2018).

2.3.1. Métodos de extracción de proteínas.

Los métodos de extracción/solubilización, se eligen en función a las características de las proteínas de los residuos agrícolas a tratar, pues las proteínas vegetales presentan propiedades fisicoquímicas diversas (Contreras *et al.*, 2019), diversos estudios sugieren que las combinaciones de métodos convencionales (como extracción por disolventes y extracción alcalina) y no convencionales (extracción asistida por enzimas, asistida por ultrasonido, asistida por microondas, asistida por

campo eléctrico pulsado, asistida por altas presiones y extracción por extrusión de doble tornillo) ofrecen mejores rendimientos (Kumar *et al.*, 2021).

Una propiedad importante para la extracción de proteínas vegetales es la solubilidad. La presencia de proteínas tanto hidrofílicas como lipofílicas, da como resultado solubilidades proteicas variables en agua (Du *et al.*, 2020). De acuerdo con la clasificación de Osborn (1895), las proteínas solubles en agua son aquellas denominadas albúminas; las proteínas solubles en soluciones salinas son denominadas globulinas; las prolaminas son aquellas proteínas que son solubles en etanol al 70%; por último, están las glutelinas, que son las proteínas solubles en soluciones alcalinas diluidas (Eskin & Shahidi, 2013).

En los últimos años se han buscado tecnologías más ecológicas no térmicas para mejorar la eficiencia de las extracciones y reducir la degradación de las proteínas durante el proceso, así también se han buscado métodos que no presenten efectos nocivos al medio ambiente y con estos se puedan producir proteínas seguras para el consumo (Kumar *et al.*, 2021), ejemplos de estos se observan en la *Ilustración 4*.

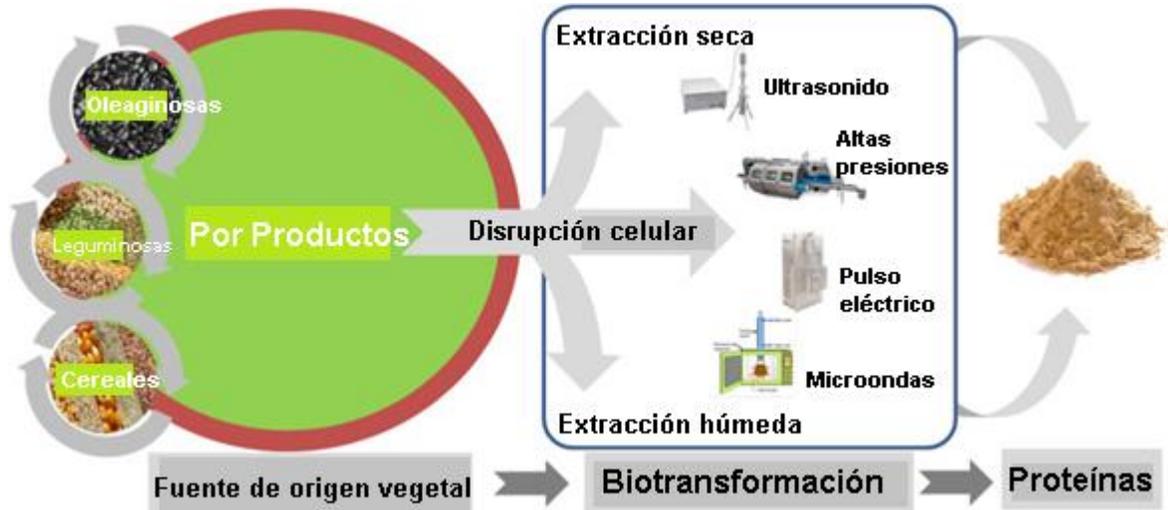


Ilustración 4. Tecnologías no convencionales y ecológicas (traducido de Pojić et al., 2018).

A continuación, se abordarán algunos métodos de extracción tanto convencionales como no convencionales para la extracción de proteínas.

2.3.1.1. Extracción con disolventes orgánicos.

Las proteínas de almacenamiento solubles en alcohol, las prolaminas, se pueden solubilizar utilizando disolventes orgánicos como el cloroformo o el hexano, sólo una cantidad pequeña puede extraerse con agua, sal, ácidos o álcalis (Wang *et al.*, 2007).

De manera tradicional se emplea hexano debido a su estabilidad, baja corrosividad, con él se obtienen harinas con bajo contenido de aceite residual y buenas características sensoriales, sin embargo, es altamente inflamable, tóxico y es obtenido de recursos no renovables, contribuyendo a la contaminación ambiental; alternativamente se ha buscado sustituirse por alcoholes de cadena corta como el etanol o el isopropanol, por su seguridad operativa, baja toxicidad y pueden obtenerse de recursos renovables. Para una extracción de proteínas con mejores rendimientos, los alcoholes deben presentar un bajo contenido de agua, pues el contenido de agua y la temperatura afectan la solubilidad de la fracción proteica (Capellini *et al.*, 2017).

El agua también puede emplearse como disolvente de extracción, Qin *et al.*, 2018, lograron obtener un rendimiento de 64-66% extrayendo las proteínas del BSG mediante un tratamiento hidrotermal a 60°C, resultando ser un método de extracción selectivo con un rendimiento sorprendente, pues se obtuvo un porcentaje de proteínas mayor al esperado, pues se ha reportado que las albúminas y globulinas (proteínas que pueden extraerse con este método) conforman hasta 20% de las proteínas totales de este residuo agroindustrial (Riaño *et al.*, 2021).

2.3.1.2. Extracción alcalina.

La extracción alcalina produce la ruptura de las paredes celulares vegetales con soluciones básicas para facilitar la extracción (Du *et al.*, 2020).

Este método es el más común para extraer proteínas, más respetuoso con el medio ambiente que la extracción con disolventes orgánicos, se emplea para mejorar la capacidad de extracción, pues las soluciones alcalinas pueden romper los enlaces

disulfuro, incluso la solubilidad mejora a pH básico por la ionización de aminoácidos ácidos y neutros (Contreras *et al.*, 2019).

Si los residuos agrícolas contienen albúminas como fracción principal, se puede utilizar un método de extracción utilizando solamente agua como disolvente, pero con el uso de soluciones alcalinas, aparte de solubilizar glutelinas, se favorece la extracción de albúminas, globulinas e incluso prolaminas (Hojilla-Evangelista *et al.*, 2017).

La extracción alcalina puede producir rendimientos de proteínas de más del 90% en cultivos de soya, colza y otros cultivos oleaginosos, incluso se puede aplicar en cereales (Kumar *et al.*, 2021). Qin *et al.* (2018) obtuvieron buenos rendimientos de extracción de proteína con un tratamiento alcalino en combinación con un tratamiento ácido en BSG, con un rendimiento del 95%, la desventaja es que no es un método selectivo, es decir, se solubiliza una gran cantidad de carbohidratos y lignina junto con las proteínas.

Rommi *et al.* (2018), sugieren que, al fraccionar la lignina y las proteínas a pH ácido después del tratamiento alcalino, el precipitado mantiene una cantidad importante de proteínas y lignina en su composición, estos resultados indican que la coprecipitación puede implicar interacciones fuertes, posiblemente enlaces covalentes, entre proteínas y lignina.

A pesar de los altos rendimientos, bajo costo y una recuperación completa de triptófano con este método de extracción, se puede producir hidrólisis de las proteínas, alterando su funcionalidad, incluso puede conducir a la destrucción completa de la mayoría de los aminoácidos (Hou *et al.*, 2017; Fetzer *et al.*, 2018).

2.3.1.3. Extracción asistida por enzimas.

Los procesos de extracción asistidos por enzimas se han aplicado cada vez más para el tratamiento de la materia lignocelulósica y de las propias proteínas. Cuando los rendimientos de extracción resultan bajos, pueden emplearse carbohidratasas con la finalidad de hidrolizar los carbohidratos que componen la pared celular y de esta manera liberar a las proteínas que se encuentran ligadas al material

lignocelulósico, también pueden usarse proteasas para hidrolizar y solubilizar a las proteínas, promoviendo su extracción, o bien, pueden usarse en conjunto ambos tipos de enzimas (Contreras *et al.*, 2019).

La hidrólisis enzimática puede realizarse en condiciones suaves, ácidas, básicas o neutras de acuerdo con las enzimas utilizadas, incluso se pueden evaluar las condiciones de proceso (pH, relación sólido-líquido, tiempo de extracción, temperatura y número de ciclos de extracción) con la finalidad de maximizar los rendimientos en la extracción (Fetzer *et al.*, 2018).

Rommi *et al.* (2018), sugieren que las proteínas del BSG aumentan su solubilidad del 15% (en los granos sin tratamiento) a un 80% usando proteasa alcalina comercial (Alcalase 2.4), incluso mencionan que puede aumentar aún más empleando carbohidratasa y proteasa alcalina.

La extracción asistida por enzimas proporciona proteínas que exhiben alta estabilidad térmica, baja viscosidad y menor resistencia al daño oxidativo, por lo que son productos con propiedades funcionales mejoradas (formación de espuma, solubilidad, emulsificación) y propiedades biológicas (quelación de metales, antioxidantes y eliminación de radicales libres). Los rendimientos también pueden mejorar combinando esta técnica con otras técnicas de extracción de proteínas (microondas, ultrasonido, alta presión) (Kumar *et al.*, 2021).

El uso de enzimas puede realizarse en condiciones suaves con control preciso del grado de hidrólisis, minimizando las reacciones secundarias y la generación de factores tóxicos en los productos. Pueden emplearse enzimas de origen microbiano como proteasas que pueden hidrolizar proteínas en péptidos y aminoácidos libres, y otras enzimas que pueden degradar carbohidratos complejos y lípidos, algunas tienen la ventaja de eliminar factores alergénicos o antinutricionales, la desventaja son los costos relativamente altos y la limitación de la actividad enzimática por la posible presencia de inhibidores enzimáticos presentes en los residuos agrícolas (Hou *et al.*, 2017).

2.3.1.4. Extracción con agua subcrítica.

El agua subcrítica es aquella que se encuentra a 100-374°C, las presiones de hasta 22 Mpa la mantienen en estado líquido, sus propiedades son distintas a las del agua, la viscosidad y densidad disminuyen, la compresibilidad es baja y la constante dieléctrica es menor debido a que la estructura de enlace de hidrógeno se debilita, esto último facilita la solubilización de componentes apolares (Álvarez-Viñas *et al.*, 2021).

La tecnología del agua subcrítica es una técnica eficiente para la hidrólisis como para la extracción de proteínas, pero primero se necesitan seleccionar las condiciones adecuadas para maximizar los rendimientos de extracción y evitar la descomposición en monómeros y productos de extracción (Álvarez-Viñas *et al.*, 2021).

Riaño *et al.* (2021) lograron extraer 78% de la proteína total del grano gastado de malta empleando agua subcrítica a 185°C, 5 Mpa y 4 mL/min en un reactor de lecho fijo, un rendimiento alto en comparación con un tratamiento enzimático con proteasa donde obtuvieron un rendimiento de 47.1%, incluso superó al tratamiento alcalino, en este obtuvieron un rendimiento del 50.5%.

La extracción con agua subcrítica está emergiendo como un método de extracción “verde”, que evita el uso de otras sustancias químicas como los disolventes o las soluciones alcalinas al proceso, incluso es un método prometedor, pues los rendimientos y pureza de las proteínas extraídas es comparable con el tratamiento de extracción alcalina (Du *et al.*, 2020).

2.3.1.5. Extracción por extrusión de doble tornillo.

La extrusión de doble tornillo es una tecnología muy versátil que permite realizar diferentes operaciones unitarias (transportar, triturar, mezclar, cizallar, evaporar, comprimir, extraer, dar forma), en el equipo se ajusta la temperatura y energía mecánica, pueden emplearse sustancias químicas, por ello se considera como un reactor termo-mecánico-químico, en las biorrefinerías puede realizarse el

tratamiento heterogéneo de la biomasa permitiendo la separación líquido-sólido (Evon *et al.*, 2018).

La extrusión mejora la lisis mecánica de las células vegetales, la acción extrusora del equipo se debe a los diferentes elementos que lo componen: los tornillos de paso hacia adelante producen una acción de transporte, los tornillos de paleta monolobe ejercen principalmente una acción de compresión y cizallamiento radial, y los tornillos de paso inverso aplican cizallamiento intensivo, mezclado y también un fuerte esfuerzo axial, compresión en combinación con los tornillos de paso hacia adelante (Colas *et al.*, 2013).

La disposición en diferentes posiciones y diferente espaciamiento de los elementos en el equipo definen “la configuración del equipo”, factor principal influyente en el rendimiento de la extrusión; otro factor importante es la fuerza de cizallamiento o corte, a mayor fuerza, mayor es la extracción de proteínas, con este método se puede extraer hasta más del 50% en peso seco de proteína en plantas verdes a temperatura ambiente, pues la temperatura no es factor influyente en la extracción (Colas *et al.*, 2013).

En la *Ilustración 5* se puede observar la representación esquemática de un cilindro de una extrusora de doble tornillo.

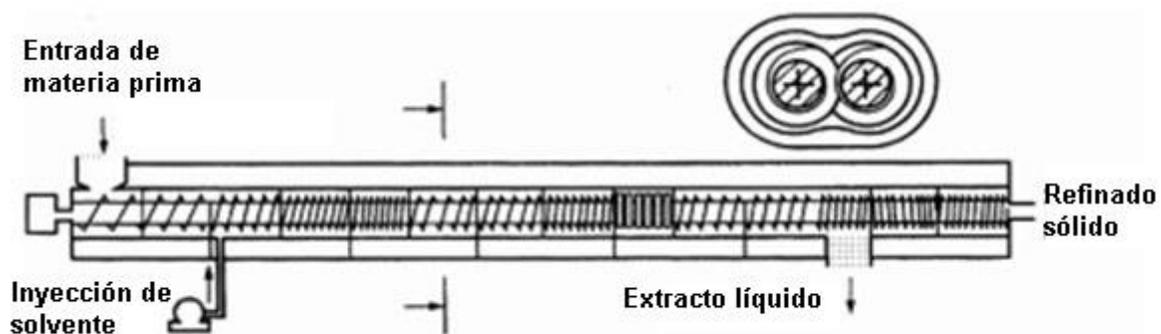


Ilustración 5. Extrusora de doble tornillo (traducido de Evon et al., 2018).

2.3.1.6. Extracción asistida por ultrasonido.

Las ondas de energía de ultrasonido, que son ondas sonoras a una frecuencia de 20 kHz (Pojić *et al.*, 2018), conducen a la formación de burbujas de cavitación en la superficie de las paredes celulares, estas burbujas rompen eventualmente las paredes y membranas de las células, de esta manera se liberan las proteínas de las células en el disolvente circundante conduciendo a buenos rendimientos de extracción (Kumar *et al.*, 2021). La implosión de las burbujas de cavitación, la formación de microjets, la microturbulencia, las colisiones de partículas de alta velocidad y la perturbación en partículas microporosas, dan como resultado mejores rendimientos de extracción, mientras que las reacciones sonoquímicas, la sonólisis del agua, la formación y colapso de las burbujas cavitacionales y la microcorriente aplicada, provocan cambios tecno-funcionales en las proteínas (Li *et al.*, 2021).

Le extracción asistida por ultrasonido es una técnica rápida, rentable y puede usarse a gran escala en la industria alimentaria, no requiere de altas temperaturas, por lo que puede extraer con mejores rendimientos proteínas termolábiles, eficiente en la extracción de proteínas a partir de semillas oleaginosas como las de girasol, soya, cacahuete y otros tipos de residuos agrícolas, sin embargo, el poder de sonicación prolongado y alto pueden reducir los rendimientos de la extracción, pues los radicales hidroxilos formados estimulan la agregación de las proteínas por formación de enlaces disulfuro, incluso la agitación acústica prolongada provocada por la cavitación, da como resultado la desnaturalización de fracciones de proteínas solubles (Kumar *et al.*, 2021).

Li *et al.*, 2021 lograron un rendimiento de extracción de 86.16% de proteínas BSG mediante extracción alcalina asistida por ultrasonido (rendimiento alto en comparación a la extracción tradicional sin ultrasonido donde se obtuvo un rendimiento de 45.71%), emplearon NaOH 110 mM, una relación sólido-líquido 1:15 (m/v) bajo tratamiento con ultrasonido a 250 W, 20 min. y un ciclo de trabajo del 60%. Incluso demostraron una mejoría en las propiedades funcionales de las proteínas, entre ellas la capacidad de absorción de grasas, propiedades emulsionantes y espumantes, sin embargo, no mejoró la capacidad de retención de

agua. La mejora de las propiedades funcionales se atribuye a la modificación estructural de las proteínas por la sonicación.

2.3.1.7. Extracción asistida por campo eléctrico pulsado.

En esta técnica, los residuos agrícolas se someten a alta intensidad de campo eléctrico (100-300 V/cm a 10-50 kV/cm) por un breve periodo de tiempo (de micro a milisegundos) (Pojić *et al.*, 2018), provocando la formación de poros en las membranas celulares, ayudando a la liberación de las proteínas al disolvente de extracción (Kumar *et al.*, 2021).

La extracción eléctrica a bajas temperaturas, con duración de pulso más prolongada y mayor intensidad de campo eléctrico provoca una mayor recuperación de proteínas, sin embargo, existe una necesidad de optimizar los factores de entrada para extraer proteínas en su estado nativo. Con este método la calidad de la proteína se ve mínimamente afectada durante el proceso y almacenamiento, incluso la extracción de proteínas en su forma pura, es decir, sin necesidad de un método de purificación, hace a esta técnica única en comparación con otras técnicas, esto último se atribuye a la electroporación (Kumar *et al.*, 2021).

2.3.1.8. Extracción asistida por microondas.

La técnica de extracción asistida por microondas emplea ondas electromagnéticas de frecuencia en el rango de 300 MHz a 300 GHz, la energía de esta radiación rompe los enlaces de hidrógeno, permite la migración de los iones disueltos y aumenta la porosidad de la matriz biológica (Pojić *et al.*, 2018), de esta manera, se facilita la entrada del disolvente en la matriz de la materia lignocelulósica, promoviendo el movimiento de las proteínas solubles al disolvente, mejorando la extracción (Kumar *et al.*, 2021).

Esta técnica tiene la ventaja de extracción en poco tiempo y de uso de menor cantidad de disolvente, sin embargo, la radiación de las microondas genera una gran cantidad de energía térmica que puede provocar la degradación de compuestos como las proteínas termolábiles, por lo que se requieren pulsos breves

de microondas y la optimización de parámetros de entrada de microondas para extraer proteínas vegetales de manera eficiente (Kumar et al., 2021).

El uso de radiación electromagnética de microondas puede alterar la estructura secundaria de las proteínas, por lo que disminuye la alergenicidad, incluso se ha demostrado que este método es útil para disminuir antinutrientes (Pojić *et al.*, 2018).

Esta técnica es adecuada para materia vegetal estructuralmente rígida, que son difíciles de digerir por enzimas y/u ondas de ultrasonido, este tipo de materia vegetal puede provenir de subproductos de la industria de la molienda, como el salvado de trigo, arroz y sésamo (Kumar *et al.*, 2021).

2.3.1.9. Extracción asistida por alta presión.

En esta técnica, al aplicar altas presiones a los residuos agrícolas, las proteínas se liberan gracias a que la presión rompe las paredes celulares (Kumar *et al.*, 2021), la presión puede alterar los enlaces no covalentes, enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos y las interacciones hidrofóbicas, por lo que puede alterar moléculas grandes como las que constituyen las paredes celulares y también como las proteínas, que al hidrolizarse en péptidos solubles, se mejora su extracción (Contreras *et al.*, 2019).

La extracción asistida por alta presión es una técnica de extracción ecológica que está ganando popularidad como alternativa a los métodos convencionales basados en disolventes, es una técnica rápida, con altos rendimientos y con impurezas mínimas en el producto final, al ser una técnica que se realiza a temperatura ambiente, se evita la degradación térmica de proteínas termolábiles (Kumar *et al.*, 2021).

2.3.2. Obtención de proteína unicelular (SCP) usando residuos agrícolas como sustrato.

La SCP, puede definirse como la masa celular rica en proteínas derivadas de microorganismos cultivados a gran escala para consumo animal o humano, este tipo de proteínas contienen todos los aminoácidos esenciales, siendo una gran alternativa para obtener este tipo de macromoléculas, pues los microorganismos tienen una alta tasa de crecimiento con sustratos económicos (como los residuos

agrícolas, por ejemplo) (Glazer & Nakaido, 2007). Algunos residuos agrícolas usados comúnmente como sustratos son los residuos provenientes de frutas como las manzanas, frutas cítricas, ñame, piña, papaya, desechos de tubérculos como la papa, etc. A partir de estos, se elaboran los medios de crecimiento donde se lleva a cabo la fermentación sumergida o de naturaleza sólida con tratamientos posteriores como purificación, ruptura celular y lavado para finalmente obtener tasas generalmente altas de producción de SCP (Sharif *et al.*, 2021).

La SCP proviene de hongos, bacterias, levaduras e incluso algas. Los hongos y las bacterias son los microorganismos más comunes para la producción de SCP. Además del contenido de proteínas que puede alcanzar hasta el 80% en peso seco, también consta de carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos, vitaminas y minerales (Sharif *et al.*, 2021).

Las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* son microorganismos potenciales para la producción de SCP para consumo humano, caracterizados por un crecimiento rápido, tienen la ventaja de tener un tamaño relativamente grande (5-10 μm) que facilita su separación, contiene un alto porcentaje de vitaminas del complejo B, la cantidad de ácidos nucleicos va de 4 a 10% y la cantidad de proteínas es de aproximadamente 60%, estas proteínas contienen aminoácidos esenciales como lisina, triptófano, treonina, metionina y cisteína. La desventaja de estos microorganismos es la cantidad de ácido úrico, esta es mayor que en las plantas y animales, lo que limita el uso de esta SCP en la alimentación humana, aunque pueden aplicarse métodos para la eliminación de ácido úrico de la SCP (Gervasi *et al.*, 2018).

El ácido úrico, proveniente del catabolismo de los ácidos nucleicos, específicamente de la degradación de las purinas, incrementa el riesgo de desarrollar la enfermedad de la gota y de desarrollar cálculos renales en los humanos, por ello en 1972, un Grupo Asesor de Proteínas de las Naciones Unidas, recomendó que las SCP destinadas para consumo humano no deben de aportar más de 2 g de ácido úrico por día (Glazer & Nakaido, 2007).

Se puede obtener SCP a partir de cultivos de bacterias, pues contienen un alto contenido de proteína, pueden crecer en sustratos de bajo costo con mínimos requisitos de suelo, agua y temperatura, Mahan *et al.* (2018) sugieren la producción de SCP a partir de residuos cítricos y de maíz con *Rhodococcus opacus* para alimentación animal, lo cual es una buena alternativa para obtener proteínas, ya que los residuos cítricos se producen en enormes cantidades, no son ricos en proteínas (6% aprox. En base seca) pero son ricos en azúcares fermentables como la glucosa e insolubles como la pectina y la celulosa. Con este tipo de bacterias se puede producir una biomasa con un contenido de proteínas de hasta 63% en peso seco sin necesidad de pretratar extensamente el sustrato y suplementarlo con nutrientes, la cantidad de proteína puede aumentar optimizando condiciones del medio de fermentación. La limitante para la producción de SCP para consumo humano puede ser la cantidad de ácido úrico que aportan este tipo de microorganismos, que no está reportado en el estudio, pero se sabe que es considerable por el tipo de microorganismo.

Los hongos filamentosos también pueden usarse para producir SCP, son ricos en proteínas de fácil digestión, aminoácidos esenciales y no esenciales, también cuentan con un bajo contenido de grasas, lo cual convierte a estos microorganismos en una fuente nutritiva de proteínas (Parchami *et al.*, 2021). *Fusarium venenatum* es un hongo que ha sido aceptado para la producción de proteínas para consumo humano, pues las células se separan del caldo de fermentación, el cual contiene los productos de degradación de los ácidos nucleicos; una ingesta de 17-33 g/persona/día aportaría 0.35-0.7 g/persona/día de ácido úrico, muy por debajo de los 2 g/persona/día que recomienda el Grupo Asesor de Proteínas de las Naciones Unidas. Estudios en animales sugieren que las proteínas producidas por *F. venenatum* no causa toxicidad crónica, no causa toxicidad reproductiva, teratogénica y no es carcinógena; incluso no contiene factores antinutricionales y es mucho menos alergénica que otros productos de consumo habitual como los cacahuates o los mariscos; aporta cerca de 50% de proteínas en peso seco con todos los aminoácidos esenciales y totalmente digeribles, con calidad similar a las proteínas del huevo y la caseína de leche (Glazer & Nakaido, 2007). Actualmente,

la empresa de Reino Unido “Marlow Foods”, produce un sustituto de carne llamado Quorn™ usando SCP mediante el cultivo de *F. venenatum* en un medio sintético, el uso de un medio sintético y la falta de competencia, provocan que este producto sea más caro que la propia carne, sin embargo, podrían usarse sustratos baratos para disminuir el costo final del producto, por ejemplo, el grano gastado de malta de cervecería (Parchami *et al.*, 2021).

El cuidado más importante con los hongos filamentosos es la producción de micotoxinas, metabolitos secundarios producidos por hongos de géneros como *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, estos metabolitos son altamente tóxicos para el ser humano, se producen en carencia de nutrientes o baja presión de oxígeno, por ello es importante brindarle a estos hongos medios de fermentación sin limitaciones nutricionales, si se usan residuos agrícolas se necesita determinar si contienen los nutrientes necesarios o se requiere de suplementación, de tal manera que se evite la producción de micotoxinas (Glazer & Nakaido, 2007).

Algunos tipos de microalgas se han utilizado para producir SCP para consumo humano y animal, contienen un contenido saludable con proteínas en cantidades de hasta 70% en peso seco, una buena fuente de lípidos (especialmente ácidos grasos omega 3), aportan minerales, vitaminas, clorofila y aportan antioxidantes; la cantidad de ácidos nucleicos oscila entre 3 y 8%. El cultivo de estos microorganismos es sencillo, el crecimiento es rápido y con buen uso de la energía solar, algunas especies como *Spirulina*, *Chlorella* y *Senedesmus* son potenciales para la producción de SCP (Sharif *et al.*, 2021).

2.3.2.1. SCP a partir de residuos agrícolas de la industria cervecera.

La producción de SCP a partir del BSG, gracias a su alto contenido de proteínas (14-30%) y carbohidratos fermentables como el almidón (hasta 20%), permite la producción de una fuente alternativa de proteínas que tiene el potencial de contribuir a la seguridad alimentaria mundial, así también a la reducción del impacto ambiental incorporando estos residuos agrícolas en la producción de alimentos. Para preparar un medio de cultivo a partir del BSG, primeramente, debe someterse a un pretratamiento con la finalidad de separar el almidón y las proteínas de la fibra, pues

los sólidos en suspensión (principalmente conformados por fibra) en un medio de cultivo sin dicho pretratamiento, afectan negativamente la digestibilidad del producto final, limitando la incorporación de la SCP en los alimentos, además los hongos consumen principalmente almidón, dejan casi intacta la celulosa y la hemicelulosa. También un pretratamiento en condiciones adecuadas evitará la formación de furfural e hidroximetil furfural (HMF), que son compuestos tóxicos producidos por la degradación de azúcares, incluso se evita la formación de ácido fórmico y ácido levulínico (productos de la degradación del furfural e HMF), compuestos indeseables en el producto con efecto inhibitor en los cultivos de hongos filamentosos (Parchami *et al.*, 2021).

Parchami *et al.* (2021), prepararon un medio de cultivo líquido rico en almidón y proteínas a partir de BSG. Para la separación del almidón y las proteínas de la fibra, así como para controlar la formación de compuestos inhibidores, determinaron que el pretratamiento hidrotermal adecuado para el grano gastado de malta de cervecería es a 180°C por 30 min., o bien, a 140°C durante 4 h. Con el pretratamiento hidrotermal se logró solubilizar hasta el 83% del contenido total de almidón y hasta 48% del total de proteínas. El medio de cultivo permitió la obtención de biomasa fúngica con alto contenido de proteína (hasta 59% del contenido total) usando *Neurospora intermedia*.

El BSG puede emplearse junto con otros residuos agrícolas para crear un medio de cultivo rico en nutrientes sin necesidad de utilizar componentes sintéticos, Aggelopoulos *et al.* (2018) crearon un medio de cultivo a partir de BSG (30 g), pulpa de naranja (5 mL), melaza (20 mL), pulpa de papa (20 mL), suero de leche (5 mL) y raicillas de malta gastada (5 g), a pH 4 y una temperatura óptima de crecimiento de 25°C. En este medio se produjeron proteínas a partir de *Pleurotus ostreatus*, donde la masa fúngica tuvo un alto contenido de proteínas (30% del contenido total), así también contenía minerales (principalmente magnesio) y compuestos volátiles de aroma, tal composición indica que las proteínas fúngicas tienen el potencial de uso como suplemento alimenticio rico en proteínas para uso en alimentos, incluso, por su alto contenido en ácido ribonucleico, muestra potencial para ser usado como

aditivo alimentario, específicamente como potenciador de sabor (en bajas cantidades). La desventaja fue la producción de acetaldehído, el cual es un inhibidor de crecimiento del hongo y, por lo tanto, se obtiene menor cantidad de SCP de la que debería.

Pleurotus albidus, es otro hongo con potencial para la bioconversión de los residuos agrícolas en productos de valor agregado, es una especie versátil y fácil de cultivar en residuos agrícolas. Stoffel *et al.*, (2021) obtuvieron harina de micoproteína a partir del cultivo de *P. albidus* sobre BSG, esta harina fue utilizada para elaborar galletas ricas en proteína y fibra, las galletas presentaron 11.6% de proteínas, aumentando 67% el contenido de este macronutriente con respecto a un control de galletas de harina de trigo, además se evidenció que hubo aumento en el contenido de fibra, contenido fenólico y actividad antioxidante.

2.4. Purificación de las proteínas.

Las primeras técnicas usadas para el fraccionamiento y purificación de proteínas tienen como fundamento la adsorción y la precipitación, estas técnicas se siguen usando hoy en día como pasos preliminares para el fraccionamiento o la concentración de soluciones muestra, fue hasta las décadas de 1950 y 1960 que se desarrollaron las técnicas electroforéticas y cromatográficas, técnicas que sentaron las bases de los métodos de purificación actuales. Antes de diseñar un protocolo para la purificación, se debe recopilar tanta información como sea posible acerca de las proteínas obtenidas, se deben de tener en cuenta las impurezas más importantes, se necesitan conocer características como el peso molecular aproximado, el punto isoeléctrico, grado de hidrofobicidad, presencia de carbohidratos o grupos sulfhídricos libres; se deben de establecer criterios con respecto a la estabilidad de las proteínas obtenidas, por ello se deben tener en cuenta los parámetros que afectan la estructura de las proteínas como la temperatura, el pH, disolventes orgánicos, metales pesados y fuerza de cizallamiento o corte. El número promedio de pasos en un procedimiento de purificación es de 4, muy pocas veces se puede obtener proteínas puras a partir de

un solo procedimiento (Janson, 2011). En la *Tabla 1* se muestra de manera esquemática la preparación de un procedimiento de purificación en tres etapas.

Tabla 1. Etapas de un procedimiento de purificación de proteínas (Janson, 2011).

Etapa	Fundamento	Técnicas para el fraccionamiento
1	Clarificación de las proteínas, separándolas de pigmentos, compuestos fenólicos, lípidos, ácidos nucleicos y otras sustancias.	<p>Centrifugación: Útil a nivel laboratorio, se pueden emplear centrifugadoras refrigeradas con velocidades de 20,000 a 75,000 rpm.</p> <p>Microfiltración: La microfiltración tangencial o de flujo cruzado recibe una mayor atención para aplicaciones a gran escala.</p> <p>Ultrafiltración: El proceso de ultrafiltración es suave, rápido y económico, se usan membranas con diferentes límites de corte para la separación de moléculas desde 1 a 300 kDa, puede separar sales o moléculas pequeñas de fracciones de proteínas con mayor peso molecular, al mismo tiempo, puede efectuar la concentración de proteínas.</p> <p>Precipitación: Las proteínas a granel en el extracto bruto suelen precipitarse con el material particulado residual, posteriormente las proteínas de interés son precipitadas de la solución sobrenadante resultante, a veces, se deja a las proteínas de interés en las aguas madres para su aplicación en columnas cromatográficas. Los agentes precipitantes más comunes son: Sulfato de amonio, sulfato de sodio, etanol, acetona y polietilenglicol.</p> <p>Separación líquido-líquido: Es una forma radicalmente diferente para la separación inicial de</p>

		<p>las proteínas, el fraccionamiento se lleva a cabo en un sistema de dos fases líquido-líquido de dos polímeros, comúnmente se usa polietilenglicol y otro polímero como el dextrano. Es posible obtener la proteína de interés en la fase superior generalmente de polietilenglicol; en la fase inferior, incluso en la interfase, se recogen las proteínas a granel contaminantes y otras partículas, estas se pueden eliminar por centrifugación.</p>
2	<p>Etapa cromatográfica, donde hay una partición diferencial de las proteínas entre una fase estacionaria (adsorbente) y una fase móvil (solución tampón), normalmente el adsorbente se empaqueta en columnas de plástico, vidrio o acero inoxidable, mientras que la solución tampón se bombea a través de la columna. Las condiciones</p>	<p>La elección de las técnicas cromatográficas se rige por los siguientes parámetros: volumen de la muestra, concentración de proteínas, viscosidad de la muestra, presencia de ácidos nucleicos, pirógenos y enzimas proteolíticas en la muestra; y la facilidad con la que pueden lavarse los diferentes tipos de adsorbentes, contaminantes adsorbidos y proteínas desnaturalizadas.</p> <p>Las técnicas cromatográficas más comunes son las siguientes:</p> <p>Tamaño y forma: Filtración en gel, cromatografía de exclusión por tamaño.</p> <p>Carga neta y distribución de grupos cargados: Cromatografía de intercambio iónico.</p> <p>Punto isoeléctrico: Cromatoenfoco.</p> <p>Hidrofobicidad: Cromatografía de fase inversa, cromatografía de interacción hidrofóbica.</p> <p>Unión de metales: Cromatografía de iones metálicos inmovilizados.</p> <p>Contenido de grupos tiol expuestos: Cromatografía covalente.</p>

	preliminares de separación pueden conocerse en bases de datos o a través de ensayos preliminares a escala analítica.	Afinidades bioespecíficas por ligandos, inhibidores, receptores, anticuerpos, etc.: Cromatografía de afinidad.
3	El paso final tiene como propósito eliminar posibles agregados o productos de degradación y acondicionar la proteína purificada para su posterior uso o almacenamiento. El procedimiento será diferente de acuerdo con el destino de la proteína.	Filtración en gel: Eliminación de agregados y productos de degradación. Transferencia de proteínas a tampones volátiles: Se lleva a cabo este procedimiento si las proteínas se van a liofilizar. Eliminación de endotoxinas (lipopolisacárido) y ácidos nucleicos: Se lleva a cabo en proteínas destinadas a uso parenteral en seres humanos. Ultrafiltración: Técnica utilizada para la concentración de proteínas. Diálisis: Concentración de pequeños volúmenes de soluciones de proteínas en bolsas de diálisis cubierta por una sustancia de alto peso molecular que no penetran la bolsa, pero generan presión osmótica para eliminar el líquido a través de la membrana de diálisis. Secado: Las proteínas con actividad biológica detienen sus procesos cuando se liofilizan, es decir, se secan por la sublimación del agua, esta técnica se usa para el almacenamiento de dicho tipo de proteínas.

2.5. Impresión en 3D.

La impresión en 3D o también conocida como fabricación aditiva, es un método para crear objetos tridimensionales depositando material capa por capa. Las impresoras 3D pueden imprimir materiales como alimentos, cerámica, madera, plástico extruido o polvo e inclusive células humanas. Enfocándonos en el área de los alimentos, se pueden imprimir alimentos como frutas, pasta, galletas, chocolate, goma de mascar, inclusive alimentos nutricionales personalizados (Singhal *et al.*, 2020).

La impresión de alimentos en 3D permite diseñar nuevos productos con la forma, sabor, tamaño y personalización deseados gracias a un nuevo enfoque de producción asistida por computadora (Candoğan & Bulut, 2021), esto abre posibilidades para adaptar los contenidos de los alimentos de acuerdo a los requerimientos de salud y actividad física de cada individuo, así también de acuerdo a sus preferencias gustativas personales, abriendo oportunidades a las empresas de fabricar alimentos instantáneos personalizados en el punto de venta (Jiang *et al.*, 2019).

Básicamente el proceso de impresión en 3D se lleva a cabo en tres etapas: Modelado, corte e impresión. La primer etapa denominada como modelado, consiste en diseñar el alimento con la ayuda de un software de diseño asistido por computadora (CAD por sus siglas en inglés); la segunda etapa consta del corte realizado mediante un lenguaje de programación denominado como Código G, el cual contiene una serie de códigos que determinan paso a paso cómo deben moverse los ejes de la impresora; por último, la tercera etapa que es la impresión del alimento, se basa en el principio de la acumulación de capas del material que se encuentra contenido en cartuchos, utiliza datos digitales preparados en una computadora (Candoğan & Bulut, 2021).

En la *Ilustración 6* se muestra el proceso de elaboración de una galleta paso por paso mediante una impresora 3D, donde podemos observar las tres etapas (modelado, generación del código G para el corte y la etapa de impresión) ilustradas junto con pasos necesarios para la elaboración de la galleta, como la selección de la receta y la cocción después de la deposición.

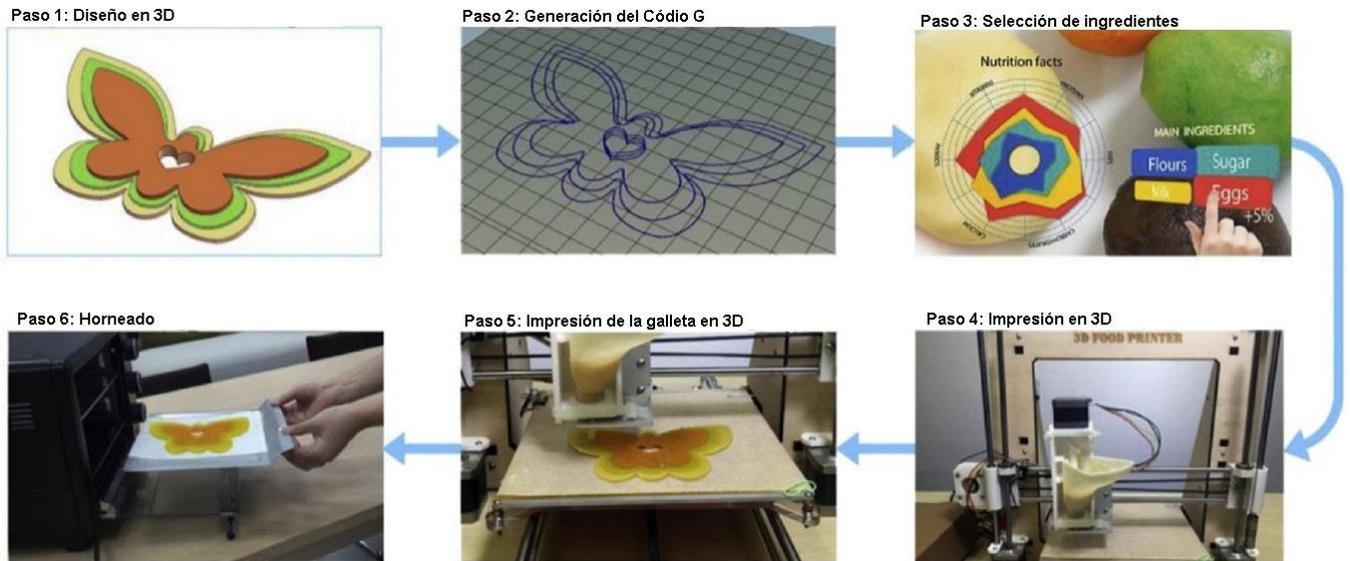


Ilustración 6. Proceso de elaboración de una galleta mediante impresión 3D (traducido de Sun et al., 2018).

Algunas impresoras 3D para la impresión de alimentos son aptas para uso doméstico, otras pueden emplearse para la producción industrial de alimentos, pues son avanzadas y polivalentes, esto permite su alta eficacia y automatización. Esta tecnología, en comparación con los métodos tradicionales de producción de alimentos, se considera como una tecnología desafiante del futuro por sus diferentes ventajas, entre ellas permite ahorrar energía y tiempo, minimiza los desperdicios, permite crear prototipos rápidos y es fácil de integrar en la línea de producción (Candoğan & Bulut, 2021).

A pesar del gran potencial y las múltiples ventajas que presenta la impresión de alimentos en 3D, también hay limitaciones, una de ellas es que algunos materiales alimenticios no son aptos para ser impresos por su débil estabilidad estructural, otros materiales alimentarios son difíciles de incorporar entre sí o el propio producto impreso resulta difícil de cocinar; también como limitación está el impacto que puede presentar el producto terminado por la variabilidad de la materia prima; otras limitaciones son las dificultades que pueden presentarse con las características intrínsecas de los alimentos como la sensación en la boca o el sabor, pues pueden no estar a la altura de las expectativas del consumidor (Jiang et al., 2019). La impresión de alimentos en 3D se encuentra en una etapa temprana, se necesitan

desarrollos tecnológicos en este campo para garantizar la calidad de los productos finales (Pérez *et al.*, 2021).

Existen varias técnicas empleadas para imprimir objetos en tercera dimensión para producir alimentos, entre estas técnicas se encuentran la impresión basada en extrusión, impresión por Inyección de tinta, impresión por chorro aglutinante y la bioimpresión, en la *Tabla 2* se pueden observar las características de cada técnica, para este trabajo la técnica de interés es la impresión basada en extrusión.

Tabla 2. Técnicas de impresión en 3D de alimentos (traducido de Singhal et al., 2020).

Técnica	Características	Productos
Impresión basada en extrusión	El material alimenticio se carga en la jeringa, posteriormente se expulsa de manera controlada, la corriente que contiene el material se mueve a un camino predefinido y finalmente las capas depositadas forman una estructura sólida coherente.	Chocolates, pizzas, galletas, pastas, alimentos en gel.
Impresión por inyección de tinta	El cabezal de inyección tipo jeringa gotea una corriente de material alimenticio, las gotas se depositan por acción de la gravedad forman una imagen digital bidimensional y media (entre 2D y 3D).	relleno superficial o como decoración en galletas, bases de pizzas, pasteles y cupcakes.
Impresión por chorro aglutinante	El material en polvo se distribuye de manera uniforme, se le rocía una corriente de agua nebulizada para minimizar la rotura causada por el dispensador aglutinante, con ayuda del aglutinante líquido se unen dos o más capas entre sí.	Pasteles.

Bioimpresión Se lleva a cabo una deposición precisa Tejidos, por capa por capa de cultivos y materiales ejemplo, tejido de biológicos de células vivas, principalmente cerdo comestible. se usa la impresión por inyección de tinta, asistida por láser y microextrusión.

2.5.1. Impresión 3D basada en extrusión.

La extrusión es la acción para forzar materiales líquidos, semisólidos o sólidos a través de la abertura de una matriz para crear objetos con las secciones transversales deseadas, esta tecnología, por su naturaleza eficiente y continua, puede transformar la materia prima en productos finales (Sun *et al.*, 2018).

La impresión basada en extrusión es una técnica de impresión en 3D que puede emplearse en la producción de alimentos, donde existe una etapa de operación de proceso de construcción robótica controlada digitalmente. El material alimenticio se carga en una jeringa, después se expulsa por una boquilla de manera controlada en direcciones predefinidas colocando una capa de material sobre otra, finalmente se obtiene el producto deseado (Singhal *et al.*, 2020).

La impresión basada en extrusión es la técnica más popular en la impresión de alimentos 3D, proporciona una solución de ingeniería para el diseño digitalizado de alimentos y el control de la nutrición (Sun *et al.*, 2018).

Las impresoras de alimentos basadas en extrusión constan de una plataforma de varios ejes y una o más unidades de extrusión, tienen un tamaño compacto y un bajo costo de mantenimiento, sin embargo, son criticadas debido a sus limitadas opciones de materiales y su largo tiempo de fabricación. Los componentes de estas máquinas se fabrican con materiales inocuos para evitar la contaminación de los alimentos y se consideran seguros cuando están en contacto con estos (Sun *et al.*, 2018).

Actualmente existen impresoras 3D comerciales basadas en extrusión para la impresión de alimentos, entre ellas se encuentran: Foodini, ByFlow y Procusini 3.0, todas ellas capaces de imprimir alimentos salados y dulces; también se encuentran

Choc Creator V2.0 Plus y BeeHex Robot, la primera es usada para imprimir chocolates y la segunda usada para imprimir pizzas (Pérez *et al.*, 2021). Estas impresoras suelen ofrecer un buen rendimiento de extrusión, pero son muy caras, por ejemplo, Choc Creator II a precio de descuento es de unos 3,800 dólares estadounidenses (aproximadamente 76,000 pesos mexicanos) y el precio minorista de Foodini ronda los 1,000 dólares (aproximadamente 20,000 pesos mexicanos) (Sun *et al.*, 2018).

Existen tres mecanismos de extrusión que se pueden emplear para extruir materiales alimenticios: extrusión a base de jeringa, extrusión a base de tornillo y extrusión impulsada por aire, en la *Tabla 3* se explican a detalle cada uno de los mecanismos, mientras que en la *Ilustración 7* se muestran los esquemas de los equipos para cada mecanismo de extrusión.

Tabla 3. Mecanismo de extrusión para la impresión de alimentos en 3D (traducido de Singhal et al., 2020).

Mecanismo de extrusión	Características y operaciones	Materiales alimentarios que se pueden imprimir
A base de jeringa	Se utiliza un motor paso a paso diseñado de tal manera que controla el movimiento y la ubicación del embolo de la jeringa, y empuja el material alimenticio hacia afuera de la boquilla. La velocidad de extrusión se controla ajustando la velocidad del motor, para los productos de alta viscosidad se requiere mayor velocidad de extrusión. La única preocupación de utilizar este mecanismo es el gasto de energía adicional que aumentaría debido a la fuerza de fricción durante la sobrecarga.	Materiales sólidos y semisólidos.

A base de tornillo	El material alimenticio se carga en un cartucho que es ancho desde la parte superior (para facilitar la carga del material), pero se estrecha desde la parte inferior. Utiliza un motor accionado por tornillo, el material alimenticio se empuja continuamente hacia abajo a través de una boquilla de extrusión. El empuje conduce a la formación de burbujas mínimas. El tornillo y el cartucho debe ser de acero inoxidable porque se encuentran en contacto con el material alimenticio, se deben esterilizar en autoclave.	Materiales sólidos y semisólidos.
Impulsada por aire	Utiliza un cartucho encapsulado y una bomba neumática para generar la presión de aire, esta presión ayuda a extruir el material alimenticio de la boquilla, permite usar más de un cabezal de extrusión con diferentes velocidades de extrusión al mismo tiempo mediante válvulas reguladoras, sin embargo, al cambiar la velocidad de extrusión, cambia el tiempo de respuesta. Utiliza un sistema de filtración para esterilizar el aire presente en la bomba neumática	Materiales líquidos. Los materiales sólidos y semisólidos pueden depositarse en el lado interno del cartucho, lo que conduce al bloqueo de este.

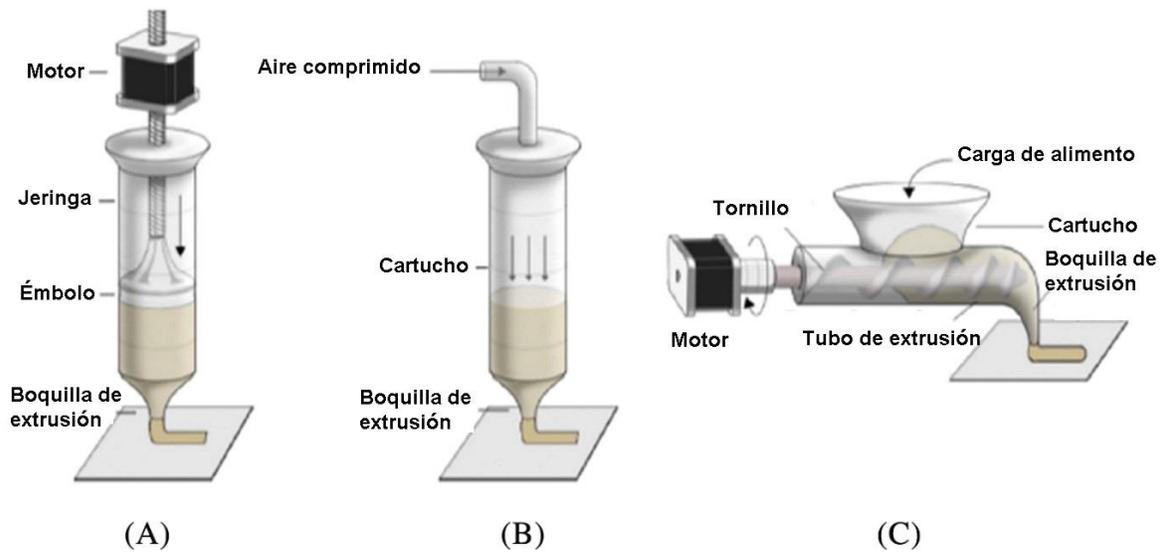


Ilustración 7. Esquemas de los equipos para cada mecanismo de extrusión. (A) extrusión a base de jeringa, (B) extrusión impulsada por aire, (C) extrusión a base de tornillo (traducido de Sun et al., 2018).

2.5.1.1. Materiales y capacidad de impresión.

La formulación de materiales imprimibles para impresión 3D es un gran desafío, debido a la fluidez deseable a través de la boquilla, la estabilidad o capacidad de impresión y la retención de la estructura del producto después de la impresión (Hussain *et al.*, 2021).

La capacidad de impresión se relaciona con la capacidad de realizar un objeto 3D mediante la deposición capa por capa de un material y que este pueda soportar su estructura una vez impreso, de esta manera, la imprimibilidad está determinada por las propiedades fisicoquímicas y reológicas de un material. Cuantificar la capacidad de impresión es una tarea compleja, pero el conocimiento sobre las propiedades reológicas de la formulación y la optimización de los parámetros de impresión son los factores clave para la creación de objetos 3D (Pérez *et al.*, 2021).

Hasta la fecha se han logrado imprimir productos sin necesidad de agregar aditivos, entre estos: Pizza, masa para galletas y chocolate, sin embargo, muchos materiales no tienen las propiedades adecuadas para imprimirse sin ser procesados previamente (Pérez *et al.*, 2021). Para mejorar la capacidad de impresión en materiales que no son adecuados para imprimir, es necesario agregar diferentes

aditivos como goma de xantana, caseinato de sodio, metilcelulosa, κ -carragenina, goma guar, transglutaminasa, etc. (Hussain *et al.*, 2021).

Para poder obtener un objeto 3D mediante impresión basada en extrusión, los materiales deben ser pseudoplásticos con un comportamiento de adelgazamiento por cizallamiento adecuado, de tal manera que puedan extruirse por las boquillas de la impresora bajo una fuerza de cizallamiento apropiada y pueda solidificarse por la recuperación estructural rápida después de la impresión (Jiang *et al.*, 2019), se puede decir que estos materiales tienen un índice de comportamiento de flujo bajo (n), lo que significa que al aplicarle un esfuerzo de cizallamiento creciente, la viscosidad disminuye, por lo tanto, fluyen con mayor facilidad al momento de imprimir. Por otra parte, los materiales con alta viscosidad y alto índice de consistencia no se extruyen con facilidad por la boquilla, a menos que presenten un comportamiento de flujo bajo (Pérez *et al.*, 2021).

La tangente de pérdida mecánica dinámica ($\text{Tan } (\delta) = G'' / G'$) puede ayudar a determinar si un material presenta un comportamiento viscoso o elástico, de esta manera determinar si un material es apto para ser impreso. El módulo de almacenamiento (G') define el comportamiento del sólido elástico y refleja la resistencia mecánica, mientras que el módulo de pérdida (G'') es la respuesta viscosa. Los valores de $\text{Tan } (\delta)$ menores que 1 significan que el comportamiento del material es predominantemente elástico, por otro lado, valores mayores a 1 significan que el comportamiento del material es predominantemente viscoso, por lo tanto, si G'' es más grande que G' , el material saldrá con facilidad por la boquilla de impresión, también se puede decir que valores más altos de $\text{Tan } (\delta)$ indican un comportamiento más fluido del material, contrariamente, valores bajos indican un comportamiento más sólido con poca fluidez (Pérez *et al.*, 2021).

El límite elástico es el límite donde debajo de este, los materiales se comportan totalmente elásticos, es decir, recuperan su estructura por completo cuando se les deja de aplicar fuerza de cizallamiento, dicho límite en conjunto del módulo de almacenamiento, pueden utilizarse para predecir la capacidad de un material impreso para conservar su forma a lo largo del tiempo y lograr una buena resolución

después de la impresión (Pérez *et al.*, 2021). Los materiales con un límite elástico más alto que el esfuerzo de flujo y un módulo de almacenamiento más grande que el módulo de pérdida, son útiles para la retención de la forma del producto después de la impresión (Hussain *et al.*, 2021).

Los parámetros de impresión influyen en la precisión y, por lo tanto, en la impresión del producto final. La temperatura del cartucho y la boquilla pueden afectar la fluidez de la formulación, pues un aumento de la temperatura disminuye la viscosidad de la formulación, mientras que la boquilla (diámetro, altura y velocidad de movimiento) puede afectar la estructura del producto final después de la deposición. La velocidad de extrusión es un factor que debe optimizarse para obtener una buena precisión de impresión, pues velocidades muy altas o bajas, pueden conducir a estructuras impresas deficientes (Pérez *et al.*, 2021).

2.5.1.2. Texturización de las proteínas en impresoras 3D mediante impresión basada en extrusión.

A excepción de algunas proteínas similares a las gomas (como, por ejemplo, la gelatina), la mayoría de las proteínas no se pueden utilizar directamente como materia prima de impresión 3D (Jiang *et al.*, 2019).

El punto isoeléctrico es cuando hay la misma cantidad de cargas negativas y de cargas positivas en una proteína, en este punto las proteínas pueden mostrar agregación, lo que esta precipitación isoeléctrica resulta muy atractiva para la impresión en 3D para la formación de hidrogel y gelatinización (Jiang *et al.*, 2019).

La desnaturalización de las proteínas bajo estrés físico (térmico o mecánico) o por compuestos ácidos o básicos, es una buena forma de preparar materia prima adaptada a la impresión 3D (Jiang *et al.*, 2019).

Para mejorar la capacidad de impresión de las proteínas, los métodos más usados en la industria de alimentos son la reticulación ionotrópica y la formación de coacervados, podría utilizarse el método de reticulación química, sin embargo, muchos de los reactivos utilizados en este método son metales pesados, los cuales resultan no aptos para el consumo humano. La reticulación ionotrópica y la

formación de coacervados aseguran que las proteínas formen estructuras similares a un gel y mejoran su estabilidad (Jiang *et al.*, 2019).

La repulsión mutua en las cargas de las proteínas extiende las moléculas y mejora la viscosidad del sistema, mientras que la velocidad de cizallamiento aumenta el flujo de las proteínas debido a que disminuye la viscosidad, por lo que se facilita su impresión y, una vez impresas, recuperan su estructura por completo al eliminar la tensión, siempre y cuando no se rebase el límite elástico. En condiciones extremas de velocidad de cizallamiento se reduce de manera irreversible la viscosidad, pues se rebasa el límite elástico, la estructura interna no puede soportar toda la presión y almacenar toda la energía, entonces la estructura del material se rompe y fluye. (Jiang *et al.*, 2019; Pérez *et al.*, 2021).

2.5.1.2.1. Productos impresos en 3D formulados con proteínas.

Se han impreso objetos usando proteínas de origen animal como materia prima, entre estos se encuentra un gel de surimi, donde se usó cloruro de sodio como aditivo, el cual mejora la reología, la fuerza del gel y la capacidad de retención de agua del producto; otro producto fue un snack con proteínas de harina de gusano; también se ha logrado imprimir un objeto con pasta de carne de pavo, donde la enzima transglutaminasa, usada como aditivo, promueve la reticulación de las proteínas, creando hidrogeles con estructuras estables (Pérez *et al.*, 2021).

Por otra parte, las proteínas de origen vegetal están cobrando gran importancia en las formulaciones de productos impresos en 3D, un ejemplo de ello son las formulaciones enriquecidas con proteínas evaluadas por Hussain *et al.* (2021), donde usaron aislado de proteínas de chícharo al 10% para la impresión de galletas. En este tipo de productos, es importante optimizar la proporción de los diferentes componentes y aditivos para obtener un material con buenas propiedades reológicas y de textura, de esta manera conseguir que el material pueda extruirse a través de la boquilla de la impresora, así también, obtener un material con estructura estable y coherente después de la impresión, también se deben de tener en cuenta que los parámetros de impresión como el diámetro, la altura crítica y la velocidad de la boquilla son factores que determinan los rendimientos de impresión, exactitud,

uniformidad y estabilidad del producto impreso. Hussain *et al.* (2021) variaron la proporción de harina, agua y mantequilla, donde la formulación con mejores resultados fue aquella con proporción de harina, agua y mantequilla: 30:30:15 respectivamente, con parámetros fijos de impresión con un diámetro de la boquilla de 2 mm, una altura crítica de 2 mm y una velocidad de 1 mm/s.

Hablando de las fuentes alternativas de proteínas, los residuos agrícolas y su gran potencial pueden significar oportunidades importantes para desarrollar productos de valor agregado elaborados con proteínas obtenidas a partir de estos, Jagadiswaran *et al.* (2021) desarrollaron un producto utilizando residuos agrícolas, el producto fue una galleta impresa en 3D formulada con trigo partido y orujo de uva, los residuos agrícolas le dieron buenas propiedades nutricionales, se obtuvo una galleta rica en proteína, fibra y antioxidantes.

La recuperación, reciclaje y reacondicionamiento de los residuos agrícolas para la obtención de productos impresos en 3D con valor agregado son excelentes opciones sustentables y sostenibles que benefician al medio ambiente usando residuos como materias primas, benefician al consumidor por sus propiedades nutricionales y/o funcionales, aparte de tener estructuras personalizadas y atractivas; incluso pueden contribuir a cubrir la preocupante demanda mundial creciente de proteínas.

3. Materiales y equipos.

3.1. Materia prima.

El BSG fue proporcionado por el QFB Agustín Reyo Herrera, responsable de la planta piloto de cerveza ubicada en el edificio A en el Laboratorio de Ingeniería Química de la Facultad de Química de la UNAM donada en el año 2009 por Grupo Modelo.

3.2. Reactivos.

Los diferentes reactivos químicos fueron adquiridos de distintas marcas como se muestra a continuación:

Bio-Rad: Reactivo de Bradford.

Droguería Cosmopolita: Glucosa, alginato de sodio, almidón de maíz.

Farmacia París: Hidróxido de sodio.

J.T. Baker: Éter etílico, fosfato disódico, borato de sodio.

Reactivos Meyer: Éter etílico, ácido sulfúrico.

Sigma-Aldrich: Ácido clorhídrico, albúmina sérica bovina, ácido acético, lauril sulfato de sodio, etilendiaminatetraacetato de sodio, etilcelulosa, bromuro de cetiltrimetilamonio, permanganato de potasio.

Otra marca: Fenol.

3.3. Equipos.

Los equipos de diferentes marcas utilizados para llevar a cabo las diferentes metodologías se mencionan a continuación:

Agitador vórtex: Heathrow Scientific Vortexer.

Balanza Analítica: Ohaus Adventurer Pro.

Baño de ultrasonido: Digital Ultrasonic Cleaner PS-10A.

Bomba peristáltica: Cole-Parmer Master Flex Easy-Load 3.

Centrífuga industrial: Westfalia Separator LWA 205.

Centrífuga: Labtek Centrifuge XC-2000.

Centrífuga: Zenithlab 800D Centrifuge.

Espectrofotómetro UV-Vis: Cole-Parmer Unico Spectrophotometer.

Espectrofotómetro UV-Vis: Perkin Elmer Spectrometer Lambda 2S.

Extrusor de doble tornillo: Cleextral Evolum 25.

Horno de convección forzada: Lindberg/Blue Mechanical Oven.

Impresora 3D: Anet ET5 Pro 3D Printer

Impresora 3D: MONOPRICE Select Mini 3D Printer V2

Mantillas de calentamiento: NanBei ZNHW HEATER

Molino para café: Krups Type F408.

Motores: DIAB 0520-S.

Mufla: Termolyne 1500 furnace

Parrilla de calentamiento y agitación magnética: Thermoscientific Cimarec.

Termobalanza: AND MF-50

Viscosímetro: Brookfield Model DV-II + Viscometer.

4. Desarrollo experimental.



Foto 1. BSG

4.1. Acondicionamiento y análisis de la materia prima.

Una vez recibido el BSG, se sometió a un proceso de secado en un horno de convección forzada a 60°C. Una vez seco se almacenó en una bodega a temperatura ambiente hasta su posterior análisis y uso (*Foto1*).

4.1.2. Análisis Químico Proximal (AQP).

El AQP se llevó a cabo utilizando diversas metodologías para la determinación de la cantidad en porcentaje de humedad, cenizas, grasa, proteínas, carbohidratos totales y fibra, presentes en el BSG.

4.1.2.1. Análisis de humedad.

La humedad del BSG fue determinada por el método de secado en termobalanza. En este método la muestra se calienta en condiciones controladas de temperatura, el equipo mide de manera automática la pérdida de peso por evaporación del agua y registra el porcentaje de humedad en la muestra (Nielsen, 2017).

Alrededor de 5 g de muestra, por cuatuplicado, se pesaron en una charola de aluminio colocada dentro de la termobalanza, una vez pesadas se accionó el equipo para llevar a cabo la determinación. El equipo indicó con un sonido el final de la determinación, mostrando en la pantalla el registró del porcentaje de humedad final de cada muestra (*Foto 2*).



Foto 2. Termobalanza para determinación de humedad.

4.1.2.2. Análisis de cenizas.



Foto 3. Precalcinación de la muestra.

El contenido de cenizas en el BSG se determinó de manera similar al método de incineración seca explicado por Nielsen (2017). Las cenizas son los residuos inorgánicos que quedan después de la ignición o la oxidación completa de la materia orgánica en una muestra, su determinación puede llevarse de manera húmeda oxidando la materia orgánica con ácidos y/o agentes oxidantes, o bien, se puede determinar el contenido de cenizas por incineración seca, para este método la muestra se calcina a temperaturas elevadas (500-600°C), el agua y los volátiles se evaporan, mientras que la

materia orgánica se quema en presencia de oxígeno convirtiéndose en CO₂ y óxidos de N₂.

Para esta determinación se pesaron alrededor de 2 g de muestra por triplicado, una vez pesadas se colocaron en crisoles previamente secados y pesados. Los crisoles con la muestra se sometieron a una precalcinación en una parrilla hasta que dejaron de emitir humo (*Foto 3*), posteriormente se metieron a una mufla donde se incineraron a 550°C por 5 h. Al finalizar el procedimiento se obtuvieron cenizas grises, las cuales fueron pesadas junto con sus respectivos crisoles para calcular el porcentaje de cenizas en el BSG.

4.1.2.3. Análisis de grasa.

El contenido de grasa se determinó por el método de Soxhlet de manera similar al descrito por James (1999). En el método de Soxhlet la grasa se extrae de manera semicontinua con un disolvente orgánico. El disolvente se calienta y se volatiliza, posteriormente se condensa goteando sobre la muestra, la muestra se empapa y, de esta forma, el disolvente extrae la grasa. A intervalos de 15-20 minutos, el disolvente se sifona al matraz calefactor para iniciar un proceso nuevo (Nielsen, 2017).

Para esta determinación se pesaron cerca de 4 g de muestra por triplicado, las muestras se colocaron en paquetes de celulosa, estos paquetes fueron colocados dentro de aparatos de extracción Soxhlet. En matraces de bola de fondo plano previamente secados y pesados, se colocaron alrededor de 200 mL de éter etílico. Los matraces se conectaron al aparato de extracción Soxhlet, los aparatos de extracción Soxhlet se conectaron a condensadores. Posteriormente comenzó el calentamiento a ebullición suave con una parrilla para volatilizar el disolvente y extraer la grasa. Cada que hizo falta, se agregaron cargas de alrededor de 100 mL de éter etílico para continuar el proceso de extracción. Una vez extraída la grasa, se quitó el cartucho con la muestra desengrasada, se recuperó el disolvente que quedó en el aparato de extracción, mientras que el disolvente remanente en los matraces se dejó evaporar a temperatura ambiente en una campana de extracción. Los matraces con grasa se secaron y posteriormente fueron pesados para poder calcular el contenido de grasa en el BSG (*Foto 4*).



Foto 4. Equipo de extracción de grasa.

4.1.2.4. Análisis de proteína.

La proteína presente en BSG fue cuantificada empleando el método de Bradford (1976). En este método, el colorante Coomassie® Brilliant Blue G-250 contenido en una solución ácida (reactivo de Bradford) se une a residuos de aminoácidos, principalmente aromáticos y básicos, en especial a arginina, provocando un cambio de color de la solución a diversas concentraciones de proteína debido a que el colorante cambia su máximo de absorbancia de 465 nm a 595 nm cuando se une a los aminoácidos.

Para esta determinación se preparó una curva patrón en concentraciones de 0 a 0.9 mg/mL, partiendo de una solución patrón de albúmina sérica bovina (BSA por sus

siglas en inglés). La *tabla 4* muestra la información de la preparación de las soluciones stock para la elaboración de la curva patrón.

Tabla 4. Datos de preparación de las soluciones stock para la elaboración de la curva patrón de proteínas.

Concentración de Stock (mg/mL)	Volumen de disolución patrón de BSA (1 mg/mL) (mL)	Volumen de agua destilada (mL)	Volumen de aforo (mL)
0	0	10	10
0.2	2	8	10
0.35	3.5	6.5	10
0.5	5	5	10
0.75	7.5	2.5	10
0.9	9	1	10



Foto 5. Curva patrón del método de Bradford.

El reactivo de Bradford se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se agregaron 5 mL de reactivo a 100 μ L de cada solución stock y muestra, después se agitaron en un agitador vórtex y se incubaron por 5 min. a temperatura ambiente. Finalmente se llevó a cabo la lectura de las absorbancias a 595 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (*Foto 5*).

Para cuantificar las proteínas presentes en BSG, este se sometió a un procedimiento de hidrólisis alcalina similar al reportado por Riaño *et al.* (2021), colocando 7.5323 g de BSG en 150 mL de NaOH 0.1 M (relación sólido-líquido del 5%) a 50°C, 4 h, con agitación.

Posteriormente se llevó a cabo una filtración, el extracto se neutralizó con HCl 1 M obteniéndose un extracto total de 210 mL. Por último, los sólidos en suspensión remanentes se separaron por centrifugación a 4000 rpm, 4 min. El extracto se diluyó tomando 1 mL y añadiendo 4 mL de agua para poder realizar la lectura en el espectrofotómetro.

4.1.2.5. Análisis de carbohidratos.

Se determinó la cantidad de carbohidratos totales presentes en el BSG por el método de fenol-sulfúrico, también se determinó la cantidad de fibra presente en la muestra, pues la fibra representa la mayoría de los carbohidratos presentes en el BSG. Incluso con los datos obtenidos se estimó la cantidad de carbohidratos solubles.

4.1.2.5.1. Análisis de carbohidratos totales.

Los carbohidratos totales fueron determinados de acuerdo con el método fenol-sulfúrico descrito por Nielsen (2017). Este método colorimétrico determina toda clase de carbohidratos, incluidos mono, di, oligo y polisacáridos. El ácido sulfúrico concentrado descompone los polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos a monosacáridos, posteriormente las pentosas se deshidratan a furfural y las hexosas a HMF. Los compuestos de deshidratación de los monosacáridos reaccionan con el fenol para producir compuestos color amarillo-dorado que absorben de 480-490 nm.

Para esta determinación se preparó una curva patrón en concentraciones de 0 a 100 partes por millón (ppm, $\mu\text{g/mL}$ o mg/L) partiendo de una solución patrón de glucosa 100 ppm. La *tabla 5* muestra la información de la preparación de las soluciones stock para la elaboración de la curva patrón.

Tabla 5. Datos de preparación de las soluciones stock para la elaboración de la curva patrón de carbohidratos.

Concentración de Stock (ppm)	Volumen de disolución patrón de glucosa	Volumen de agua destilada (mL)	Volumen de aforo (mL)
-------------------------------------	--	---------------------------------------	------------------------------

	(100 ppm) (mL)		
0	0	2	2
20	0.4	1.6	2
40	0.8	1.2	2
60	1.2	0.8	2
70	1.4	0.6	2
80	1.6	0.4	2
100	2	0	2

A cada solución y muestra, se les agregó 50 μL de una solución de fenol al 80%, se agitaron en un agitador vórtex, posteriormente se les agregó 5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, cuando disminuyó la temperatura de los tubos de ensayo, se agitaron nuevamente en el agitador vórtex para dejar reaccionar al fenol con los compuestos de deshidratación de los monosacáridos por 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción, los tubos se agitaron por última vez en vórtex y se realizó la lectura de la absorbancia de cada tubo a 490 nm (*Foto 6*).

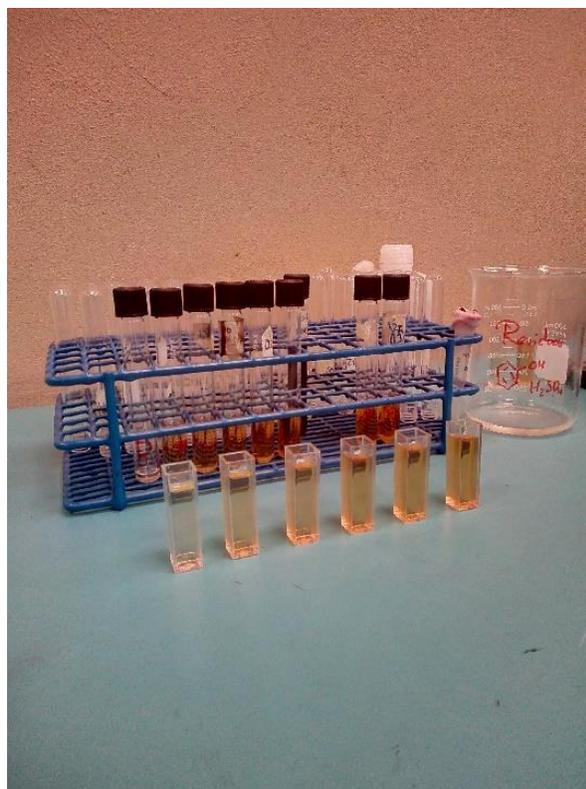


Foto 6. Curva patrón del método fenol-sulfúrico.

La muestra empleada para la determinación de los carbohidratos totales fue aquel extracto preparado para la determinación de proteínas (sección 4.1.2.4.). Se tomó 1 mL de extracto y se aforó a 100 mL de agua. De la dilución, se tomaron 2 mL para llevar a cabo la reacción y lectura de las absorbancias.

4.1.2.5.2. Análisis de fibra.

El análisis de fibra se llevó a cabo empleando la modificación del método de Van Soest-Wine descrito por Pimentel (2013). Este método consiste en separar para poder cuantificar las diferentes fracciones de la fibra vegetal: celulosa, hemicelulosa y lignina, esto se consigue aplicando un detergente neutro para retirar los sólidos solubles y obtener el residuo sólido correspondiente a la fibra total (NDF), un detergente ácido para separar la hemicelulosa (ADF), un agente oxidante (KMnO_4) para remover la lignina y finalmente el material resultante se incinera para poder eliminar la celulosa.

La determinación de fibra se llevó a cabo por duplicado, primeramente, se pesaron alrededor de 0.5 g de BSG, se colocaron en matraces de bola con 50 mL de la solución NDF (relación sólido-líquido 1:100) y fueron sometidos a ebullición por 1 h. Transcurrido el tiempo mencionado, se filtraron las muestras en crisoles porosos previamente secados y pesados, los residuos sólidos se lavaron con agua destilada

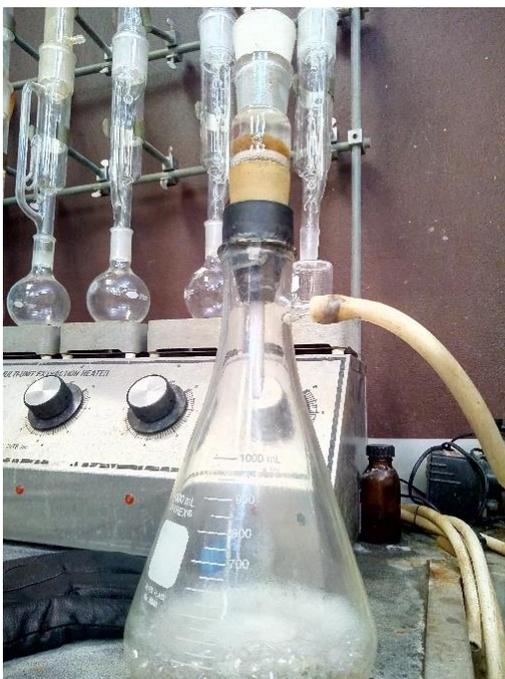


Foto 7. Sistema de filtración y lavado de los residuos sólidos.

hirviendo hasta que dejó de generarse espuma (*Foto 7*). Después del lavado, las muestras se secaron en un horno de convección forzada a 105°C , 1 h, posteriormente se pesaron los crisoles con sus respectivas muestras.

Para el lavado con la solución de ADF, se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el caso de la solución NDF.

En el caso de la oxidación, se agregaron volúmenes pequeños de KMnO_4 al 5%, dejando reaccionar las muestras por 90 min. Después de transcurridos los 90 minutos, se filtraron las muestras y se repitió el procedimiento de oxidación hasta que la

solución de KMnO_4 en cada crisol permaneció de color púrpura.

Para evitar la calcinación, se agregó una solución desmineralizante a cada muestra para retirar tanto los minerales remanentes de la muestra como los residuos del agente oxidante, de esta manera, el residuo sólido final fue la celulosa total, mientras que la materia perdida en los lavados fue la lignina.

En la *Ilustración 8*, se puede observar el esquema general del procedimiento.

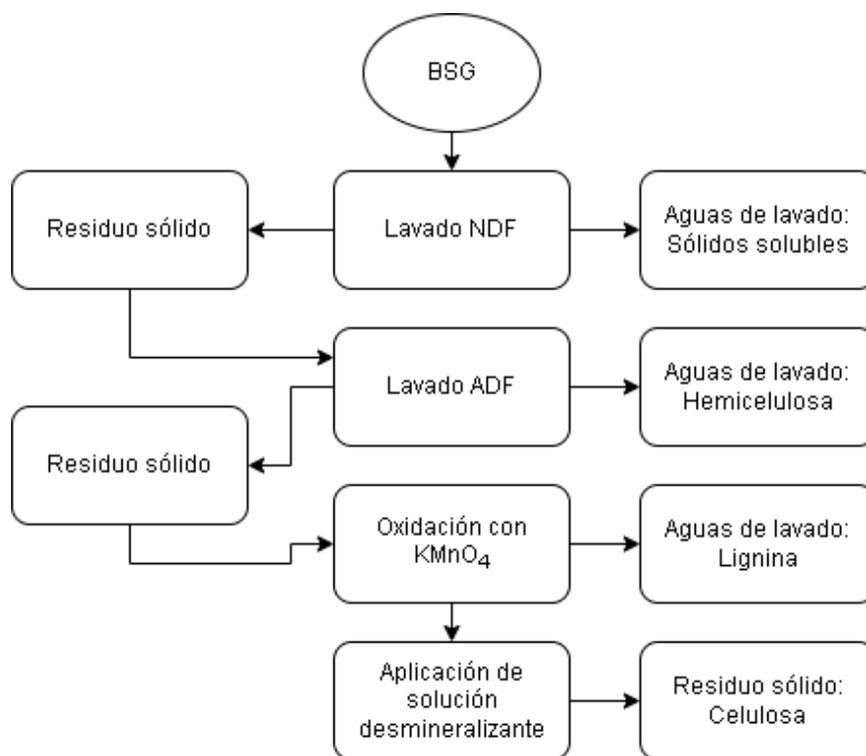


Ilustración 8. Esquema general para la determinación de fibra.

4.2. Elección del método adecuado para la extracción de proteínas.

Para elegir el método adecuado para una mejor extracción de proteínas del BSG, se compararon cuatro métodos de extracción: Tratamiento hidrotermal, tratamiento alcalino, extrusión de doble tornillo y tratamiento alcalino asistido por ultrasonido.

El método adecuado se seleccionó de acuerdo con la concentración (en porcentaje m/v) de proteínas obtenido después de la extracción, para ello, se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976) (ver sección 4.1.2.4.). Pevio a la determinación de proteínas, los extractos fueron clarificados por centrifugación a 4000 rpm, 4 min. (algunos extractos requirieron dilución para poder

obtener la concentración de proteínas). De cada extracto se tomaron tres muestras y se realizó la lectura de cada muestra por triplicado a 595 nm con la finalidad de calcular el porcentaje de proteínas extraídas del BSG a partir de la curva patrón obtenida en la determinación de proteínas en el AQP.

Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA por sus siglas en inglés) y una comparación de medias por el método de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD por sus siglas en inglés), descritos por Montgomery (2004). Estos análisis estadísticos se realizaron con la finalidad de determinar si existe diferencia significativa entre muestras.

4.2.1. Tratamiento hidrotermal.

El tratamiento hidrotermal se llevó a cabo en condiciones similares a las descritas por Qin *et al.* (2018), la extracción de proteínas se realizó en agua con una relación m/v del 4%, agregando 4.1550 g de BSG en 100 mL de agua, el calentamiento se llevó a cabo en un baño de glicerina a 60°C con agitación por 24 h (*Foto 8*).

Posterior al tratamiento, se realizó el filtrado para retirar los sólidos. El filtrado líquido (100 mL) (correspondiente al extracto de proteínas), se almacenó en refrigeración para su posterior análisis (no requirió dilución).

4.2.2. Tratamiento alcalino.

El tratamiento alcalino fue el mismo que el empleado para la cuantificación de proteínas en el AQP del BSG (ver sección 4.1.2.4.), utilizando 7.5323 g de BSG y 150 mL de NaOH 0.1 M, obteniéndose un extracto neutralizado de 210 mL, el cual fue diluido en agua (1:10) para su posterior análisis.



Foto 8. Equipo de calentamiento (similar para tratamiento hidrotermal y tratamiento alcalino).

4.2.3. Extrusión de doble tornillo.



Foto 9. Extrusor de doble tornillo.

Para la extrusión de doble tornillo, se utilizó un extrusor de 10 módulos, la configuración puede observarse detalladamente en la *Ilustración 9*. El BSG (97.5534 g) se sometió a un tratamiento térmico-alcalino-mecánico con un tiempo de operación del equipo de 5 min, en el módulo 1 entró la solución alcalina de NaOH 0.4% a un flujo de 1.7 kg/h, en los módulos 2,3 y 4 se llevó a cabo la extracción alcalina, en el módulo 5 se llevó a cabo la neutralización con AcOH 0.15% a un flujo de 3.5 kg/h, en el módulo 6 se filtró todo el extracto de proteínas (314 mL) (el cual fue almacenado y diluido en agua (1:10) para su posterior análisis) (*Foto 9*).

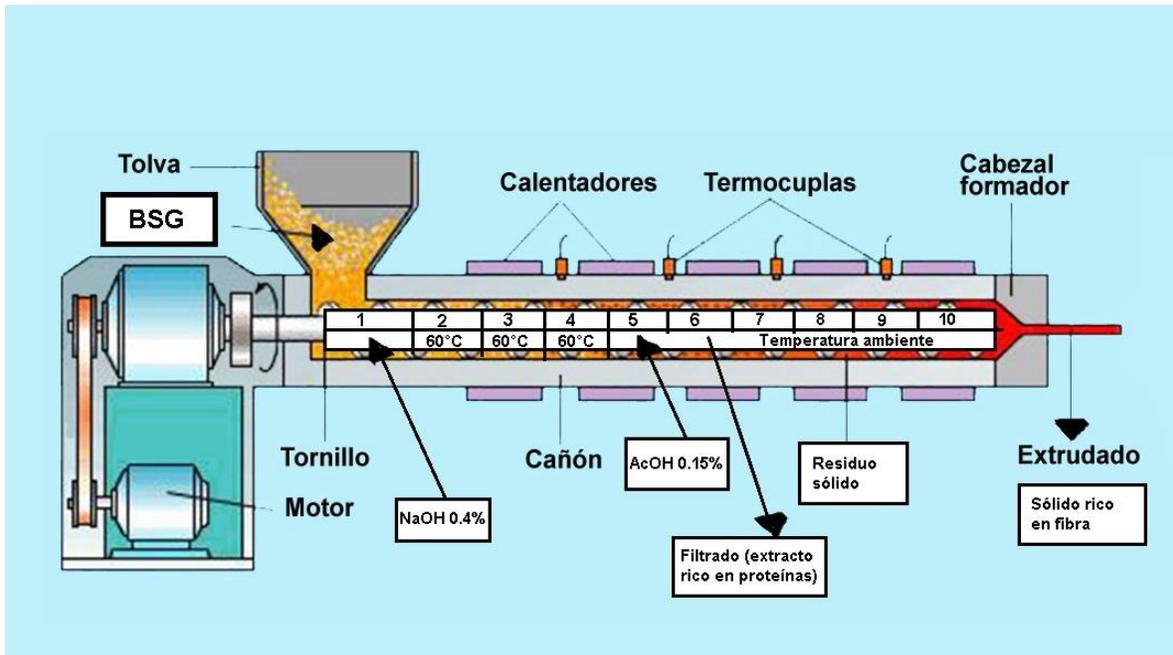


Ilustración 9. Configuración del extrusor de doble tornillo para la extracción de proteínas.

4.2.4. Tratamiento alcalino asistido por ultrasonido.

El tratamiento alcalino se llevó a cabo tomando como referencia al descrito por Li *et al.* (2021). El BSG y la solución alcalina de NaOH 0.1 M en relación sólido-líquido 1:15 (33.3336 g de BSG y 500 mL de NaOH 0.1 M) fueron colocados en una bolsa de plástico, la bolsa fue colocada en un baño de ultrasonido a una potencia de 60 W, una frecuencia de 40 kHz y con temperatura de 25 °C, por un tiempo de 20 min.

Li *et al.* (2021) sugieren que la extracción se lleve a cabo a una potencia de 250 W, una frecuencia de 20-25 kHz y un ciclo de trabajo del 60%, sin embargo, el equipo con el que se cuenta en el laboratorio no permite ajustar estos parámetros, por ello se utilizaron los parámetros predeterminados del equipo (Foto 10).



Foto 10. Baño de ultrasonido.

Del extracto alcalino obtenido (500mL), se tomaron 37 mL de extracto, los cuales se neutralizaron con AcOH al 1.15%, obteniéndose un extracto neutro de 39 mL, el cual fue diluido en agua (1:10) para su posterior análisis.

4.3. Producción de proteínas.

Para comenzar a producir el aislado de proteínas del BSG, primeramente, se llevó a cabo una prueba a pequeña escala para verificar si el rendimiento y la pureza de las proteínas son lo suficientemente buenos para después llevar la prueba a una mayor escala con la finalidad de obtener un aislado de proteínas que pueda añadirse a las formulaciones para imprimir un alimento en 3D rico en proteínas.

4.3.1. Producción a pequeña escala.

Como en los ensayos de extracción de proteínas el método adecuado resultó ser la extracción alcalina, la producción de proteínas se llevó a cabo utilizando este método.



Foto 11. Equipo para hidrólisis alcalina.

Para la primera prueba se utilizaron 3 L de NaOH 0.1 M, siendo la relación sólido-líquido del 5%, se usaron 149.6594 g de BSG. La hidrólisis se llevó a cabo en un matraz bola de 5 L dentro de una mantilla de calentamiento a 50°C, por 4 horas con agitación (*Foto 11*). Después de la hidrólisis, se procedió a filtrar el extracto de proteínas en tela para separarlo de los residuos ricos en fibra. El extracto rico en proteínas se llevó a pH ácido (pH 4) con la finalidad de llevar a las proteínas al punto isoelectrico y precipitarlas, tal y como lo mencionan Celus *et al.* (2007), sin embargo, se utilizó ácido acético 0.2 M en lugar de ácido cítrico 2 M. Una vez precipitada la proteína, se drenó la gran parte del sobrenadante con una bomba peristáltica (*Foto 12*), el resto de sobrenadante con las proteínas precipitadas, se separaron mediante una pequeña centrífuga a 4000 rpm, 4 min. Por último, el aislado de proteínas restante fue secado a temperatura ambiente en un horno de convección forzada.

A los residuos ricos en fibra se les realizó una cuantificación de fibra NDF (ver sección 4.1.2.5.2.), el resultado se corrigió con la determinación de minerales. Al aislado de proteínas se le realizó una cuantificación del porcentaje de proteínas mediante el método de Bradford con la finalidad de obtener la pureza del aislado (ver sección 4.1.2.4.), al sobrenadante descartado, también se le determinó el porcentaje de proteínas con la finalidad de saber la cantidad de proteínas que quedaron remanentes. Finalmente, se envió una muestra del aislado de proteínas a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAII),



Foto 12. Precipitado de proteínas y drenado de sobrenadante.

donde se le realizó un análisis de Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) por Reflectancia Total Atenuada (ATR). Este método funciona midiendo los cambios que ocurren en un haz IR al incidir con una muestra, el haz se dirige a un espejo de alta refracción, la reflectancia interna crea una onda que se atenúa en las zonas del IR donde la muestra absorbe energía, el haz atenuado en el detector se registra como una señal de interferograma que posteriormente genera el espectro de IR (Thermofisher). El análisis de IR fue realizado por la Q. Marisela Gutiérrez Franco, la apariencia de las vibraciones y absorciones de los enlaces de los grupos funcionales en el espectro de infrarrojo generado durante el análisis, se interpretaron con base en el portal web de Merck y Sigma-Aldrich.

4.3.2. Producción a mayor escala.



Foto 13. Centrífuga industrial.

La producción a mayor escala ahora se llevó a cabo en dos matraces bola de 6 L y uno de 5 L, cada uno con sus respectivas mantillas de calentamiento. La cantidad de NaOH 0.1 M empleada fue de 16 L para hidrolizar 802.1559 g de BSG.

El procedimiento fue similar a la producción a pequeña escala salvo que para esta producción no se llevó a cabo el drenado y la centrifugación con la centrífuga pequeña, en esta ocasión la

separación de las proteínas precipitadas del sobrenadante se llevó a cabo en una centrífuga industrial a 12 000 rpm (*Foto 13*).

Los análisis realizados al sólido rico en fibra, aislado de proteína y sobrenadante fueron los mismos que en la producción a pequeña escala.

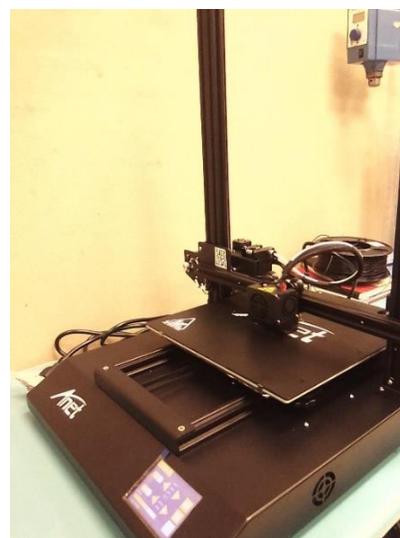


Foto 14. Anet ET5 Pro 3D Printer.

4.4. Impresión en 3D.

Ante la falta de impresoras 3D de alimentos en México, se obtuvo una impresora 3D convencional que emplea principalmente plásticos como ácido poliláctico (PLA por sus siglas en inglés) como material de impresión.

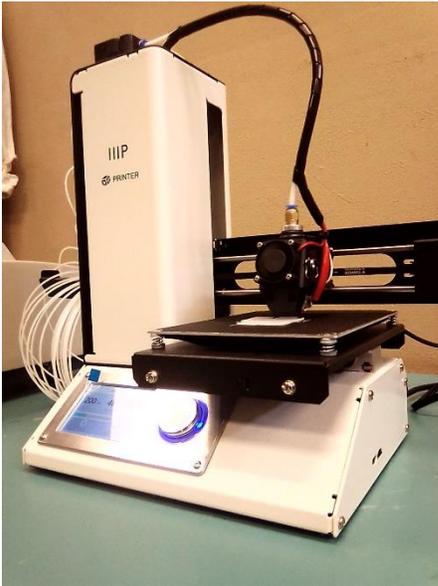


Foto 15. MONOPRICE Select Mini 3D Printer V2

Primeramente, se obtuvo una impresora Anet ET5 Pro 3D Printer (*Foto 14*), esta impresora fue elegida de acuerdo con sus especificaciones técnicas según el sitio web de Amazon en comparación con otros modelos, la comparación puede encontrarse en el *Anexo 4*, Tabla A4-1 sin embargo, funcionó una sola vez antes de que fallara un sensor en la boquilla de impresión impidiendo su correcto funcionamiento, es por ello que, con el reembolso, se obtuvo la impresora MONOPRICE Select Mini 3D Printer V2 (*Foto 15*), también se seleccionó acorde con la misma tabla comparativa. A esta última impresora se le

realizaron algunas modificaciones con la finalidad de imprimir formulaciones alimenticias elaboradas con el aislado de proteínas de BSG.

4.4.1. Elección de la formulación para impresión en 3D y propiedades reológicas.

Previo a la impresión, se determinó la viscosidad a diferentes velocidades de corte de tres formulaciones para observar el comportamiento reológico del material.

La primera formulación fue elegida para observar el comportamiento de la proteína sola en una suspensión a pH neutro; la segunda se eligió debido a que es una formulación de un alimento con propiedades adecuadas para la impresión en 3D según la literatura; mientras que la última es una formulación que podría ser la base para un alimento más elaborado, contiene almidón y alginato como aditivos para obtener un hidrogel autosuficiente que incorpore a las proteínas y mejore su reología para obtener un material adecuado para imprimir en 3D, tal como ocurrió con algunas formulaciones a base de proteínas mencionadas por Pérez *et al.* (2020).

Se empleó un viscosímetro rotacional digital (*Foto 16*) utilizando aproximadamente 60 mL de las siguientes formulaciones:

- Suspensión de aislado de proteínas de BSG al 10% (60.53% de pureza) a pH neutro (neutralizada con NaOH 0.1 M).
- Formulación de masa para galletas basada en la descrita por Hussain *et al.* (2020) que a su vez fue basada en la descrita por Lipton *et al.* (2010): 30% de harina de trigo refinada, 30 % de mantequilla, 15% de agua, 10% de aislado proteínas de BSG (60.53% de pureza), 14.6% de azúcar y 0.4% de goma de xantana. La determinación se llevó a cabo a 100°C.
- Formulación con 10% de aislado de proteínas de BSG (60.53% de pureza), 10% de almidón de maíz, 2% de alginato de sodio y 78 % agua.



Foto 16. Equipo para la determinación de la viscosidad.

4.4.2. Impresión de la formulación en 3D.

Para imprimir las formulaciones en 3D, el modelado se realizó en el programa CAD Repetier Host V2.2.4 desarrollado por Hot-World GmbH & Co. Mediante la carga de un archivo “.slt”, en este mismo programa, el diseño se puede modificar en dimensiones, se programan las condiciones de impresión (temperatura de la boquilla y cama de impresión, velocidad de impresión, cantidad de material, etc). Una vez que la información del diseño está lista, se transforma a un archivo de Código G “.gco”, el cual se carga en una memoria Micro SD que se inserta en la impresora 3D. Como se mencionó anteriormente, el Código G es aquel lenguaje de programación que, mediante códigos, indica a la impresora en qué dirección mover sus ejes para depositar las capas de material.

Una vez insertada la memoria Micro SD, se realizó el nivelado de la platina de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente, en el caso de la impresión de PLA, se llevó a cabo el precalentamiento de la boquilla y la cama de impresión a 200°C y 40°C respectivamente. La impresión de PLA se llevó a cabo para comprobar el correcto funcionamiento de la impresora 3D. Para esta prueba se usó una boquilla de 0.4 mm.

En el caso de la formulación elaborada con aislado de proteínas, debido a la viscosidad, se empleó una boquilla modificada de 2 mm, la impresión se llevó a cabo con la boquilla a temperatura ambiente, pues la formulación se inyectó fundida a través de una jeringa, la cama de impresión se llevó 40°C.

5. Resultados y análisis de resultados.

5.1. AQP

Los resultados de los diferentes análisis están reportados en porcentaje del BSG seco, estos pueden observarse en la *Tabla 6*.

La suma de todos los componentes presentes en el AQP es de 100% con 0.36% de sobreestimación, se cree que esta sobreestimación puede deberse al porcentaje de lignina, pues su porcentaje de coeficiente de variabilidad (%CV) es bastante grande junto con el %CV del porcentaje de la celulosa (*Tabla 14*), esto es indicio de que los resultados fueron bastante variables y poco confiables, sin embargo, el resultado de lignina puede ser el único que afecta en el resultado de la suma de todos los componentes en el AQP, pues la celulosa se considera dentro de los carbohidratos totales.

Tabla 6. Análisis Químico Proximal.

Componente	Porcentaje
Humedad *	7.21%
Cenizas	3.40%
Grasa	3.29%
Proteínas**	16.26%
Carbohidratos totales	64.68%
Carbohidratos solubles***	34.12%
Fibra (Celulosa y Hemicelulosa) ***	Celulosa: 4.74% Hemicelulosa: 25.82%
Fibra (Lignina)	12.73%
Total	100.36%

*El porcentaje de humedad no se considera dentro del total de componentes porque las determinaciones están reportadas en base seca.

**Se consideró el porcentaje de proteínas determinado al tratamiento alcalino en la comparación de los métodos de extracción, pues en la determinación de proteínas para el AQP, el porcentaje parece estar sobreestimado.

***El porcentaje de carbohidratos solubles, celulosa y hemicelulosa es considerado dentro del porcentaje de los carbohidratos totales para la suma del total.

5.1.1. Análisis de humedad.

Debido a que el BSG fue secado previo a su almacenamiento, los análisis realizados se llevaron a cabo con un BSG de baja humedad (7.21%), por lo que el método de secado en termobalanza fue adecuado para el análisis de humedad de la materia prima y, gracias a que el método es automático, los resultados obtenidos son bastante homogéneos según su bajo %CV. Los resultados pueden apreciarse mejor en la *Tabla 7*.

Tabla 7. Análisis de humedad.

Masa de la muestra (g)	% Humedad	
5.302	7.55	
5.382	7.15	
5.322	7.00	
5.558	7.15	
	7.21	Promedio
	0.24	Desv. Est
	3.27	%CV

5.1.2. Análisis de cenizas.

En el análisis de cenizas, los datos obtenidos se muestran homogéneos, no hay mucha variación entre ellos de acuerdo con su %CV, incluso la cantidad de cenizas que contiene el BSG (3.40%) es similar a la reportada por Qin *et al.* (2017) (3.57%) y muy cercana a las reportadas por Rommi *et al.* (2021) (4.00%) y He *et al.* (2021) (4.60%). Los resultados del porcentaje de cenizas obtenidos en el BSG se pueden observar a detalle en la *Tabla 8*, tales resultados fueron calculados empleando la *Ecuación 1* del Anexo 1.

Tabla 8. Análisis de cenizas.

Masa de la muestra (g)	Masa del crisol (g)	Masa crisol + cenizas (g)	% Cenizas
2.0204	20.8137	20.8840	3.48
2.0149	21.0904	21.1592	3.41
2.0084	21.2233	21.2899	3.32

3.40	Promedio
0.08	Desv. Est.
2.42	%CV

5.1.3. Análisis de grasa.

Los resultados del contenido de grasa en el BSG (*Tabla 9*) son bastante bajos (3.29%) en comparación por los reportados por Qin *et al.* (2018) (5.30%), He *et al.* (2021) (8.30%) y Rommi *et al.* (2021) (11.00%), este resultado puede atribuirse a la variabilidad del BSG, incluso los resultados entre investigadores no son similares, pues la composición depende de la materia prima, coadyuvantes y el proceso de producción de cerveza (Qin *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2021). Los resultados se calcularon con la *Ecuación 2* del *Anexo 1*.

Tabla 9. Análisis de grasa.

Masa de la muestra (g)	Masa del matraz (g)	Masa matraz + grasa (g)	% Grasa	
4.0620	114.4793	114.6133	3.30	
4.5232	108.2319	108.3800	3.27	
4.2805	119.2497	119.4517	4.72*	
			3.29	Promedio
			0.02	Desv. Est.
			0.53	%CV

* Este dato fue omitido debido a que se desvía bastante de los otros valores.

5.1.4. Análisis de proteínas.

El contenido de proteínas fue obtenido mediante la extrapolación de la absorbancia de la muestra tratada con el reactivo de Bradford a 595 nm con la curva patrón elaborada a partir de soluciones stock de BSA y posteriormente se elaboraron los cálculos descritos en el *Anexo 1*.

En la curva patrón se correlacionan los valores de absorbancia a 595 nm y concentración de proteínas (*Gráfico 1*), los datos de la curva y de la muestra se observan en la *Tabla 10*. Cabe mencionar que la curva patrón presenta un coeficiente de correlación (R^2) no tan alejado a 1, lo que significa que hay una buena correlación entra absorbancia y la concentración.

Tabla 10. Absorbancias de las soluciones stock, de la muestra y porcentaje de proteínas en BSG.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia a 595 nm	Prom Abs	Desv. Est	%CV Abs	
0.00	0.0000	0.0000	0.0000	0.00	
0.20	0.0207	0.0204	0.0002	1.03	
0.35	0.0360	0.0420	0.0042	10.88	
0.50	0.0669	0.0815	0.0103	13.91	
0.75	0.1220	0.1257	0.0026	2.11	
0.90	0.1289	0.1322	0.0023	1.79	
Muestra	0.2912	0.2931	0.2922	0.0013	0.46
% Proteínas en BSG	26.23				

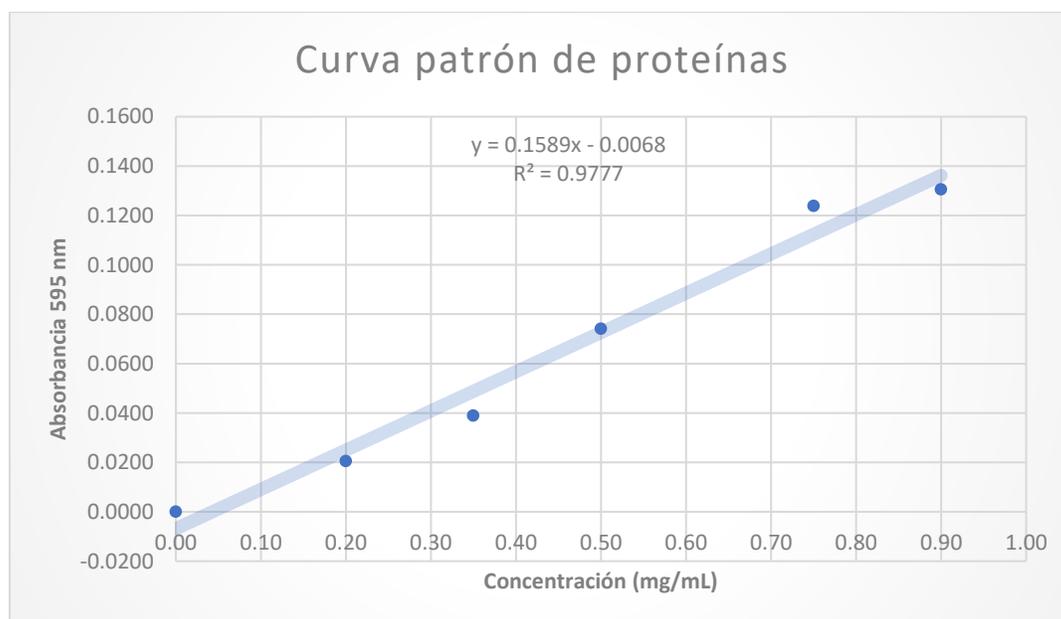


Gráfico 1. Curva patrón de proteínas.

Los resultados sugieren que en el BSG contiene una gran cantidad de proteínas (26.23%), incluso el contenido se encuentra un poco por arriba de los reportados por Qin *et al.* (2018) (22.44%), Rommi *et al.* (2021) (23.00%), Parchami *et al.* (2021) (22.65%), Riaño *et al.* (2021) (17.70%) y He *et al.* (2021) (21.90%). A pesar de tener resultados que se encuentran en el rango mencionado en la literatura (14% hasta 30%), parece ser que el porcentaje de proteínas se encuentra sobreestimado, pues si se suma este resultado con el resto de los componentes del BSG se obtiene un total de 110.33%, del mismo modo, el porcentaje de compuestos solubles

considerando este porcentaje de proteínas, no coincide con el porcentaje de compuestos solubles determinados en los lavados de fibra con solución NDF (63.64% en comparación con 56.71% de los lavados con NDF). La sobreestimación podría atribuirse a que el reactivo de Bradford puede unirse a otros componentes presentes en la muestra causando interferencia en las lecturas de absorbancia, cuantificando también componentes que no son proteínas.

El porcentaje de proteínas considerado finalmente en el AQP fue el porcentaje de proteínas determinado para el mismo tratamiento en la comparación de los tratamientos de extracción de proteínas, esta decisión fue tomada porque el porcentaje de proteínas en esta determinación(16.26%) es congruente al obtener el porcentaje total del AQP (100.36%) y con el porcentaje de compuestos solubles en los lavados con solución NDF (53.67%, muy cercano al 56.71% de los lavados con NDF), incluso para esta determinación se llevaron a cabo más lecturas de absorbancia con buen %CV, lo cual indica que el resultado es confiable.

5.1.5. Análisis de carbohidratos.

A priori, en los resultados de los análisis de carbohidratos (*Tabla 11*) se puede observar una cantidad alta de carbohidratos solubles, una baja cantidad de celulosa y una cantidad bastante coherente de hemicelulosa con respecto a la literatura. Más adelante se discutirán estos resultados a detalle.

Tabla 11. Resultados de los análisis de carbohidratos.

Carbohidratos	Porcentaje
Carbohidratos Totales	64.68
Carbohidratos Solubles	34.12
Hemicelulosa	25.82
Celulosa	4.74

5.1.5.1. Análisis de carbohidratos totales.

El porcentaje de carbohidratos totales en el BSG fue obtenido extrapolando los datos de absorbancia de la muestra tratada con fenol y H₂SO₄ con la curva patrón

elaborada con soluciones stock de glucosa y posteriormente fue calculado como se muestra en el *Anexo 1*.

En la curva patrón se correlacionan los valores de absorbancia a 490 nm y concentración de carbohidratos como se muestra en el *Gráfico 2*, los datos de la curva y de la muestra se observan en la *Tabla 11*. La curva patrón presenta una buena correlación entre absorbancia y concentración, pues el coeficiente de correlación (R^2) es muy cercano a 1.

Tabla 12. Absorbancias de las soluciones stock, de la muestra y porcentaje de carbohidratos totales en BSG.

Concentración (ppm)	Absorbancia	a 490 nm	Promedio	Desv. Est.	% CV
0	0	0	0	0	0
20	0.2699	0.2703	0.2701	0.000	0.10
40	0.3870	0.3870	0.3870	0.000	0.00
60	0.5936	0.5932	0.5934	0.000	0.05
80	0.7215	0.7235	0.7225	0.001	0.20
100	0.9050	0.9028	0.9039	0.002	0.17
Muestra	1.9529	1.9480	1.9505	0.003	0.18
% Carbohidratos Totales en BSG		64.68			

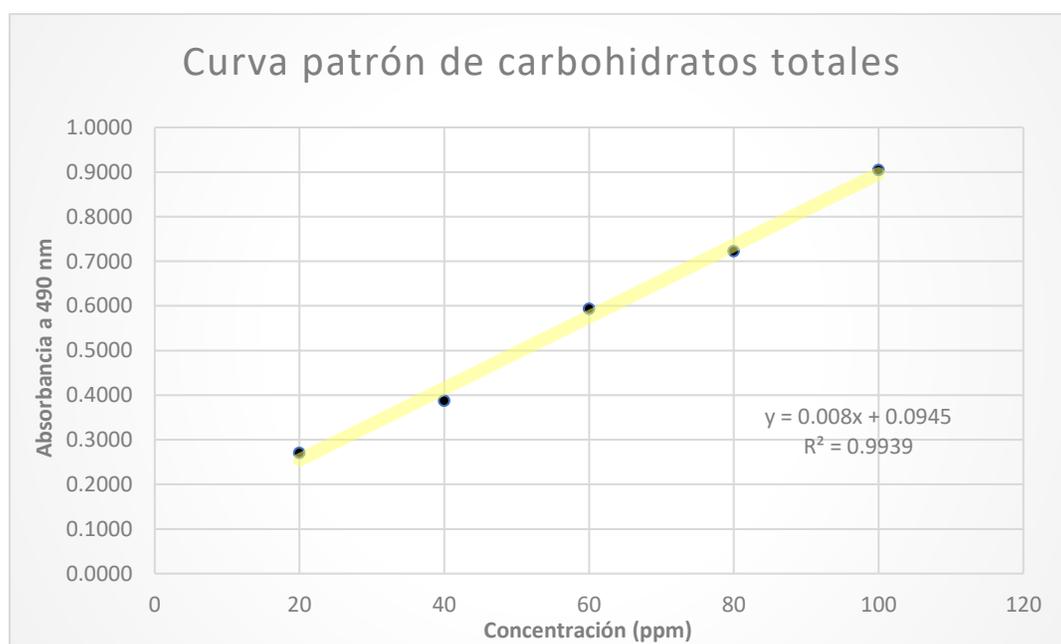


Gráfico 2. Curva patrón de carbohidratos totales.

El porcentaje de carbohidratos totales en el BSG (64.68%) es bastante elevado con respecto a los valores reportados en la literatura, Qin *et al.* (2018) reportan 46.52%, mientras Rommi *et al.* (2021) reportan 43.00%. Considerando el porcentaje de carbohidratos totales y del porcentaje de los carbohidratos de la fibra, los datos sugieren que hay una cantidad elevada de carbohidratos solubles (34.12%) (calculados con la *Ecuación 7* del *Anexo 1*), incluso la cantidad es más elevada que la reportada por Parchami *et al.*, (2021), donde el almidón (componente mayoritario de los carbohidratos solubles del BSG) tomó un valor de 20.88%. La alta cantidad de carbohidratos solubles puede deberse a que la extracción de carbohidratos no fue lo suficientemente efectiva durante la elaboración de cerveza, quedando una cantidad importante de ellos en el BSG, esta situación pudo generarse desde el malteado de la cebada, pues en este proceso se producen proteasas que degradan en péptidos a las proteínas, cuando esta hidrólisis es insuficiente, se inhibe la degradación del almidón debido a que sus granos se encuentran estrechamente asociados a las proteínas (en especial a la hordeína), las cuales forman una especie de barrera que impide el ingreso de las enzimas que hidrolizan al almidón, así también evitan la migración del almidón al extracto (Jaeger *et al.*, 2021).

5.1.5.2. Análisis de fibra.

El porcentaje de la fibra total y de cada uno de sus componentes (*Tabla 14*) fueron calculados como se muestra en el *Anexo 1*, utilizando los datos recabados en la *Tabla 13*.

Tabla 13. Datos para la determinación de fibra y sus componentes.

Etapa	Masa del crisol (g)	Masa de la muestra (g)	Masa crisol + residuo sólido(g)	Masa residuo sólido (g)
Lavado NDF	50.1966	0.5100	50.4152	0.2186
	48.3083	0.5579	48.5522	0.2439
Lavado ADF	50.1966	0.5100	50.2858	0.0892
	48.3083	0.5579	48.4056	0.0973
Oxidación con KMnO ₄	50.1966	0.5100	50.2068	0.0102
	48.3083	0.5579	48.3500	0.0417

Tabla 14. Porcentajes de la fibra y sus componentes.

Fracción	%	% (Promedio)	Desv. Est.	%CV
Sólidos solubles	57.14	56.71	0.60	1.07
	56.28			
Hemicelulosa	25.37	25.82	0.64	2.48
	26.28			
Lignina	15.49	12.73	3.91	30.69
	9.97			
Celulosa	2.00	4.74	3.87	81.71
	7.47			
Fibra total	42.86	43.29	0.60	1.40
	43.72			

El resultado obtenido del porcentaje de fibra total (43.29%) es bastante congruente a los valores reportados en la literatura por He *et al.* (2021) quienes obtuvieron un porcentaje de fibra total en BSG del 45.50%, de igual forma que los demás componentes, la fibra puede variar de acuerdo con la materia prima, por ejemplo, Parchami *et al.* (2021) reportaron un valor más alto de fibra total, la cual constituyó el 59.57%.

El contenido de fibra total obtenido es bastante confiable por su bajo %CV, incluso complementa perfectamente la cantidad de componentes solubles calculados en el AQP (considerando el porcentaje de grasa, porcentaje de proteínas y porcentaje de carbohidratos solubles) que sumados conforman el 53.67%, porcentaje muy cercano al de sólidos solubles calculado después de los lavados con la solución NDF (56.71%).

El porcentaje de hemicelulosa en BSG (25.82) también coincide con algunos porcentajes reportados por algunos autores, Qin *et al.* (2018) reportaron un 25.97% y Parchami *et al.* (2021) reportaron un 25.31%. Al igual que el porcentaje de fibra total, el resultado es confiable por su bajo %CV, tal como se menciona en la literatura, la hemicelulosa es el componente mayoritario de la fibra del BSG y alcanza porcentajes de 20-35% en peso seco (He *et al.*, 2021).

Los componentes restantes, lignina y celulosa, arrojan resultados que no son confiables debido a que presentan un %CV muy alto, sin embargo, al complementarse sus valores en el duplicado de determinaciones, no afectan el porcentaje de fibra total. Se obtuvieron porcentajes de lignina y celulosa de 12.73 y 4.74 respectivamente, el porcentaje de lignina es cercano al reportado por Rommi *et al.* (2021) quienes obtuvieron un 15.00%, mientras que es más distante del reportado por Qin *et al.* (2018) quienes obtuvieron un 19.60%, sin embargo, el valor se mantiene dentro de los intervalos mencionados en la literatura, Ikram *et al.* (2017) mencionan un intervalo del 10-28%, mientras que He *et al.* (2021) mencionan un intervalo un poco más amplio de 7-28%. Por último, el porcentaje de la celulosa no coincide con los valores reportados en la literatura, se encuentra muy por debajo, Qin *et al.* (2018) registran un valor del 20.56% de celulosa en BSG y Parchami *et al.* (2021) reportaron un porcentaje de 17.52%, incluso se encuentra por debajo del rango mencionado por He *et al.* (2021), el cual va de un 12% a un 15%. Los resultados poco confiables podrían deberse a algún error durante las etapas de oxidación y desmineralización en la metodología, que son justo las etapas donde se determinan las cantidades de lignina y celulosa.

5.2. Elección del método de extracción de proteínas adecuado.

Los porcentajes de proteínas extraídas del BSG con cada tratamiento podemos visualizarlos en la *Tabla 16*, para obtenerlos se utilizaron los datos de lecturas a 595 nm de los extractos obtenidos en cada tratamiento de extracción aplicados al BSG después de reaccionar con el reactivo de Bradford, estos datos se pueden observar en la *Tabla 15*.

El cálculo del porcentaje de proteínas para cada tratamiento se realizó de manera similar al cálculo del porcentaje de proteínas en el AQP (ver *Anexo 1, Ecuaciones: 3 y 4*), en el *Anexo 2* se muestran ejemplos de cálculos para las muestras de cada tratamiento de extracción. En el *Anexo 2* también se puede encontrar el desglose de todo el análisis estadístico.

Tabla 15. Lecturas a 595 nm de los extractos de cada método de extracción después de reaccionar con el reactivo de Bradford.

Tratamiento	Absorbancia a 595 nm			
	Hidrotermal	Alcalino	Extrusión de doble tornillo	Ultrasonido
	0.099	0.090	0.114	0.081
	0.098	0.090	0.113	0.081
	0.098	0.090	0.113	0.081
	0.078	0.087	0.132	0.070
	0.078	0.087	0.131	0.070
	0.077	0.087	0.131	0.070
	0.088	0.081	0.128	0.070
	0.088	0.081	0.127	0.070
	0.088	0.080	0.128	0.069
Promedio	0.088	0.086	0.124	0.074
Desv. Estándar	0.009	0.004	0.008	0.006
%CV	10.18	4.82	6.65	7.603

Tabla 16. Concentración de proteínas extraídas del BSG con cada método de extracción.

Tratamiento	Concentración de proteínas (%m/m)			
	Hidrotermal	Alcalino	Extrusión de doble tornillo	Ultrasonido
	1.60	16.98	2.45	10.43
	1.59	16.98	2.43	10.43
	1.59	16.98	2.43	10.43
	1.28	16.46	2.81	9.12
	1.28	16.46	2.79	9.12
	1.27	16.46	2.79	9.12
	1.44	15.41	2.73	9.12
	1.44	15.41	2.71	9.12
	1.44	15.23	2.73	9.00
Promedio	1.44	16.26	2.65	9.54
Desv. Estándar	0.14	0.73	0.17	0.66
%CV	0.09	0.04	0.06	0.07

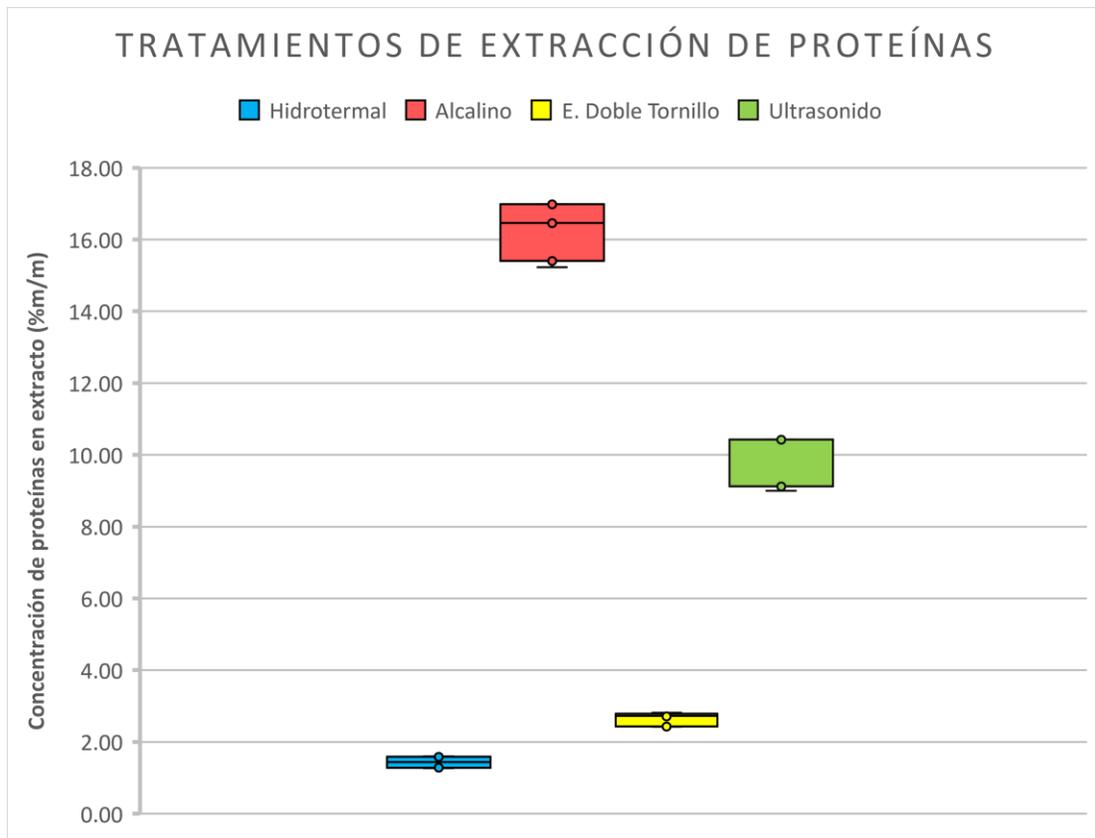


Gráfico 3. Diagrama de cajas de las concentraciones de proteínas extraídas del BSG con cada método de extracción.

Como se puede observar en la *Tabla 16*, a priori, la extracción alcalina es el método que más porcentaje de proteína extrae del BSG, seguido por el tratamiento alcalino asistido por ultrasonido, dejando atrás a la extrusión de doble tornillo y al tratamiento hidrotermal, incluso el *Gráfico 3* nos muestra de una manera visual la diferencia entre métodos. Con el análisis estadístico que se encuentra en el *Anexo 2*, se puede afirmar que existe diferencia significativa entre todas las muestras.

El tratamiento alcalino fue el más efectivo, pues es un tratamiento que consiste en la ruptura de las paredes celulares (Du *et al.*, 2020), rompe enlaces disulfuro y la extracción se ve favorecida por la ionización de los aminoácidos gracias a la solución alcalina (Contreras *et al.*, 2019), extrae todas las fracciones de las proteínas (glutelinas, albúminas, globulinas y prolaminas) (Hojillas-Evangelista, 2017). El tratamiento al llevarse a cabo a 50°C puede tener también un efecto sobre la extracción al mejorar la solubilidad de las proteínas.

En cuanto al tratamiento alcalino asistido por ultrasonido, puede decirse que es una alternativa interesante para la extracción de las proteínas del BSG, obtuvo menor porcentaje que el tratamiento alcalino clásico, sin embargo, las pruebas se llevaron a cabo a temperatura ambiente implicando un ahorro en la energía eléctrica, con el aumento de la temperatura podría aumentar el porcentaje y obtener valores más cercanos a la extracción alcalina clásica. Incluso podría mejorar el porcentaje de extracción a temperatura ambiente utilizando los parámetros de potencia y frecuencia sugeridos por Li *et al.* (2021), como se menciona antes, estos parámetros no fueron posibles de modificar en el equipo de ultrasonido utilizado.

En el caso de la extrusión de doble tornillo, las proteínas pueden extraerse gracias a la lisis mecánica de las células (Colas *et al.*, 2013), a pesar de ello, este método no extrajo un buen porcentaje de proteínas del BSG, ni siquiera porque se utilizó una solución alcalina como disolvente. La baja extracción podría atribuirse al corto tiempo de residencia del BSG en el extrusor, extrayendo sólo una pequeña cantidad de proteínas.

Por último, el tratamiento hidrotérmico, método que arrojó el menor porcentaje de extracción. Es fácil comprender el resultado, pues el agua extrae sólo una fracción de proteínas (albúminas y parte de las globulinas) (Riaño *et al.*, 2021), sin embargo, la extracción podría mejorar optimizando la metodología tal como lo describen Qin *et al.* (2018), pues ellos emplearon una incubadora a temperatura y velocidad constante, mientras que en este proyecto la temperatura oscilaba por la parrilla y el baño de glicerina, aparte de que la agitación se llevó a cabo con una barra de agitación magnética.

5.3. Producción de proteínas.

Los resultados de la producción de proteínas tanto a pequeña como a mayor escala se encuentran en la *Tabla 17*, los balances de materia y los cálculos correspondientes a los balances de materia, determinación de fibra NDF, pureza y rendimientos de los aislados de proteínas, se pueden encontrar en el *Anexo 3*. Los *Gráficos 4 y 5* corresponden a los espectros de infrarrojo generados en los análisis de espectroscopía de infrarrojo de las muestras de aislados de proteínas.

Tabla 17. Datos de la producción de proteínas.

Producción	Pequeña escala	Mayor escala
<i>BSG</i>	149.6594 g	802.1559 g
<i>Residuo sólido seco</i>	54.9451 g	168.1000 g
<i>Aislado de proteína</i>	12.3302 g	51.0789 g
<i>Fibra NDF en residuo sólido seco</i>	74.02%	77.32%
<i>Pureza de aislado de proteína</i>	52.74%	60.53%
<i>Proteínas remanentes en sobrenadante</i>	0.08%	0.1%
<i>Rendimiento de aislado de proteína</i>	8.23%	6.37%

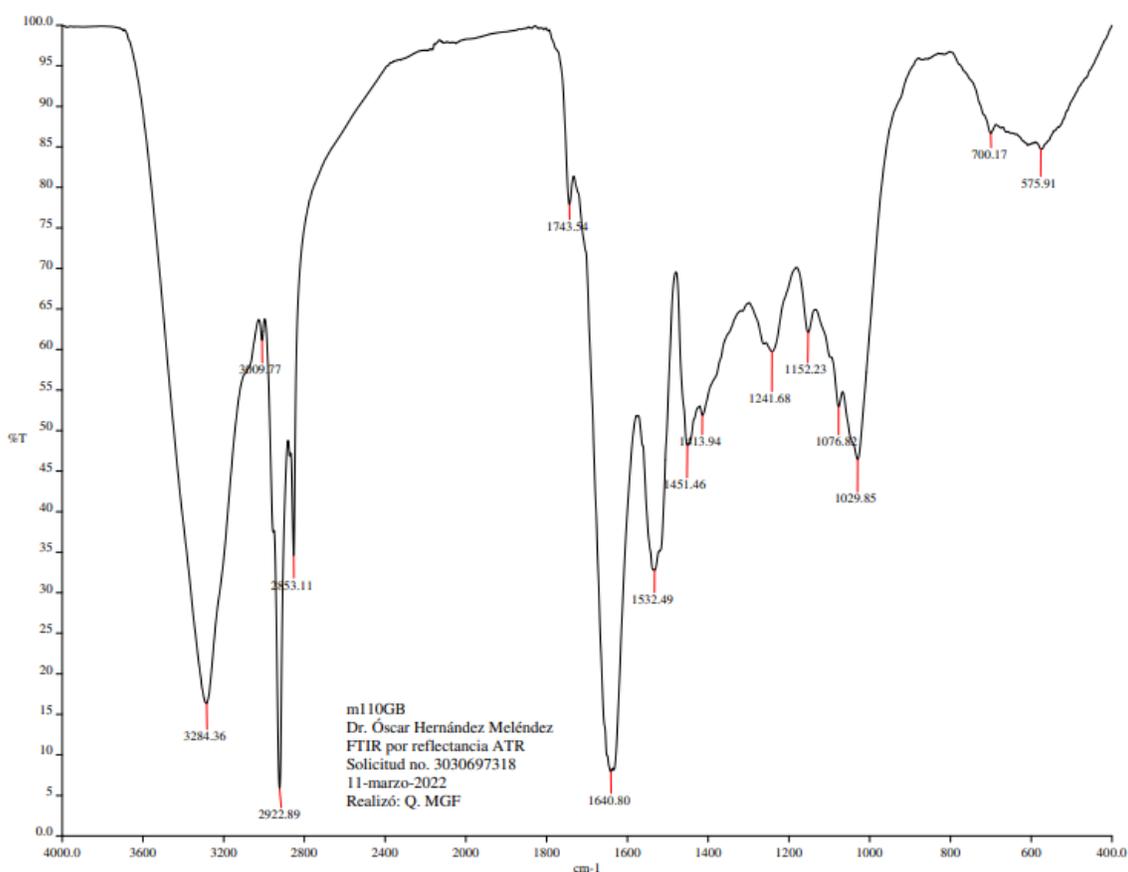


Gráfico 4. Espectro de infrarrojo del aislado de proteínas producido a pequeña escala.

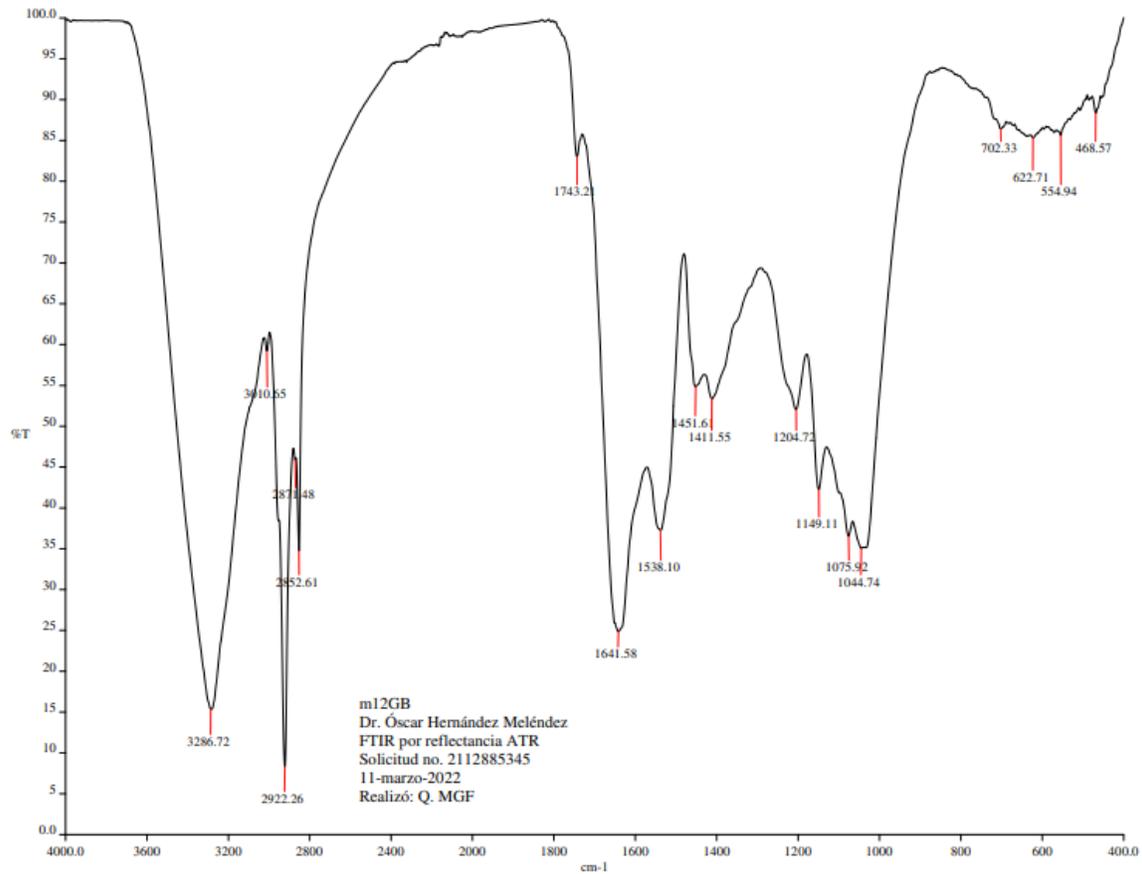


Gráfico 5. Espectro de infrarrojo del aislado de proteínas producido a gran escala.

Observando los datos de la *Tabla 17*, podemos darnos cuenta de que la pureza de la proteína mejoró en la producción a mayor escala, aunque presentó un menor rendimiento de aislado de proteínas. La pureza indica una mejor hidrólisis y separación de las proteínas de la fibra y carbohidratos, pues las proteínas se asocian estrechamente con carbohidratos y lignina (Qin *et al.*, 2018; Jaeger *et al.*, 2021), sin embargo, no es posible obtener rendimientos muy altos debido a la coprecipitación de las proteínas con la lignina y algunos carbohidratos (Rommi *et al.*, 2018). En los resultados de fibra en el residuo sólido se puede observar que cuando la pureza de la proteína aumenta, la fibra en el residuo sólido también lo hará, indicando que las impurezas en el aislado de proteínas en su mayoría están constituidas por fibra.

El aumento de pérdidas (como se observa en el *Anexo 3*) y el bajo rendimiento del aislado de proteínas en la producción a mayor escala puede deberse a que esta producción fue más complicada de llevarse a cabo en el laboratorio, especialmente en la filtración del residuo sólido para obtener el extracto rico en proteína, pues este proceso se llevó de manera manual, incluso hay pérdidas considerables en la separación del aislado de proteínas húmedo de la centrífuga debido a la adherencia a las paredes en las superficies del equipo, utensilios y recipientes de recolección. Estas pérdidas pueden disminuirse y, por lo tanto, aumentar el rendimiento de los aislados de proteínas, al utilizar equipos como prensas y filtros para obtener una mayor cantidad de extracto rico en proteínas.

La separación por centrifugación arroja buenos resultados, pues al analizar el sobrenadante que se descarta en este proceso, se observa que este contiene bajas cantidades de proteína remanente tanto en las producciones a pequeña y gran escala, por lo que puede decirse que es una operación muy útil para separar el aislado de proteínas precipitado.

El secado con aire a temperatura ambiente cumple cabalmente con su función, es una buena opción para ahorrar energía y evitar daños térmicos a las proteínas, no obstante, lleva más tiempo que someter el aislado a temperaturas mayores.

Observando los espectros de infrarrojo (*Gráficos 4 y 5*), podemos darnos cuenta de que son bastante parecidos y presentan señales de las vibraciones y absorciones de los enlaces de los grupos funcionales en zonas similares de longitud de onda, lo cual es indicio que la extracción alcalina de proteínas de BSG es reproducible. En la *Tabla 18* se muestran las señales del espectro de infrarrojo de los aislados de proteínas y los posibles grupos funcionales asociados de acuerdo con el portal de Merck y Sigma-Aldrich.

Tabla 18. Señales de los espectros de infrarrojo e interpretación.

Rango de longitud de onda reportado	Señal del aislado producido a pequeña	Señal del aislado producido a mayor	Enlaces asociados a la señal
--	--	--	-------------------------------------

<i>en la literatura</i> (cm^{-1})	escala (cm^{-1})	escala (cm^{-1})	
3300-2500	3284.36 Fuerte.	3286.72 Fuerte.	Estiramiento correspondiente a enlaces O-H de ácidos carboxílicos, podrían corresponder a carboxilos terminales de las proteínas, aminoácidos como ácido aspártico y ácido glutámico, y al ácido acético remanente.
3200-2700	3009.77 Débil	3010.65 Débil	Estiramiento de enlaces O-H intermoleculares de alcoholes, podrían corresponder a hidroxilos de carbohidratos, compuestos de la lignina y a aminoácidos como la treonina y la serina.
3200-2800	2922.89 Fuerte	2922.26 Fuerte	Estiramiento de enlaces N-H, podrían corresponder a grupos amino terminales de las proteínas y a aminoácidos como la lisina.
3000-2840	2853.11 Media	2871.48 2852.61 Medias	Estiramiento de enlaces alcano C-H, podrían corresponder principalmente a las cadenas alifáticas de aminoácidos como alanina, leucina, isoleucina y valina, también a enlaces C-H dentro de las estructuras de lignina, carbohidratos y proteínas.
2000-1650	1743.54 Débil	1743.21 Débil	Flexión de enlaces C-H de grupos aromáticos, puede corresponder a los compuestos de las ligninas y a aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina, triptófano e histidina.

1640	1640.80 Fuerte	1641.58 Fuerte	Estiramiento del enlace C=O de amidas, pueden corresponder a las amidas del enlace peptídico de las proteínas.
1550-1500	1532.49 Media	1538.10 Media	Estiramiento de los enlaces N-O. Se desconoce a qué tipo de compuesto presente en el aislado de proteínas puede corresponder esta señal.
1450	1451.46 Media	1451.61 Media	Flexión de enlaces C-H de grupos metilo (los grupos metilenos también muestran señales en valores cercanos de frecuencia), puede corresponder a los grupos metilo o metilenos de los aminoácidos como alanina, valina, leucina, isoleucina y treonina.
1440-1330	1413.94 Media	1411.55 Media	Flexión de los enlaces O-H de ácidos carboxílicos y alcoholes, podrían corresponder a carboxilos terminales de las proteínas, a aminoácidos como ácido aspártico y ácido glutámico, y al ácido acético remanente; hidroxilos de carbohidratos, compuestos de la lignina y a aminoácidos como la treonina y la serina.
1275-1200	1241.68 Media	1204.72 Media	Estiramiento de los enlaces C-O de los alquil-aril éteres, es bastante probable que esta señal corresponda con la lignina, en su estructura contiene este tipo de grupos funcionales.
1250-1020	1152.23 Media	1149.11 Media	Estiramiento de los enlaces C-N de aminas, pueden corresponder a grupos amino terminales de las proteínas y a aminoácidos como la lisina.

1085-1050	1076.82 Media	1075.92 Media	Estiramiento de los enlaces C-O de alcoholes primarios, este tipo de enlaces se encuentran en el aminoácido serina y en algunos carbohidratos.
1250-1020	1029.85 Media	1044.74 Media	Estiramiento de los enlaces C-N de aminas, pueden corresponder a grupos amino terminales de las proteínas y aminoácidos como la lisina.
700 ± 20	700.17	702.33	Señales correspondientes a anillos bencénicos. Seguramente estas señales se deben a los anillos aromáticos de la lignina y a aminoácidos aromáticos.
850-550	-	622.71	Estiramiento correspondiente a enlaces C-Cl. Se desconoce si realmente pueden pertenecer a compuestos halogenados presentes en el aislado de proteínas.
690-500	575.91	554.94	Estiramiento correspondiente a enlaces C-Br o C-I. Se desconoce si realmente pueden pertenecer a compuestos halogenados presentes en el aislado de proteínas.
-	-	468.57	No se tiene información para esta señal.

Los espectros de infrarrojo presentaron señales esperadas para este material rico en proteínas, se esperaban señales provenientes de enlaces de los átomos de las cadenas laterales de aminoácidos, enlaces de los grupos amino y grupos carboxilos propios de las proteínas, así también de los enlaces amida del enlace peptídico, incluso pueden reflejarse los enlaces presentes en el ácido acético remanente. Estos espectros también respaldan la información obtenida previamente de los ensayos de pureza del aislado de proteínas y de acuerdo con los análisis de fibra correspondientes a los residuos sólidos, se sugiere que las impurezas del aislado corresponden principalmente a la fibra (específicamente lignina), información que

encaja perfectamente con los espectros porque hay señales que indican la presencia de anillos aromáticos y ésteres de estos mismos que confirmarían la presencia de la fibra en el aislado de proteína justamente por la coprecipitación de proteínas, lignina y algunos carbohidratos que mencionan Rommi *et al.* (2018).

5.4. Impresión en 3D

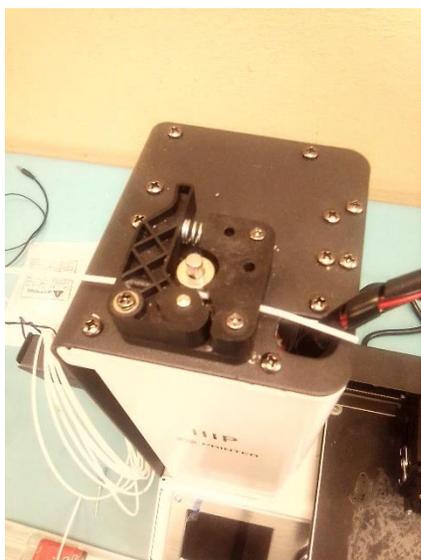


Foto 17. Sistema de arrastre de PLA hacia la boquilla de la impresora 3D.

Para la impresión de las formulaciones, se realizaron algunos ajustes a la impresora 3D, el primero de ellos fue la adaptación de una jeringa de plástico de 5 mL a la entrada de material, debido a que las formulaciones fueron fluidas y no sólidas como lo es el PLA, inclusive la presión manual cumplió con la función de extrusión que ejercería la jeringa, aire o tornillo de una impresora 3D de alimentos (ver *Ilustración 6*, sección 2.5.1.), también se realizó esta adaptación debido a que las impresoras de PLA no contienen una jeringa, inyector de aire o tornillo para extruir el material, en su lugar cuentan con un mecanismo de engranes

que arrastra el material hacia la boquilla (*Foto 17*).

La otra adaptación que se llevó a cabo fue la modificación de una boquilla de 0.4 mm de diámetro, esta se taladró con una broca muy fina para obtener una abertura de 2 mm de diámetro, esto se realizó debido a que el diámetro de la boquilla influye bastante al momento de imprimir, a menor diámetro se requiere una mayor velocidad de corte y una mayor caída de presión, es decir, se requiere una mayor fuerza para hacer pasar el material a través de la boquilla, esto se explica mejor de manera matemática empleando las *Ecuaciones 23, 24 y 25* descritas por Anguita (1977) que se pueden encontrar en el *Anexo 4*, la ejemplificación de los cálculos se llevó a cabo con la formulación Alginato-almidón-aislado de proteínas y se resume en la *Tabla 19*.

Tabla 19. Velocidad de corte y caída de presión requeridas para extruir un material a través de distintos diámetros de boquilla.

Diámetro de la boquilla (mm)	Velocidad de corte (rpm)	Caída de presión a 100 rpm (Kg*s/cm²)
0.4	79595.64	75399.65
1	5,090.92	1930.23
2	636.37	120.64

5.4.1. Elección de la formulación para impresión en 3D y propiedades reológicas.

El comportamiento reológico de cada formulación puede observarse claramente en los *Gráficos 6, 7 y 8*, elaborados a partir de *las Tablas 20, 21 y 22* respectivamente. En estos gráficos se muestra el cambio de la viscosidad en centipoises (cP) de las formulaciones con respecto al cambio de la velocidad de corte en revoluciones por minuto (rpm). La viscosidad es la resistencia de un material a fluir, mientras que la velocidad de corte es el esfuerzo de corte aplicado al material (Sahin & Güllum, 2006).

Lo que se buscaba con estas pruebas era encontrar materiales con un comportamiento reológico de fluido no newtoniano pseudoplástico adelgazante al cizallamiento, es decir, aquellos que disminuyen su viscosidad al aumentar la velocidad de corte (Jiang *et al.*, 2019), esto permite que el material al ser extruido disminuya su viscosidad y pase con facilidad a través de la boquilla. Una vez impresa la figura, el material deberá ser capaz de deponerse capa por capa debido a su rápida recuperación estructural, de esta manera puede soportar la estructura impresa (Jiang *et al.*, 2019; Hussain, *et al.* 2020).

Existen materiales con comportamiento de fluido newtoniano, estos no varían su viscosidad al aumentar la velocidad de corte; por otra parte, se encuentran los materiales con comportamiento reológico de fluido no newtoniano espesantes al cizallamiento que, al aumentar la velocidad de corte, aumentan su viscosidad (Sahin & Güllum, 2006). Estos materiales no son aptos para la impresión en 3D porque al

momento de la extrusión, los fluidos newtonianos pasan a través de la boquilla, pero al ser prácticamente líquidos, no adquieren forma alguna; mientras que los espesantes al cizallamiento, al momento de la extrusión, el material se espesa y tapa la boquilla (Pérez *et al.*, 2021).

Tabla 20. Datos de viscosidad a diferentes velocidades de corte de la suspensión de aislado de proteínas del BSG en viscosímetro rotacional digital.

Aislado de Proteínas de BSG	
Velocidad de cizalla (rpm)	Viscosidad (cP)
0.5	24000
1	12000
2	6000
2.5	4800
4	3000
5	2400
10	1200
20	600
50	240
100	160

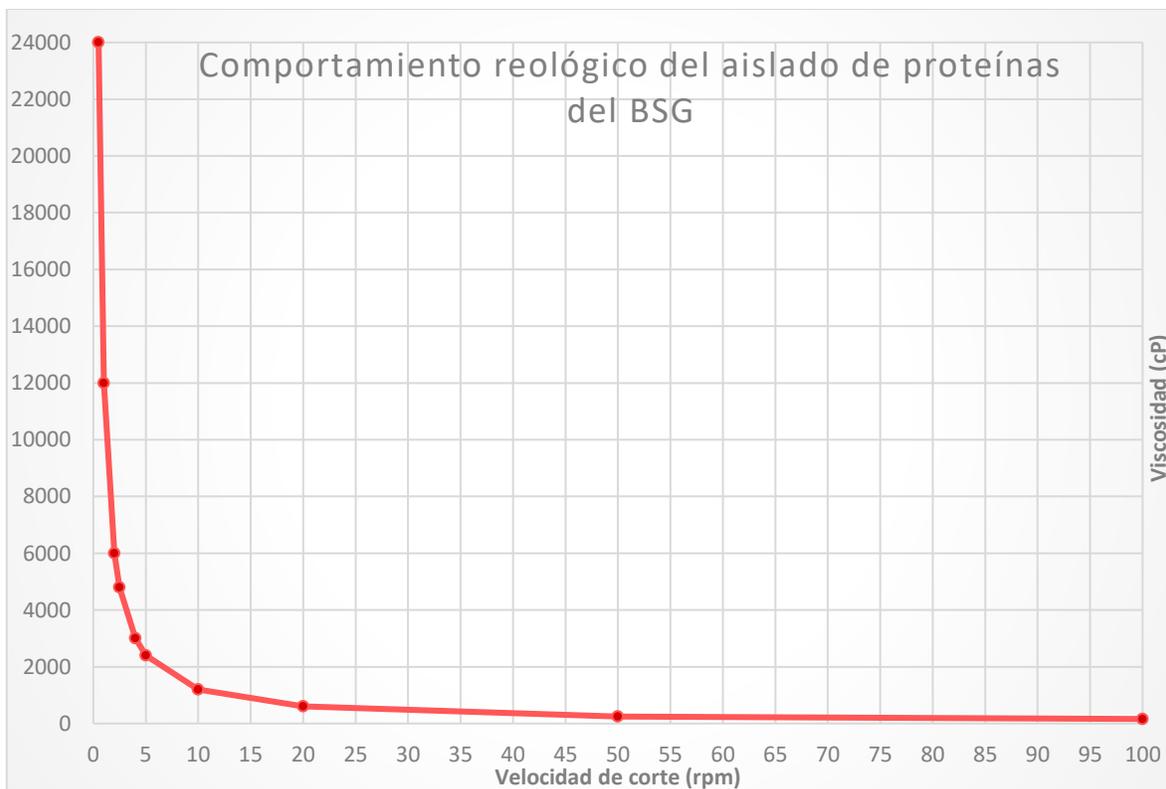


Gráfico 6. Comportamiento reológico de la suspensión de aislado de proteínas de BSG.

El comportamiento reológico de la suspensión neutra del aislado de proteínas de BSG (*Gráfico 6*) muestra un comportamiento de pseudoplástico, su viscosidad disminuye cuando se aumenta la velocidad de corte, sin embargo, la viscosidad disminuye demasiado y su comportamiento llega a parecerse al comportamiento de un fluido newtoniano debido a que es una suspensión, si pasara por la boquilla, no podría deponerse el material para formar una estructura sólida y coherente, entonces la suspensión de aislado de proteínas es una formulación no apta para imprimir en 3D.

Tabla 21. Datos de viscosidad a diferentes velocidades de corte de la masa para galletas en viscosímetro rotacional digital.

Masa para galletas	Velocidad de cizalla (rpm)	Viscosidad (cP)
	0.5	928000
	1	508000
	2	334000
	2.5	288000
	4	198000
	5	136800
	10	99200
	20	71200
	50	40920
	100	18440

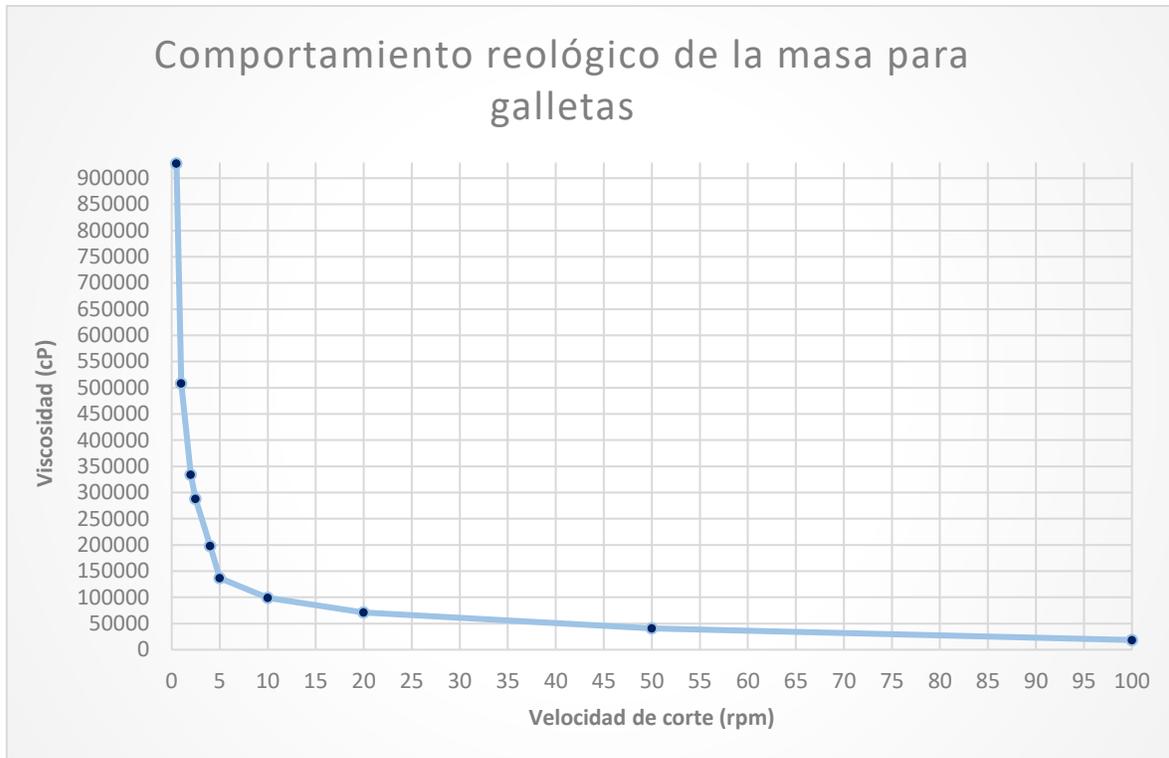


Gráfico 7. Comportamiento reológico de la masa para galletas.

El comportamiento reológico de la formulación de la masa para galletas (*Gráfico 7*) es el de un pseudoplástico, es un material apto para impresión en 3D que ha sido empleado antes por Lipton *et al.* (2010) y más tarde por Hussain *et al.* (2020). El problema de la formulación es que, al ser compleja, su viscosidad es bastante grande incluso a altas velocidades de corte. De hecho, la determinación en el viscosímetro se llevó a cabo a 100°C, pues el aumento de la temperatura provoca un descenso en la viscosidad en la mayoría de los materiales (Sahin & Güllum, 2006), a temperatura ambiente la formulación fue más espesa que el equipo no logró medir su viscosidad.

Debido a la viscosidad tan alta, la extrusión en la impresora 3D con la que contamos no fue viable para esta formulación debido a que la boquilla se tapa a pesar de utilizar aquella con un orificio más amplio (2 mm), incluso en la *Ecuación 25 (Anexo 4)* podemos darnos cuenta de que se requiere una mayor caída de presión ante una mayor viscosidad, requiriendo un mayor esfuerzo para extruir el material. En impresoras 3D de alimentos es viable la impresión debido a que estas sí cuentan

con un sistema integrado de extrusión. Hussain *et al.* (2020) imprimieron su formulación para galletas utilizando también un diámetro de boquilla de 2 mm, este dato sugiere que en este proyecto fue necesario contar con un buen sistema de extrusión para imprimir un material tan viscoso como la masa para galletas.

Tabla 22. Datos de viscosidad a diferentes velocidades de corte de la formulación alginato-almidón-aislado de proteínas de BSG en viscosímetro rotacional digital.

Alginato-Almidón-Aislado de proteínas de BSG	
Velocidad de cizalla (rpm)	Viscosidad (cP)
0.5	16000
1	15000
2	13500
2.5	12800
4	11750
5	10800
10	9900
20	9350
50	5920
100	4290

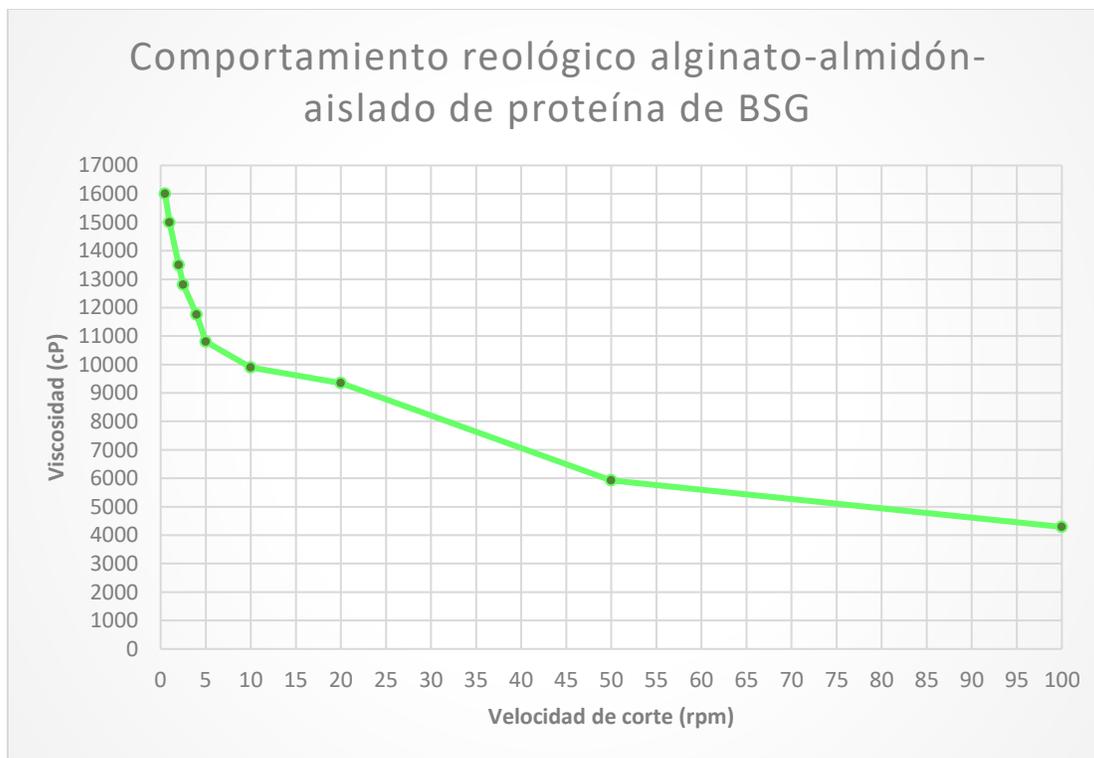


Gráfico 8. Comportamiento reológico de la formulación alginato-almidón-aislado de proteínas de BSG.

Para obtener una formulación con las propiedades adecuadas para imprimir en 3D, al aislado de proteínas en suspensión se le agregaron aditivos para obtener un material más viscoso con la propiedad de formar un gel capaz de reestructurarse después de la extrusión y obtener así una estructura coherente, los aditivos fueron almidón de maíz y alginato de sodio. En el *Gráfico 8* se muestra el comportamiento reológico de la formulación, al igual que las dos formulaciones anteriores, muestra un comportamiento de pseudoplástico, la ventaja es que no resultó una formulación demasiado espesa como en el caso de la masa para galletas y su viscosidad no disminuye tanto como en el caso de la suspensión del aislado de proteínas, por lo tanto, se consideró a esta formulación como la ideal para la impresión en 3D.

5.4.2. Impresión de la formulación en 3D.

El modelo que se imprimió fue la figura de un matraz Erlenmeyer figurando estar conteniendo una reacción química, en la *Ilustración 9* puede observarse la vista previa del objeto en el programa CAD. Esta figura fue elegida debido a que su impresión es relativamente sencilla, pues con la formulación de alginato-almidón-aislado de proteínas no podría fabricarse un objeto más complejo, se deformaría porque no se adhiere, no se seca rápidamente, ni tampoco se endurece tanto como ocurre con el PLA.

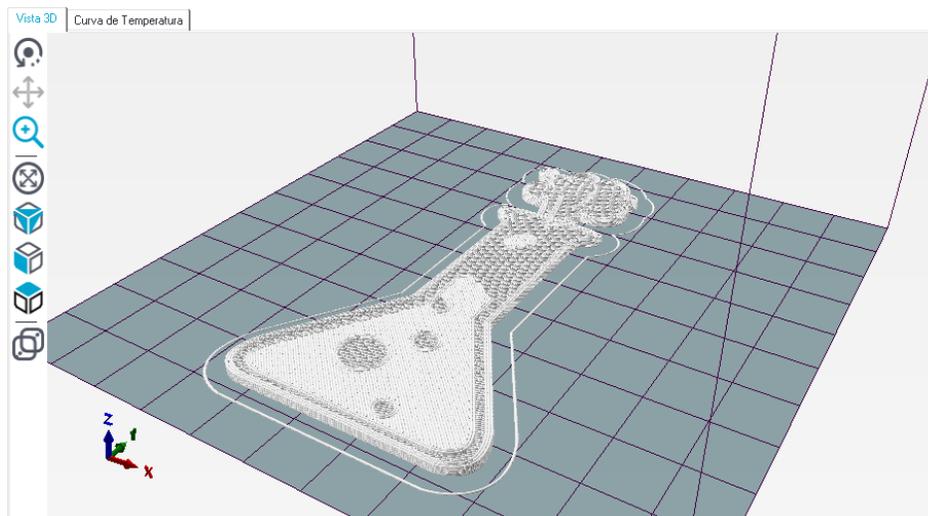


Ilustración 9. Modelado para impresión en 3D.



Foto 18. Impresión en 3D de PLA

Antes de la impresión de la formulación elegida, se imprimió el objeto con PLA, pues con PLA los objetos se obtienen con una excelente capacidad de impresión, es decir, el material se depone capa por capa manteniendo su estructura final (Pérez *et al.*, 2021), la *Foto 18* muestra el objeto de PLA perfectamente impreso.

En el caso de la impresión de la formulación Alginato-almidón-aislado de proteínas, la capacidad de impresión no es muy buena a pesar de tener buenas propiedades reológicas para impresión en 3D, los detalles de la figura se terminan perdiendo porque la

propia formulación termina por rellenarlos, esto debido a que el diámetro de la boquilla utilizada es más grande que el de la boquilla utilizada para imprimir PLA, los parámetros de la boquilla afectan la capacidad de impresión y la precisión de esta (Pérez *et al.*, 2021). Lo que se rescata de la impresión de la formulación es que conservó la forma deseada a pesar de la no muy buena capacidad de impresión, esto se puede observar en la *Foto 19*.

Se esperaría que en una impresora 3D de alimentos se logren obtener figuras con mejor capacidad de impresión que en el presente proyecto, pues al adaptar la impresora 3D



Foto 19. Impresión en 3D de Formulación alginato-almidón-aislado de proteínas de BSG

para PLA se tienen aún limitantes para lograr impresiones 3D de buena calidad e incluso limitantes para imprimir formulaciones de alimentos complejas.

Conclusiones.

- El método más eficaz para la extracción de las proteínas del BSG fue el clásico método de la extracción alcalina, una alternativa interesante es la extracción alcalina asistida por ultrasonido, la cual cuenta con la ventaja de que se puede llevar a cabo a temperatura ambiente y la optimización del proceso podría arrojar resultados de extracción favorables como la extracción alcalina clásica.
- La alternativa a las extracciones para obtener proteínas a partir de los residuos de cervecería es el desarrollo de medios de cultivo óptimos a partir de BSG para obtener proteínas SCP, las cuales resultan ser de alta calidad biológica con muy buenos rendimientos.
- La formulación óptima para impresión en 3D resultó ser la formulación elaborada con alginato, almidón y aislado de proteínas de BSG, que exhibió propiedades reológicas adecuadas para la impresión en 3D. La masa para galletas con 10% de aislado de proteínas es óptima siempre y cuando la impresora 3D tenga un sistema adecuado de extrusión, pues exhibe buenas propiedades reológicas pero una alta viscosidad.
- No se logró obtener un alimento impreso en 3D debido a las limitaciones del equipo con el que se cuenta, la idea era imprimir masa para galletas con 10% de aislado de proteínas de BSG, sin embargo, se logró imprimir un objeto a base de una formulación sencilla que podría fungir como base para la impresión 3D de alimentos más complejos.

Anexo 1. Ecuaciones para el cálculo de los componentes del AQP.

Ecuación 1. Cálculo del porcentaje de cenizas.

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(\text{Masa crisol} + \text{cenizas}) - (\text{Masa del crisol})}{\text{Masa de la muestra}} \times 100$$

Ecuación 2. Cálculo del porcentaje de grasa.

$$\% \text{ Grasa} = \frac{(\text{Masa matraz} + \text{grasa}) - (\text{Masa del matraz})}{\text{Masa de la muestra}} \times 100$$

Cálculo del porcentaje de proteínas.

Para el cálculo del porcentaje de proteínas, primero se parte de la ecuación de la curva patrón de proteínas (*Ecuación 3*).

Ecuación 3. Ecuación de la curva patrón de proteínas.

$$y = 0.1589x - 0.0068$$

Despejando la *Ecuación 3* queda la *Ecuación 4*.

Ecuación 4. Despeje de la ecuación de la curva patrón de proteínas.

$$x = \frac{y + 0.0068}{0.1589}$$

En la *Ecuación 4*, “x” es el valor de la concentración en mg/mL e “y” el valor de la absorbancia a 595 nm. Al emplear dicha ecuación, en conjunto con los datos del tratamiento de la muestra, se obtuvo el porcentaje de proteínas en el BSG como se muestra a continuación:

$$x = \frac{0.2922 + 0.0068}{0.1589} = 1.8817 \text{ mg/mL}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Proteínas} &= \frac{1.8817 \text{ mg proteínas}}{1 \text{ mL de dilución}} \times \frac{1 \text{ g proteínas}}{1000 \text{ mg proteínas}} \times \frac{5 \text{ mL de dilución}}{1 \text{ mL de extracto}} \\ &\times \frac{210 \text{ mL de extracto}}{7.5323 \text{ g de BSG}} \times 100 = 26.23\% \text{ de proteínas} \end{aligned}$$

Cálculo del porcentaje de carbohidratos.

Para obtener el porcentaje de carbohidratos totales, se debe partir de la ecuación de la curva patrón de carbohidratos (*Ecuación 5*).

Ecuación 5. Ecuación de la curva patrón de carbohidratos.

$$y = 0.008x + 0.0945$$

Despejando la *Ecuación 5*, se puede obtener la *Ecuación 6*.

Ecuación 6. Despeje de la curva patrón de carbohidratos.

$$x = \frac{y - 0.0945}{0.008}$$

En la *Ecuación 6*, “x” es el valor de la concentración en ppm e “y” el valor de la absorbancia a 490 nm. Al emplear dicha ecuación, en conjunto con los datos del tratamiento de la muestra, se obtuvo el porcentaje de carbohidratos totales en el BSG como se muestra a continuación:

$$x = \frac{1.9505 - 0.0945}{0.008} = 232 \text{ mg/L}$$

% Carbohidratos totales

$$\begin{aligned} &= \frac{232 \text{ mg de carbs.}}{1000 \text{ mL de dilución}} \times \frac{1 \text{ g de carbs.}}{1000 \text{ mg de carbs.}} \times \frac{100 \text{ mL de dilución}}{1 \text{ mL de extracto}} \\ &\times \frac{210 \text{ mL de extracto}}{7.5323 \text{ g de BSG}} \times 100 = 64.68\% \text{ de carbohidratos} \end{aligned}$$

Ecuación 7. Cálculo de carbohidratos solubles.

$$\text{Carbohidratos solubles} = \text{Carbohidratos totales} - (\text{Celulosa} + \text{Hemicelulosa})$$

Cálculo del porcentaje de fibra y de sus componentes.

Antes de calcular cada componente de la fibra, se debe de calcular la masa del residuo sólido después de cada paso de la metodología utilizando la *Ecuación 8*.

Ecuación 8. Cálculo del residuo sólido.

$$RS = (\text{Masa del crisol} + RS) - \text{Masa del crisol}$$

Después del cálculo del residuo sólido después de cada paso de la metodología, se procedió a calcular la cantidad de sólidos solubles en la muestra y cada componente de la fibra a partir de las siguientes ecuaciones:

Ecuación 9. Cálculo del porcentaje de sólidos solubles.

$$\% \text{ Sólidos solubles} = \frac{\text{Masa de la muestra} - \text{RS NDF}}{\text{Masa de la muestra}} \times 100$$

Ecuación 10. Cálculo del porcentaje de hemicelulosa.

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \frac{(\text{RS NDF} - \text{RS ADF})}{\text{Masa de la muestra}} \times 100$$

Ecuación 11. Cálculo del porcentaje de lignina.

$$\% \text{ Lignina} = \frac{(\text{RS ADF} - \text{RS Ox})}{\text{Masa de la muestra}} \times 100$$

Ecuación 12. Cálculo del porcentaje de celulosa.

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{\text{RS Ox}}{\text{Masa de la muestra}} \times 100$$

Una vez obtenidos los cálculos de cada componente, se calculó el porcentaje de fibra total con la *Ecuación 13*.

Ecuación 13. Cálculo del porcentaje de fibra total.

$$\% \text{ Fibra total} = \% \text{ Hemicelulosa} + \% \text{ Lignina} + \% \text{ Celulosa}$$

Anexo 2. Análisis estadístico para elegir el método de extracción de proteínas adecuado.

Ejemplos de cálculos para determinar el porcentaje de proteínas extraídas del BSG a partir de los datos de las muestras de cada método de extracción. Todos los cálculos parten de la *Ecuación 4 (Anexo 1)*.

a) Tratamiento hidrotermal.

$$x = \frac{0.099 + 0.0068}{0.1589} = 0.6658 \text{ mg/mL}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Proteínas} &= \frac{0.6658 \text{ mg proteínas}}{1 \text{ mL de extracto}} \times \frac{1 \text{ g proteínas}}{1000 \text{ mg proteínas}} \times \frac{210 \text{ mL de extracto}}{4.1550 \text{ g de BSG}} \\ &\times 100 = 1.60\% \text{ de proteínas} \end{aligned}$$

b) Tratamiento alcalino.

$$x = \frac{0.090 + 0.0068}{0.1589} = 0.6092 \text{ mg/mL}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Proteínas} &= \frac{0.6092 \text{ mg proteínas}}{1 \text{ mL de dilución}} \times \frac{1 \text{ g proteínas}}{1000 \text{ mg proteínas}} \times \frac{10 \text{ mL de dilución}}{1 \text{ mL de extracto}} \\ &\times \frac{210 \text{ mL de extracto}}{7.5323 \text{ g de BSG}} \times 100 = 16.98\% \text{ de proteínas} \end{aligned}$$

c) Extrusión de doble tornillo.

$$x = \frac{0.114 + 0.0068}{0.1589} = 0.7602 \text{ mg/mL}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Proteínas} &= \frac{0.7602 \text{ mg proteínas}}{1 \text{ mL de dilución}} \times \frac{1 \text{ g proteínas}}{1000 \text{ mg proteínas}} \times \frac{10 \text{ mL de dilución}}{1 \text{ mL de extracto}} \\ &\times \frac{314 \text{ mL de extracto}}{97.5534 \text{ g de BSG}} \times 100 = 2.45\% \text{ de proteínas} \end{aligned}$$

d) Tratamiento alcalino asistido por ultrasonido.

$$x = \frac{0.081 + 0.0068}{0.1589} = 0.5525 \text{ mg/mL}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Proteínas} &= \frac{0.5525 \text{ mg proteínas}}{1 \text{ mL de dilución}} \times \frac{1 \text{ g proteínas}}{1000 \text{ mg proteínas}} \\ &\times \frac{10 \text{ mL de dilución}}{1 \text{ mL de extracto neutro}} \times \frac{39 \text{ mL de extracto neutro}}{31 \text{ mL de extracto alcalino}} \\ &\times \frac{500 \text{ mL de extracto alcalino}}{33.3366 \text{ g de BSG}} \times 100 = 10.43\% \text{ de proteínas} \end{aligned}$$

Análisis de varianza (ANOVA).

Para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos de extracción de proteínas a los que fue sometido el BSG, se realizaron 5 observaciones para cada nivel (tratamiento de extracción), en total se analizaron 4 niveles. Los datos pueden visualizarse en la *Tabla A2-1*.

Tabla A2-1. Datos del porcentaje de proteínas extraídas del BSG para cada método de extracción.

Tratamiento	Concentración		De		Proteínas (%m/v)	
	Hidrotermal	Alcalino	Extrusión de doble tornillo	Ultrasonido		
	1.60	16.98	2.45	10.43		
	1.59	16.98	2.43	10.43		
	1.59	16.98	2.43	10.43		
	1.28	16.46	2.81	9.12		
	1.28	16.46	2.79	9.12		
	1.27	16.46	2.79	9.12		
	1.44	15.41	2.73	9.12		
	1.44	15.41	2.71	9.12		
	1.44	15.23	2.73	9.00		
Total (y _{i.})	12.92	146.37	23.87	85.88	269.03	y _{..}
Promedio (ȳ _{i.})	1.44	16.26	2.65	10.40	7.69	ȳ _{..}

El análisis de varianza (ANOVA) se empleó para probar la hipótesis nula (H₀) contra la hipótesis alternativa (H₁).

Donde H₀: μ₁=μ₂=μ₃=μ₄ (μ es la media); H₁: Alguna de las medias son diferentes.

Para el ANOVA, se requirió calcular las sumas de cuadrados con las siguientes ecuaciones:

Ecuación 14. Suma de cuadrados total (SS_T).

$$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n y_{ij}^2 - \frac{y_{..}^2}{N} = (1.60)^2 + (16.98)^2 + \dots + (2.73)^2 + (9.00)^2 - \frac{(269.03)^2}{36}$$

Ecuación 15. Suma de cuadrados debida a los tratamientos ($SS_{Tratamientos}$).

$$SS_{Tratamientos} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^a y_i^2 - \frac{y_{..}^2}{N} = \frac{1}{9} [(12.92)^2 + \dots + (85.88)^2] - \frac{(269.03)^2}{36}$$

Ecuación 16. Suma de cuadrados debida al error (SS_E).

$$SS_E = SS_T - SS_{Tratamientos}$$

Donde:

a = Número de tratamientos = 4

n = Número de observaciones = 9

N = Mediciones totales.

i = Tratamiento i-ésimo.

j = Observación j-ésima.

y_i = Suma total de las observaciones del tratamiento i.

\bar{y}_i = Promedio de las observaciones del tratamiento i.

$y_{..}$ = Suma de los totales.

$\bar{y}_{..}$ = Promedio de los promedios de las observaciones de cada tratamiento.

y_{ij} = Observación i-ésima tomada bajo el nivel del tratamiento i.

En la tabla A2-2 se resume el ANOVA, nótese que SS_T tiene N-1 grados de libertad debido a que hay N observaciones en total, $SS_{tratamientos}$ tiene a-1 grados de libertad debido a niveles (y medias de a tratamientos) y SS_E tiene n-1 grados de libertad debido a que hay n réplicas. Los cuadrados medios debidos al tratamiento y al error ($MS_{Tratamientos}$ y MS_E respectivamente) corresponden al cociente de la suma de

cuadrados entre sus respectivos grados de libertad. F_0 corresponde al cociente de $MS_{\text{Tratamientos}}$ entre MS_E , si H_0 es verdadera, tal cociente se distribuye como $F_{a-1, N-a}$, por lo tanto, H_0 deberá rechazarse si $F_0 > F_{\alpha, a-1, N-a}$.

Tabla A2-2. ANOVA de los datos de porcentaje de proteínas extraídas.

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F_0	$F_{0.05,3,32}$
Concentración de proteínas extraídas (% m/m)	1271.09	3	423.70	1670.96	19.46
Error (dentro de los tratamientos)	8.11	32	0.25		
Total	1279.21	35			

Entonces como $F_0 > F_{\alpha, a-1, N-a}$ con α igual 0.05 se rechaza H_0 . Esto quiere decir que hay medias diferentes y que los tratamientos extraen proteínas del BSG en diferentes proporciones.

Para determinar entre qué medias existe diferencia significativa, se compararon las medias por el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, en este procedimiento se emplea el estadístico F para probar si las medias son iguales o existe diferencia significativa, la LSD se calcula con la *Ecuación 17*, si el diseño es balanceado ($n_1=n_2=n_3=n_4$), se simplifica a la *Ecuación 18*.

Ecuación 17. LSD.

$$LSD = t_{\frac{\alpha}{2}, N-a} \sqrt{MS_E \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}$$

Donde n_i y n_j son los números de observaciones del tratamiento i y del tratamiento j respectivamente.

Ecuación 18. LSD para diseño balanceado.

$$LSD = t_{\frac{\alpha}{2}, N-a} \sqrt{\frac{2MS_E}{n}}$$

Entonces simplemente se compara el valor absoluto de la diferencia entre la media del tratamiento i y la media del tratamiento j con su LSD correspondiente, si $|\bar{y}_i - \bar{y}_j| > \text{LSD}$, se concluye que hay diferencia significativa entre las medias.

Para los tratamientos de extracción de proteínas, la LSD se obtuvo de la siguiente manera a partir de la *Ecuación 18*:

$$LSD = t_{\frac{0.05}{2}, 32} \sqrt{\frac{2(0.25)}{9}} = 0.48$$

La comparación de medias puede consultarse en la *Tabla A2-3*.

Tabla A2-3. Comparación de medias de los métodos de extracción.

	$ \bar{y}_i - \bar{y}_j $	Diferencia significativa
Alcalino vs Hidrotermal	14.83	Sí
Alcalino vs EDT	13.61	Sí
Alcalino vs Ultrasonido	5.86	Sí
Ultrasonido vs Hidrotermal	8.96	Sí
Ultrasonido vs EDT	7.75	Sí
EDT vs Hidrotermal	1.22	Sí

Con los resultados obtenidos, se pueden ordenar los métodos de extracción de proteínas del mejor (1°) al peor (4°), esto se muestra en la *Tabla A2-4*.

Tabla A2-4. Clasificación de los métodos de extracción.

Tratamiento	Clasificación
Alcalino	1°
Ultrasonido	2°
EDT	3°
Hidrotermal	4°

Anexo 3. Balances de materia y cálculos concernientes a la producción de proteínas.

1) Balances de materia.

Los balances de materia se realizaron solamente con la materia seca, así que utilizando los datos de la *Ilustración A3-1*, debe cumplirse la *Ecuación 19*.

Ecuación 19. Ecuación de los balances de materia.

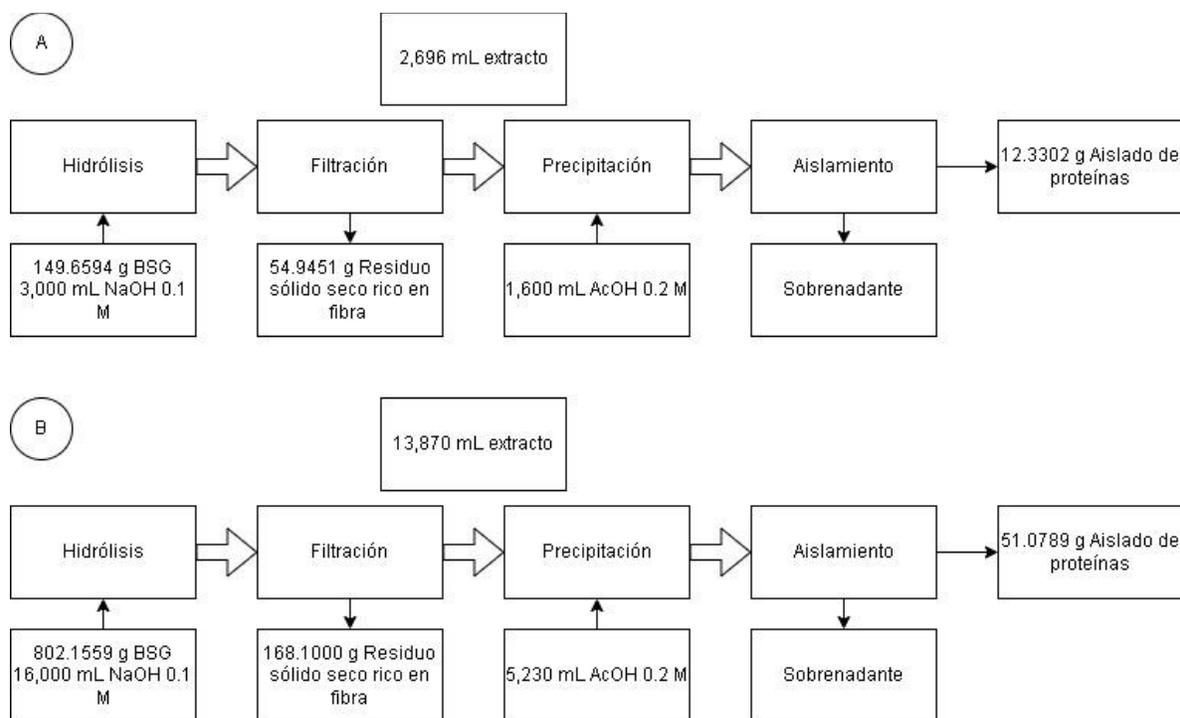


Ilustración A3-1. Balances de materia en la extracción de proteínas del BSG. A: Pequeña escala; B: Mayor escala.

Los “otros sólidos” corresponden a las sales, carbohidratos y demás compuestos del BSG que llegan a perderse durante el proceso o permanecen solubles en el sobrenadante.

Como en las ilustraciones, el NaOH y el AcOH se encuentran en solución, se deben calcular como sólidos con las siguientes ecuaciones:

Ecuación 20. Cálculo del NaOH sólido.

$$NaOH_{(s)} = V NaOH 0.1 M (L \text{ disolución}) \times \frac{0.1 \text{ mol NaOH}}{1 L \text{ disolución}} \times \frac{40 g NaOH}{1 \text{ mol NaOH}}$$

Ecuación 21. Cálculo del AcOH sólido.

$$AcOH_{(s)} = V AcOH 0.1 M (L \text{ disolución}) \times \frac{0.2 \text{ mol AcOH}}{1 L \text{ disolución}} \times \frac{40 g AcOH}{1 \text{ mol AcOH}}$$

Los datos obtenidos con las Ecuaciones 19, 20 y 21 para las producciones a pequeña y gran escala, se muestran en la Tabla A3-1.

Tabla A3-1. Datos de los balances de materia.

Producción	Pequeña escala (g)	Mayor escala (g)
BSG	149.6594 (82.75%)	802.1559 (86.35%)
NaOH sólido	12 (6.63%)	64 (6.89%)
AcOH sólido	19.2 (10.62%)	62.76 (6.76%)
Residuo sólido seco	54.9451 (30.38%)	168.1 (18.10%)
Aislado de proteínas	12.3302 (6.82%)	51.0789 (5.50%)
Otros sólidos	113.5841 (62.80%)	709.737 (76.40%)
Total en ambos lados de la igualdad	180.8594 (100%)	928.9159 (100%)

2) Determinación de fibra NDF en los residuos sólidos secos.

Para calcular la fibra NDF, primeramente, se calcularon los residuos sólidos utilizando la Ecuación 9 (Anexo 1), después se obtuvo el porcentaje de estos de manera similar a la Ecuación 12 (Anexo 1), por último, el resultado se corrige restando la cantidad de cenizas, las cuales se calcularon con la Ecuación 1. En la Tabla A3-2, se muestran los datos de las determinaciones.

Tabla A3-2. Datos de la determinación de fibra.

Producción	Pequeña escala	Mayor Escala
-------------------	-----------------------	---------------------

Masa de crisol (NDF)	45.3550	48.2968
Masa de crisol + fibra NDF	45.7407	48.7653
Masa del residuo sólido	0.3857	0.5901
Porcentaje de fibra	75.78%	79.39%
Masa del crisol (cenizas)	20.8143	21.2220
Masa de crisol + cenizas	20.8211	21.2317
Porcentaje de cenizas	1.76%	2.07%
Porcentaje de fibra corregido	74.02%	77.32%

3) Determinación de la pureza de los aislados de proteínas.

La determinación de pureza, parte de la *Ecuación 4 (Anexo 1)*.

a) Pequeña escala:

$$x = \frac{0.077 + 0.0068}{0.1589} = 0.5274 \text{ mg/mL}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Pureza} &= \frac{0.5274 \text{ mg de proteínas}}{1 \text{ mL de disolución}} \times \frac{10 \text{ mL de disolución}}{10 \text{ mg aislado de proteínas}} \times 100 \\ &= 52.74\% \text{ de pureza.} \end{aligned}$$

b) Mayor escala:

$$x = \frac{0.099 + 0.0068}{0.1589} = 0.6658 \text{ mg/mL}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Pureza} &= \frac{0.6658 \text{ mg de proteínas}}{1 \text{ mL de disolución}} \times \frac{10 \text{ mL de disolución}}{11 \text{ mg aislado de proteínas}} \times 100 \\ &= 60.53\% \text{ de pureza.} \end{aligned}$$

4) Determinación de las proteínas remanentes en los sobrenadantes.

De la misma manera que en los cálculos de pureza, las proteínas remanentes se determinaron partiendo de la *Ecuación 4 (Anexo 1)*.

a) Pequeña escala:

$$x = \frac{0.115 + 0.0068}{0.1589} = 0.7665 \text{ mg/mL}$$

% Proteínas remanentes

$$\begin{aligned} &= \frac{0.7665 \text{ mg de proteínas}}{1 \text{ mL de disolución}} \times \frac{1 \text{ g de proteínas}}{1000 \text{ mg de proteínas}} \times 100 \\ &= 0.08\% \text{ de proteínas remanentes.} \end{aligned}$$

b) Mayor Escala:

$$x = \frac{0.153 + 0.0068}{0.1589} = 1.0057 \text{ mg/mL}$$

$$\begin{aligned} \text{\% Proteínas remanente} &= \frac{1.0057 \text{ mg de proteínas}}{1 \text{ mL de disolución}} \times \frac{1 \text{ g de proteínas}}{1000 \text{ mg de proteínas}} \times 100 \\ &= 0.10\% \text{ de proteínas remanentes.} \end{aligned}$$

5) Rendimientos.

Para calcular el rendimiento del aislado de proteínas, se utilizó la siguiente ecuación:

Ecuación 22. Cálculo del porcentaje de rendimiento del aislado de proteínas.

$$\text{Rendimiento del aislado de proteínas} = \frac{\text{masa del aislado de proteínas}}{\text{masa del BSG}} \times 100$$

a) Pequeña escala:

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento del aislado de proteínas} &= \frac{12.3302 \text{ g de aislado de proteínas}}{149.6594 \text{ g de BSG}} \times 100 \\ &= 8.23\% \end{aligned}$$

b) Mayor escala:

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento del aislado de proteínas} &= \frac{51.0789 \text{ g aislado de proteínas}}{802.1559 \text{ g de BSG}} \times 100 \\ &= 6.37\% \end{aligned}$$

Anexo 4. Datos acerca de la impresión en 3D.

Tabla A4-1. Comparación entre las diferentes impresoras 3D comerciales.

<i>Marca y modelo.</i>	<i>Descripción del producto</i>	<i>Temperatura de trabajo</i>	<i>Costo (pesos mxn)</i>	<i>Enlace de Amazon</i>
<p><i>Comgrow Creality Ender 3</i></p> 	<p>Avanzada tecnología de extrusores: Reduce el riesgo de obstrucción y mala extrusión.</p> <p>Capacidad de reanudar la impresión ante cortes de energía.</p> <p>Plataforma de construcción de aluminio.</p> <p>Fuente de alimentación protegida de seguridad.</p>	<p>Boquilla: No especificada.</p> <p>Cama de calentamiento: Llega a 110°C en 5 minutos.</p>	4,665	<p>CCE3</p> 
<p><i>Comgrow Creality Ender 3 Pro</i></p>	<p>Mismo rendimiento y especificaciones que la Ender 3, con componentes actualizados que brindan mayor estabilidad, duración y facilidad de uso a la impresora.</p>	<p>Boquilla: No especificada.</p> <p>Cama de calentamiento:</p>	5,635	<p>CCE3P</p>



Anet ET5X



Plataforma de construcción de vidrio protegida por una placa de superficie CMagnet que le brinda seguridad.

Llega a 110°C en 5 minutos.

Fuente de alimentación Meanwell con certificación UL.



Impresión de objetos grandes (hasta 300x300x400 mm).

Boquilla: 4,999
Hasta 250°C.

[AET5X](#)

Nivelación automática matricial.

Cama de calentamiento:
Hasta 100°C.

Reanudación automática de la impresión ante falta de material o cortes de energía.



Pantalla táctil LCD a color, permite el fácil control del movimiento, nivelación e impresión en los ejes x, y, z.

Operación estable y de fácil precisión. Protección térmica contra fugas, se apaga automáticamente al no detectar la temperatura en un periodo de tiempo.

Artillery Hornet



Impresión de alta precisión.

Plataforma de construcción de vidrio templado recubierta con una cama de calefacción de aluminio.

Impresión de objetos de hasta 220x220x250 mm.

Interruptor integrado de perilla de una sola tecla.

Boquilla:180-240°C.

Cama de calentamiento:
No especificada.

4,948

[AH](#)



Monoprice Select – Mini v2



Imprime materiales básicos como PLA o ABS, materiales más avanzados como PLA conductor, madera, metal, etc.

Compacta con impresión de objetos de hasta 100x100x100.

Se envía completamente ensamblada.

Cama de calefacción de aluminio.

Pantalla LCD con perilla de fácil manipulación.

Boquilla:
Hasta 250°C.

Cama de calentamiento:
Hasta 100°C.

4,848

[MPSMV2](#)



Kingroon KP3S



Resistencia al desgaste durante la impresión a largo plazo. Una vez que la impresión termina, la boquilla cae por debajo de los 50°C, los ventiladores de refrigeración dejarán de funcionar, ahorrando energía y aumentando la vida útil.

Impresión de alta precisión.

Fuente de alimentación segura y estable.

Plataforma de impresión con una lámina de fibra de vidrio reemplazable con una superficie de policarbonato mate.

Reanudación automática de la impresión ante falta de material o cortes de energía.

Resistente al agua.

Reanudación automática de la impresión ante falta de material o cortes de energía.

Impresión de objetos de hasta 220x220x250 mm.

Reduce el riesgo de obstrucción de la boquilla.

Boquilla: No especificada.
Cama de calentamiento: 100°C en 3 minutos.

5,074

[KP3S](#)



SainSmart X Creality Ender-3



Resistente al agua.

Reanudación automática de la impresión ante falta de material o cortes de energía.

Impresión de objetos de hasta 220x220x250 mm.

Reduce el riesgo de obstrucción de la boquilla.

Boquilla: No especificada.

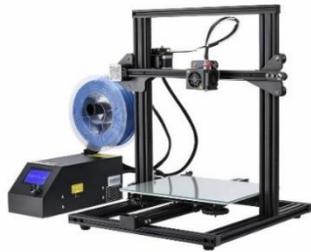
Cama de calentamiento: Llega a 110°C en 5 minutos.

5,837

[SSXCE3](#)



Crealty CR-10 Mini



Reanudación automática de la impresión ante falta de material o cortes de energía.

Plataforma de construcción de vidrio templado y aluminio diseñada para duración por años.

Impresión de objetos de hasta 300x220x300 mm.

Pantalla LCD con control de perilla de aviación.

Boquilla: 5,766
Hasta 250°C.

Cama de calentamiento:
Hasta 100°C.

[CR10M](#)



VOXELAB Aquila X2



Impresión de alta precisión.

Fácil nivelación de la cama de calentamiento.

Plataforma de impresión de vidrio de silicona de cristal de carbono.

Impresión de objetos de hasta 220x220x250 mm.

Reanudación automática de la impresión ante falta de material o cortes de energía.

Pantalla LCD con perilla.

Boquilla: 5,759
Hasta 250°C.

Cama de calentamiento:
Hasta 110°C
en 5 minutos.

[VAX2](#)



La Tablas A4-1 sirvió como un marco de referencia para adquirir la impresora 3D en la tienda en línea de Amazon, primeramente, se eligió la impresora Anet ET5X debido a sus funciones modernas como el nivelado automático, el panel de control con pantalla táctil, grandes dimensiones de impresión y sus sensores térmicos, con un precio bastante accesible, sin embargo, el distribuidor envió una impresora Anet ET5 Pro, una impresora con funciones similares a la Anet ET5X. El problema llegó cuando a la segunda impresión le fallaron los sensores, por lo cual se realizó la devolución con su respectivo reembolso. Entonces después se optó por adquirir la MONOPRICE Select-Mini V2, pues a pesar de sus limitadas dimensiones de impresión, es una impresora compacta, fácil de manipular y tiene la capacidad de imprimir materiales distintos al PLA, lo último fue lo más atractivo, pues se buscaba una impresora que pudiera adaptarse a la impresión de alimentos, otra ventaja atractiva fue su precio aún más accesible a comparación de la mayoría de las impresoras mostradas en la tabla antes mencionada.

Ecuaciones para comprender la fuerza que debe aplicarse a un material para extruirlo a través de la boquilla en una impresora 3D:

Ecuación 23. Cálculo de la velocidad de corte en boquillas circulares (Anguita, 1977).

$$\sigma = \frac{4Q_0}{\pi R^3}$$

Donde:

σ : Velocidad de corte.

Q_0 : Flujo del material.

R: Radio de la boquilla.

π : 3.1416.

Ecuación 24. Cálculo del flujo del material en boquillas circulares (Anguita, 1977).

$$Q_0 = \frac{\pi R^4}{8L} \times \frac{\Delta P}{\eta}$$

Donde:

Q_0 : Flujo del material.

R: Radio de la boquilla.

π : 3.1416.

L: Longitud de la boquilla.

ΔP : Caída de presión.

Despejando la *Ecuación 24*, puede obtenerse la *Ecuación 25*.

Ecuación 25. Cálculo de la caída de presión.

$$\Delta P = \frac{Q_0 \eta 8L}{\pi R^4}$$

La aplicación de los cálculos se ejemplificó con la formulación constituida por alginato-almidón-aislado de proteínas, comparando los diámetros de boquilla 0.4 mm, 1 mm y 2 mm. Se consideró que el material tuvo un flujo de 2.5 mL (cm^3) en 5 min. Antes de calcular la velocidad de corte, se realizaron las siguientes conversiones de unidades:

$$Q_0 = \frac{2.5 \text{ cm}^3}{5 \text{ min}} \times \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ s}} = 8.33 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{s}$$

$$R = \frac{D \text{ mm}}{2} \times \frac{1 \text{ cm}}{10 \text{ mm}}$$

Empleando la *Ecuación 23*, se tiene que:

$$\sigma_{0.4} = \frac{4(8.33 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{s})}{\pi \left(\frac{0.04}{2} \text{ cm}\right)^3} = 1325.7607 \text{ s}^{-1} \times \frac{60 \text{ rpm}}{1 \text{ s}^{-1}} = 79595.6406 \text{ rpm}$$

$$\sigma_1 = \frac{4(8.33 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{s})}{\pi(\frac{0.1}{2} \text{ cm})^3} = 84.8487 \text{ s}^{-1} \times \frac{60 \text{ rpm}}{1 \text{ s}^{-1}} = 5090.9220 \text{ rpm}$$

$$\sigma_2 = \frac{4(8.33 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{s})}{\pi(\frac{0.2}{2} \text{ cm})^3} = 10.6061 \text{ s}^{-1} \times \frac{60 \text{ rpm}}{1 \text{ s}^{-1}} = 636.3660 \text{ rpm}$$

Se puede concluir que, a menor diámetro de la boquilla, se requiere una mayor velocidad de cizalla para extruir el material a través de la boquilla.

Para calcular la caída de presión, se consideró la viscosidad a 100 rpm (ver *Tabla 23*) para poder comparar entre los 3 diámetros de boquilla, la longitud de las boquillas fue de 1.3 cm, antes del cálculo de la caída de presión, se realizó la siguiente conversión:

$$\eta_{100 \text{ rpm}} = 4290 \text{ cP} \times \frac{1 \text{ Kg}_f \cdot \text{s}/\text{cm}^2}{9806.65 \text{ cP}} = 0.4375 \text{ Kg}_f \cdot \text{s}/\text{cm}^2$$

Empleando la *Ecuación 25* se tiene que:

$$\Delta P_{0.4} = \frac{(8.33 \times 10^{-3} \frac{\text{cm}^3}{\text{s}})(0.4375 \text{ Kg}_f \cdot \frac{\text{s}}{\text{cm}^2})(8 \cdot 1.3 \text{ cm})}{\pi(\frac{0.04}{2} \text{ cm})^4} = 75399.6543 \text{ Kg}_f/\text{cm}^2$$

$$\Delta P_1 = \frac{(8.33 \times 10^{-3} \frac{\text{cm}^3}{\text{s}})(0.4375 \text{ Kg}_f \cdot \frac{\text{s}}{\text{cm}^2})(8 \cdot 1.3 \text{ cm})}{\pi(\frac{0.1}{2} \text{ cm})^4} = 1930.2312 \text{ Kg}_f/\text{cm}^2$$

$$\Delta P_2 = \frac{(8.33 \times 10^{-3} \frac{\text{cm}^3}{\text{s}})(0.4375 \text{ Kg}_f \cdot \frac{\text{s}}{\text{cm}^2})(8 \cdot 1.3 \text{ cm})}{\pi(\frac{0.2}{2} \text{ cm})^4} = 120.6394 \text{ Kg}_f/\text{cm}^2$$

Se puede concluir que, a menor diámetro de la boquilla, se requiere mayor fuerza para la extrusión del material a través de la boquilla.

Referencias.

- Aggelopoulos, T., Bekatorou, A., Plessas, S., Koutinas, A., & Nigam, P. (2018). Upgrading of Mixed Food Industry Side-Streams by Solid-State Fermentation with *P. ostreatus*. *Recycling*, 3(2), 12–0.
- Álvarez-Viñas, M., Rodríguez-Seoane, P., Flórez-Fernández, N., Torres, M. D., Díaz-Reinoso, B., Moure, A., & Domínguez, H. (2021). Subcritical Water for the Extraction and Hydrolysis of Protein and Other Fractions in Biorefineries from Agro-food Wastes and Algae: a Review. *Food & Bioprocess Technology*, 14(3), 373–387.
- Amazon [tienda en línea]. Disponible en: <https://www.amazon.com.mx/>
- Anguita, R. (1977). *Biblioteca de los polímeros. Ciencia, materiales, tecnología*. Primera edición. Madrid: H. Blume Ediciones. PP. 215-220.
- Badui, S. (2013). *Química de los alimentos*. Quinta edición. Estado de México: Pearson Educación. PP. 95-96, 181.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. Fourth edition. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. PP 8-9.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyebinding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- Candoğan, K., & Bulut, E. (2021). 3D Gıda Baskısı: Güncel Durum Ve Gelecek Eğilimleri. *GIDA / The Journal of FOOD*, 46(1), 152–167.
- Capellini, M., Giacomini, V., Cuevas, M., & Rodrigues, C. (2017). Rice bran oil extraction using alcoholic solvents: Physicochemical characterization of oil and protein fraction functionality. *Industrial Crops & Products*, 104, 133–143.
- Celus, I., Brijs, K., Delcour, J. (2007). Hidrólisis enzimática de las proteínas de grano gastadas de los cerveceros y propiedades tecnofuncionales de los hidrolizados resultantes. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8703–8710.

Colas, D., Doumeng, C., Pontalier, P. Y., & Rigal, L. (2013). Twin-screw extrusion technology, an original solution for the extraction of proteins from alfalfa (*Medicago sativa*). *Food and Bioproducts Processing*, 91(2), 175–182.

Contreras, M. del M., Lama-Muñoz, A., Manuel Gutiérrez-Pérez, J., Espínola, F., Moya, M., & Castro, E. (2019). Protein extraction from agri-food residues for integration in biorefinery: Potential techniques and current status. *Bioresource Technology*, 280, 459–477.

Cortés, W. (2014). Tratamientos Aplicables a Materiales Lignocelulósicos para la Obtención de Etanol y Productos Químicos. *Revista de Tecnología*, 13 (1). 39-44.

Du L., Arauzo P., Meza-Zavala M., Cao Z., Olszewski M., Kruse A. (2020). Towards the Properties of Different Biomass-Derived Proteins via Various Extraction Methods. *Molecules*. 25(3). 488.

Eskin, M., & Shahidi, F. (2013). *Biochemistry of foods*. Third edition. Elsevier Inc. Pág. 12.

Evon, P., Vandebossche, V., Candy, L., Pontalier, P.-Y., and Rouilly, A. (2018). Twin-screw extrusion: a key technology for the biorefinery. In: Biomass extrusion and reaction technologies: principles to practices and future potential. (ACS Symposium Series eBooks). *ACS Publications*, 25-44.

Ferreira, A (2017). Biorefinery Concept. In *Biorefineries Targeting Energy, High Value Products. and Waste Valorisation*. Springer. PP. 2-4.

Fetzer, A., Herfellner, T., Stäbler, A., Menner, M., & Eisner, P. (2018). Influence of process conditions during aqueous protein extraction upon yield from pre-pressed and cold-pressed rapeseed press cake. *Industrial Crops & Products*, 112, 236–246.

Forbes Staff (2021, 4 de marzo). Exportación de cerveza mexicana cae 6.2% y producción 4.7% en 2020 [en línea]. *Forbes México*. Recuperado el 5 de agosto de 2021 de: <https://www.forbes.com.mx/exportacion-de-cerveza-nacional-cae-6-2-y-produccion-4-7-en-2020/>

Gálvez, A., Flores, I. & González, A. (2013). Proteínas. En *Química de los alimentos*. Quinta edición. Estado de México: Pearson Educación. PP. 95-96.

García, J. (2021, 17 de enero). Exportación, reto para 2021: cerveceros [en línea]. *La Jornada*. P. 17. Recuperado el 5 de agosto de 2021 de: <https://www.jornada.com.mx/notas/2021/01/17/economia/exportacion-reto-para-2021-cerveceros/>

Gervasi, T., Pellizzeri, V., Calabrese, G., Bella, G. di, Cicero, N., & Dugo, G. (2018). Production of single cell protein (SCP) from food and agricultural waste by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Natural Product Research*, 32(6), 648–653.

Glazer, A., & Nakaido, H. (2007). *Microbial Biotechnology Fundamentals of Applied Microbiology*. Second edition. New York: Cambridge. PP. 64-67.

He, Y., Kuhn, D., O’Keefe, S., Ogejo, J., Fraguas, C., Wang, H. & Huang H. (2021). Protein production from brewer’s spent grain via wet fractionation: process optimization and techno-economic analysis. *Food and Bioproducts Processing*, 126, 234–244.

Hojilla-Evangelista, M., Selling, G., Hatfield, R., & Digman, M. (2017). Extraction, composition, and functional properties of dried alfalfa (*Medicago sativa* L.) leaf protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3), 882–888.

Hou, Y., Wu, Z., Dai, Z., Wang, G. y Wu, G. (2017). Hidrolizados de proteínas en la nutrición animal: producción industrial, péptidos bioactivos e importancia funcional. *Revista de Ciencia Animal y Biotecnología*, 8 (1), 24.

Hussain, S., Arora, V., & Malakar, S. (2021). Formulation of protein-enriched 3D printable food matrix and evaluation of textural, rheological characteristics, and printing stability. *Journal of Food Processing & Preservation*, 45(2), 1–11.

Ikram, S., Huang, L., Zhang, H., Wang, J., & Yin, M. (2017). Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain. *Journal of Food Science*, 82(10), 2232–2242

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) (2021). *Colección de estudios sectoriales y regionales. Conociendo la Industria de la cerveza*. México. P. 12.

IR Spectrum Table & Chart [en línea]. *Merck, Sigma-Aldrich*. Recuperado del 3 de abril de 2022 de: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table>

Jaeger, A., Zannini, E., Sahin, A., & Arendt, E. (2021). Barley Protein Properties, Extraction and Applications, with a Focus on Brewers' Spent Grain Protein. *FOODS*, 10(6), 1389.

Jagadiswaran, B., Alagarasan, V., Palanivelu, P., Theagarajan, R., Moses, J., & Anandharamakrishnan, C. (2021). Valorization of food industry waste and by-products using 3D printing: A study on the development of value-added functional cookies. *Future Foods*, 4(100036-).

James, C. (1999). *Analytical Chemistry of Foods*. Second Edition. New York: ASPEN Publishers.

Janson, J.-C. (2011). *Protein Purification. Principles, High Resolution Methods, and Applications*. Third edition. New Jersey: Wiley. PP. 4-16.

Jiang, H., Zheng, L., Zou, Y., Tong, Z., Han, S., & Wang, S. (2019). 3D food printing: main components selection by considering rheological properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(14), 2335–2347.

Kumar, M., Tomar, M., Potkule, J., Verma, R., Punia, S., Mahapatra, A., Belwal, T., Dahuja, A., Joshi, S., Berwal, M., Satankar, V., Bhoite, A., Amarowicz, R., Kaur, C., & Kennedy, J. (2021). Advances in the plant protein extraction: mechanism and recommendations. *Food Hydrocolloids*, 115, 106595.

Li, W., Yang, H., Coldea, T., & Zhao, H. (2021). Modification of structural and functional characteristics of brewer's spent grain protein by ultrasound assisted extraction. *LWT*, 139.

Lipton, J., Arnold, D., Nigl, F., Lopez, N., Cohen, D., Norén, N., & Lipson, H. (2010). Impresión multimaterial de alimentos con estructura interna compleja apta para post-procesamiento convencional. *Simposio de fabricación de forma libre sólida*, (Vol. 9, pp. 809 – 815).

Mahan, K. M., Le, R. K., Wells, T., Anderson, S., Yuan, J. S., Stoklosa, R. J., Bhalla, A., Hodge, D. B., & Ragauskas, A. J. (2018). Production of single cell protein from agro-waste using *Rhodococcus opacus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 45(9), 795–801.

Mechmeche, M., Kachouri, F., Chouabi, M., Ksontini, H., Setti, K., & Hamdi, M. (2017). Optimization of Extraction Parameters of Protein Isolate from Tomato Seed Using Response Surface Methodology. *Food Analytical Methods*, 10(3), 809–819.

Mejías, N., Orozco, E., & Galáan, N. (2016). Aprovechamiento de los residuos agroindustriales y su contribución al desarrollo sostenible de México. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*, 2. 27-41.

Montgomery D. (2004). Diseño y análisis de experimentos. Segunda Edición. Distrito Federal: Editorial Limusa. PP. 63-70,

Nielsen, S. (2017). *Food Analysis Laboratory Manual*. Third Edition. Indiana: Springer Nature, PP. 111, 118, 119, 123, 138, 139, 140.

Parchami, M., Ferreira, J., & Taherzadeh, M. (2021). Starch and protein recovery from brewer's spent grain using hydrothermal pretreatment and their conversion to edible filamentous fungi – A brewery biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 337.

Pérez, B., Nykvist, H. Brøgger, A., Larsen, M., & Falkeborg, M. (2021). Impact of macronutrients printability and 3D-printer parameters on 3D-food printing: A review. *Food Chemistry*, 287, 249–257.

Pimentel, M. (2013). *Pretratamiento de residuos lignocelulósicos mediante expansión de dióxido de carbono en estado supercrítico*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Phongthai, S., Lim, S.-T., & Rawdkuen, S. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of rice bran protein and its hydrolysates properties. *Journal of Cereal Science*, 70, 146–154.
- Pojić, M., Mišan, A., & Tiwari, B. (2018). Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 93–104.
- Qin, F., Johansen, A., & Mussatto, S. (2018). Evaluation of different pretreatment strategies for protein extraction from brewer's spent grains. *Industrial Crops & Products*, 125, 443–453.
- Riaño, A., Sanz, M., Román, B., Beltrán, S., & Trigueros, E. (2021). Subcritical water as hydrolytic medium to recover and fractionate the protein fraction and phenolic compounds from craft brewer's spent grain. *Food Chemistry*, 351.
- Rommi, K., Niemi, P., Kemppainen, K., & Kruus, K. (2018). Impact of thermochemical pre-treatment and carbohydrate and protein hydrolyzing enzyme treatment on fractionation of protein and lignin from brewer's spent grain. *Journal of Cereal Science*, 79, 168–173.
- Sahin, S. & Gülüm, S. (2006). *Physical Properties of Foods*. Ankara: Springer. PP. 39-46.
- Sharif, M., Zafar, M., Aqib, A., Saeed, M., Farag, M., & Alagawany, M. (2021). Single cell protein: Sources, mechanism of production, nutritional value and its uses in aquaculture nutrition. *Aquaculture*, 531.
- Singhal, S., Rasane, P., Kaur, S., Garba, U., Bankar, A., Singh, J., & Gupta, N. (2020). 3D food printing: paving way towards novel foods. *ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIENCIAS*, 92(3).
- Stoffel, F., Santana, W. de O., Fontana, R., & Camassola, M. (2021). Use of *Pleurotus albidus* mycoprotein flour to produce cookies: Evaluation of nutritional enrichment and biological activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 68.

Sun, J., Zhou, W., Yan, L., Huang, D. & Lin, L. (2018). Extrusion-based food printing for digitalized food design and nutrition control. *Journal of Food Engineering*, 220:1–11.

Técnicas de muestra de FTIR: reflexión total atenuada (ATR) [en línea]. *ThermoFisher Scientific*. Recuperado el 12 de agosto de 2022 de: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-techniques-attenuated-total-reflection-atr.html>

Wang, W., De Dios Alché, J., & Rodríguez-García, M. (2007). Characterization of olive seed storage proteins. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(5), 439–444.