



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y
NATURALES Y AGRIMENSURA**

**PROPIEDADES FUNCIONALES DE
PROTEINAS DE AMARANTO.
CAPACIDAD DE GELIFICACION.**

MARIA VICTORIA AVANZA

2006

Director:

Dra. María Cristina Añón

Co-Director:

Dr. Angel V. Fusco

Lugar de Trabajo:

Laboratorio de Tecnología Química de la FACENA (UNNE)

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos
(CIDCA). UNLP-CONICET.

Trabajo de Tesis
presentado para optar al Grado Académico de Doctor
de la Universidad Nacional del Nordeste
Especialidad Química
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Cristina Añón, por darme la oportunidad de realizar esta tesis bajo su dirección y brindarme su valiosa experiencia y calidez humana.

Al Dr. Angel Fusco por el permanente apoyo recibido durante estos años.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-UNLP), donde se realizó una parte importante de los experimentos que conforman esta tesis.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la UNNE por brindarme la posibilidad de realizar este doctorado y por la sólida formación académica recibida durante mi carrera de grado.

A la Universidad Nacional del Nordeste (Secretaría General de Ciencia y Técnica), por haberme otorgado las becas que hicieron posible la realización de este trabajo.

A la Dra. María Cecilia Puppo del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-UNLP) por su valioso aporte en la realización de ensayos y su correspondiente interpretación de los fenómenos reológicos.

A la Dra. Ana Pilosof de la Facultad de Ciencias Exactas de la UBA por haberme permitido utilizar el equipamiento necesario para parte de esta tesis.

A mis padres, esposo, hija y hermanas, quienes me apoyaron y alentaron en este trabajo.

A Guadalupe y Paula por su amistad y valiosa colaboración recibida durante estos años.

A mis compañero/as del laboratorio de Proteínas del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-UNLP) por el afecto recibido durante mis estadías en dicho laboratorio.

A mis compañero/as del laboratorio de Tecnología Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la UNNE por el apoyo recibido durante el desarrollo de este trabajo.

Como resultado de esta tesis se han publicado, hasta el momento, los siguientes trabajos:

Avanza, M V.; Puppo, M. C. y Añón M. C. Structural Characterization of Amaranth Protein Gels. *Journal of Food Science*, 70, (3), E 223-229.

Avanza, M V.; Puppo, M. C. y Añón M. C. Rheological Characterization of Amranth Protein Gels. *Food Hydrocolloids*, 19, (5), 889-898.

Avanza, M V. y Añón M. C. Effect of thermal treatment on the proteins of amaranth isolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Aceptado para publicar: (referencia:JSFA-05-0034.R1).

RESUMEN

Desde hace más de 10 años el grupo de trabajo de Proteínas, del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), realiza estudios sobre proteínas de amaranto. Durante este período se han analizado las características estructurales y fisicoquímicas así como las propiedades funcionales de las diferentes fracciones de proteínas presentes en el grano y aislados proteicos que contienen estas fracciones en diferentes proporciones.

Existen distintas especies de *Amaranthus* que se caracterizan por una elevada producción de granos cuyo contenido proteico oscila entre 14 y 19% -mayor que el de los cereales-, de muy buena calidad nutricional (Teutóneo y Knorr, 1985; Bressani, 1989). En el grano de amaranto el 65 % de las proteínas se localizan en embrión y el resto en endosperma, en ambos tejidos se encuentran cuerpos proteicos con forma y tamaño diferente (Coimbra y Salema, 1994). Las principales fracciones proteicas presentes son albúminas (49-65 %), globulinas (22-42 %) y glutelinas (14-18 %) (Segura Nieto y col., 1994). Estas proteínas, dado su buen balance aminoácidos, son objetos muy atractivos desde el punto de vista nutricional, capaces de complementar proteínas de otras fuentes como cereales, leguminosas y oleaginosas. Las mismas podrían ser incluidas en la alimentación humana bajo la forma de harinas, concentrados y/o aislados proteicos.

En bibliografía existe información sobre la preparación de concentrados (Soriano-Santos y Córdoba Salgado, 1995; Bejosano y Corke, 1998a) y aislados (Paredes-López y col., 1988; Soriano-Santos y Córdoba Salgado, 1995; Martínez y Añón, 1996) los cuales podrían ser empleados como ingredientes alimentarios, en la medida que posean propiedades funcionales adecuadas.

Hasta el presente las propiedades fisicoquímicas de los aislados proteicos de amaranto y sus fracciones han sido las más estudiadas (Bressani y García-Vela, 1990, Martínez y Añón, 1996, Martínez y col., 1997, Castellani y col., 1998, 1999, Marcone y col., 1998 a, b), existiendo información disponible más reducida sobre las propiedades funcionales de estos aislados (Singhal y Kulkarni, 1991). Así por ejemplo, Konishi y Yoshimoto (1989) han observado un incremento en la actividad emulsificante de globulinas de amaranto solubles en soluciones salinas tratadas térmicamente, lo cual está de acuerdo con el aumento de su hidrofobicidad superficial. Por otra parte, Marcone y Kakuda (1999) detectaron una alta capacidad espumante y actividad emulsificante para aislados de globulinas de amaranto en el rango de pH 3-9.

Es sabido que existe una relación entre la estructura y las propiedades funcionales de una proteína dada (Damodoran, 1989), y que la conformación proteica es afectada por

variables del medio tales como, temperatura, pH, fuerza iónica, tratamiento térmico, siendo este último proceso utilizado con asiduidad en la industria de alimentos.

Sobre la base de estudios previos realizados en nuestro laboratorio, donde se demostró que las condiciones de preparación de los aislados proteicos de amaranto, en particular el pH de extracción y de precipitación de las proteínas, conducía a productos de diferente composición y características estructurales (Martínez y Añón, 1996); seleccionamos para este trabajo dos condiciones de extracción de las proteínas, pH 9 y 11, seguida por una precipitación a pH 5. Estos aislados los denominamos A9 y A11. El aislado A9 contiene las fracciones globulina-P, globulina IIS y albúminas mientras que el aislado A11 está formado principalmente por las fracciones globulina IIS y glutelinas (Martínez y Añón, 1996). Ambos aislados fueron sometidos a tratamiento térmico suave y drástico (70 y 90 °C de 3 a 30 minutos, respectivamente), y posteriormente se analizaron las modificaciones estructurales sufridas por los mismos, así como su solubilidad en agua.

Los ensayos calorimétricos realizados revelaron una disminución de la entalpía de desnaturalización del orden del 30 y 80 % para A9 tratado a 70 y 90 °C, respectivamente y de 30 y 55 % para A11, en iguales condiciones. También se pudo observar un incremento de la temperatura de desnaturalización (Td), respecto al aislado sin calentar, en los aislados tratados térmicamente, principalmente en A9 a 90 °C. La disminución de la entalpía y el aumento de la temperatura de desnaturalización indican que hubo un cambio conformacional que condujo a una estructura molecular desordenada y a la formación de agregados estabilizados por interacciones hidrofóbica. Este último hecho es sugerido por la alta estabilidad térmica que presentan las proteínas tratadas térmicamente, principalmente las del aislado A9.

Mediante electroforesis desnaturalizante se determinó que los agregados de alta masa molecular formados como consecuencia de los tratamientos térmicos realizados, tanto en A9 como en A11, estarían constituidos principalmente por los polipéptidos de 56 y 52 kD. A su vez la agregación se vería acompañada por una disociación de la subunidad AB con la liberación de los polipéptidos A (34–29 kD) y B (22–18 kD). Las especies polipeptídicas presentes en los agregados estarían estabilizadas por uniones covalentes -puentes disulfuro- y no covalentes -puentes hidrógeno e interacciones hidrofóbicas-. Los agregados formados fueron más evidentes en el aislado A11 que en aislado A9 a las dos temperaturas estudiadas (70 y 90 °C).

Las técnicas de espectroscopia ultravioleta y de fluorescencia en el ultravioleta nos permitieron evaluar los cambios sufridos por las proteínas, tratadas térmicamente, al nivel

de la estructura terciaria. Los progresivos corrimientos de la λ máxima de los picos hacia el azul en los espectros de absorción UV y hacia el rojo en los espectros de emisión de fluorescencia, observados en las dispersiones de los aislados A9 y A11 tratados térmicamente, indicaron la modificación en el grado de plegamiento de las proteínas, principalmente en el aislado A9 tratado a 90 °C. Esto concuerda con la alta estabilidad térmica que presentan las especies proteicas que constituyen el aislado A9, lo cual se demostró en los ensayos calorimétricos. El incremento de la absorbancia en el espectro UV y la disminución de la intensidad de fluorescencia, con el aumento del tiempo de calentamiento, es consecuencia de una mayor exposición al medio de los residuos aromáticos. Este comportamiento se evidenció a las dos temperaturas ensayadas (70 y 90 °C), pero a 90 °C los valores de absorbancias e intensidades de fluorescencia fueron menores que a 70 °C, lo cual estaría indicando la existencia de reacciones de agregación que llevan al ocultamiento de los grupos aromáticos inicialmente expuestos. Mediante estos ensayos espectroscópicos se demostró que las fuerzas responsables de la estabilización de los agregados serían interacciones hidrofóbicas y uniones disulfuro.

La espectroscopia FT-Raman nos permitió analizar los cambios estructurales asociados al calentamiento al nivel de la estructura secundaria de las proteínas presentes en ambos aislados. Los aislados A9 y A11 presentaron una banda Amida III bien resuelta entre 1300 y 1200 cm^{-1} . A9 mostró un hombro importante a 1234 cm^{-1} correspondiente a una conformación β típica de globulinas, en tanto que el aislado A11 presentó un máximo centrado en 1246 cm^{-1} , correspondiente a una estructura desordenada. Al aumentar la temperatura y el tiempo de calentamiento se observó, en ambos aislados, inicialmente un cambio estructural hacia una estructura más desordenada y luego hacia una conformación β . La exposición de grupos hidrofóbicos por el tratamiento térmico produjo agregados estabilizados por uniones disulfuro, en donde se observa un predominio de estructura hoja plegada β (β -sheet).

El efecto térmico produjo una disminución de la solubilidad de las muestras, la cual fue máxima para el aislado A9 tratado a 90 °C durante 30 minutos (40 % de solubilidad); en cambio en el aislado A11 la pérdida fue mínima, lo que sugiere que el aislado A11 es menos sensible al tratamiento térmico, probablemente debido al efecto del pH de extracción.

Estudios previos llevados a cabo por diferentes investigadores han demostrado la importancia de la superficie hidrofóbica en las propiedades hidrodinámicas, como la

solubilidad en proteínas de la soja, leche y carne (Li-Chan y col. 1984; Hayakawa y Nakai, 1985; Nakai y col. 1986). La relación entre la solubilidad y la superficie hidrofóbica, refuerza la importancia de las interacciones hidrofóbicas en el proceso de agregación de las proteínas de soja (Wagner y col., 2000). En ambos aislados, A9 y A11, se observó un aumento de la hidrofobicidad y una disminución de la solubilidad de las proteínas con el tratamiento térmico, siendo estos efectos más evidentes a 90 °C. Este comportamiento indicaría que los residuos hidrofóbicos ocultos se exponen por efecto del tratamiento térmico y luego por medio de interacciones hidrofóbicas participan en la formación de agregados. Cabe señalar sin embargo, que no necesariamente una mayor hidrofobicidad proteica implica menor solubilidad. Esto se pudo comprobar en los primeros minutos de tratamiento térmico a 70 °C, y a tiempos prolongados a 90 °C donde se detectó baja hidrofobicidad y solubilidad, principalmente en el aislado A11. Esto último estaría relacionado con la formación de agregados de las diferentes proteínas que permanecen solubles en cada condición, los cuales estarían estabilizados por interacciones hidrofóbicas.

Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento térmico de los aislados conduce a una desnaturalización y agregación de las proteínas presentes en los mismos; efectos dependientes de las condiciones tiempo-temperatura empleadas y del tipo de proteínas presentes.

A efectos de evaluar la incidencia de albúminas y globulinas, fracciones mayoritarias de la harina de amaranto, en el comportamiento de los aislados proteicos las mismas fueron sometidas a tratamientos térmicos equivalentes a los ya discutidos. Basándose en esto analizamos las relaciones existentes entre las características estructurales de estas fracciones tratadas térmicamente y la capacidad de gelificación de los aislados proteicos de amaranto.

La composición polipeptídica de la fracción total de albúminas y globulinas es similar a la de sus fracciones solubles respectivas no tratadas térmicamente, y concuerda con lo informado por Martínez (1997). En el caso de la fracción globulina, como consecuencia del tratamiento térmico, se observó la formación de agregados insolubles y solubles de alta masa molecular, estabilizados por uniones covalentes y no-covalentes. En cambio en la fracción de albúminas la formación de dichos agregados fue mucho menor y los mismos estarían estabilizados principalmente por interacciones hidrofóbicas y puente hidrógeno. Este efecto condujo a la disminución de la solubilidad de ambas proteínas, la cual fue más evidente cuando el tratamiento térmico se efectuó a mayor temperatura y durante tiempos prolongados.

El proceso de desnaturalización fue acompañado por cambios al nivel de la estructura cuaternaria y terciaria de las proteínas presentes en ambas fracciones, tal como lo indicaron los ensayos de absorción UV y espectroscopia de fluorescencia realizados. Las globulinas experimentaron un mayor desplegamiento que las albúminas con el tratamiento térmico, principalmente a 90 °C. Las albúminas mostraron una menor estabilidad térmica que las globulinas, comportamiento que se podría atribuir a una diferencia en la composición de aminoácidos aromáticos y estructura de dichas fracciones. La fracción globulina posee un menor contenido de aminoácidos aromáticos los cuales estarían próximos unos de otros y no distantes o móviles como en el caso de las albúminas. Es por ello que los cambios en la estructura molecular serían más evidentes en la fracción globulinas.

Basándose en los resultados obtenidos para los aislados A9 y A11 y las fracciones albúminas y globulinas, tratadas térmicamente, podemos decir que las globulinas son las principales responsables de los cambios estructurales y funcionales detectados durante la gelificación de aislados proteicos, y son las que imparten las características de la matriz de los geles obtenidos.

El principal desafío actual es incorporar Amaranto en la formulación de distintos alimentos para modificar su calidad funcional y nutricional, así como crear nuevos productos conocidos como “gel like”. La capacidad gelificante de diferentes proteínas tales como soja (Damodaran, 1988; Kang y col., 1991; Puppo y col., 1995, 1998a, 1998b, 1999b; Renkema y col., 2001; Molina y col., 2002; Molina y Ledward, 2003), proteínas del suero lácteo (Walkenström y col., 1998; Boye y col., 2000; Lowe y col., 2003), ovoalbúmina (Van Kleef, 1986; Doi y col., 1987; Rossi y Schiraldi, 1992) y mezclas de proteínas (Comfort y Howell, 2002; Olsson y col., 2002), ha sido extensamente estudiada, pero hasta el momento no se han informado ningún estudio referente a la gelificación de proteínas de amaranto.

En el desarrollo de este trabajo hemos demostraron que las proteínas presentes en aislados de amaranto extraídas a pH 9 y precipitadas al pH isoelectrico, son capaces de formar geles. Las condiciones críticas de concentración y temperatura de gelificación del aislado A9, fueron de 7 % p/v y 70 °C, respectivamente. Estos valores son menores a los obtenidos por Renkema (2001) para aislados de soja a pH neutro, donde se requirió de aproximadamente 10 % p/v y 84 °C para la obtención de geles. En base a la temperatura de gelificación obtenida podemos decir que, al igual que para otras proteínas vegetales, la desnaturalización de las proteínas de amaranto es un prerequisite para la formación del

gel. El tiempo de gelificación para dispersiones de aislados A9 al 15 % p/v fue de aproximadamente 5 minutos a 70 °C; a temperaturas superiores dicho valor disminuyó en un 30 %. De acuerdo a los resultados obtenidos por nosotros, la cinética de gelificación de las proteínas de amaranto estaría gobernada por las fracciones proteicas de menor estabilidad térmica.

Las dispersiones de aislado A9 al 15 % p/v presentaron un comportamiento tipo gel a partir de 70 °C, tanto en la etapa de calentamiento como en la de enfriamiento implicadas en el proceso de gelificación (Ross-Murphy, 1995a). A temperaturas de calentamiento inferior -50 y 60 °C- las mismas dispersiones presentaron un comportamiento tipo solución entrelazada (Giboreau y col., 1994; Ross-Murphy, 1995b) en ambas etapas del proceso. El enfriamiento no favoreció la elasticidad de los geles al 15 % p/v, preparados a temperaturas superiores a 70 °C, lo que sugiere una escasa participación de uniones puente hidrógeno en la estabilización de la matriz proteica. En cambio en las dispersiones tratadas a 60 °C C la etapa de enfriamiento favoreció la formación de una matriz más elástica, estabilizada por uniones puente hidrógeno.

Las dispersiones de aislado A9 de distinta concentración tratadas a 90 °C durante 20 minutos mostraron diferentes comportamientos. Las dispersiones al 5 % y 7 % p/v presentaron un comportamiento de solución semi-diluida altamente entrelazada (Ross-Murphy, 1995b); mientras que a concentraciones superiores del 10 y 15 % p/v las dispersiones se comportaron como geles fuertes (Ross-Murphy, 1995a). Después de la etapa de enfriamiento las dispersiones presentaron el mismo comportamiento observado durante el calentamiento, salvo las dispersiones al 7 % p/v de proteína que mostraron un comportamiento de gel débil luego de la reducción de temperatura. La elasticidad de los geles aumentó con la concentración de aislado durante el calentamiento, mientras que el enfriamiento solo favoreció el aumento de la elasticidad de los geles de menor concentración (< 7 % p/v).

A bajas concentraciones de aislado A9 y temperatura de tratamiento, las dispersiones se comportan como soluciones entrelazadas estabilizadas principalmente por uniones puente hidrógeno. En cambio a temperaturas elevadas y concentraciones de proteínas altas las dispersiones presentan un comportamiento tipo gel donde prevalecen las interacciones hidrofóbicas y las uniones disulfuro.

Por microscopia electrónica (SEM), se pudo observar que al incrementar la concentración del aislado A9 (10 a 20 % p/v), la temperatura (70 a 95 °C) y el tiempo de calentamiento (10 a 30 minutos), se va formando una matriz más homogénea, ordenada y

con poros pequeños. Pero en las condiciones más extremas de concentración (20 % p/v), temperatura (95 °C) y tiempo (30 minutos), los geles presentaron una matriz más agregada, desordenada y abierta, lo cual se puede atribuir a una mayor agregación consecuencia de las condiciones de ensayo.

Mediante los estudios de solubilidad con distintos agentes caotrópicos (SDS y urea), se pudo determinar que la matriz de los geles preparados a concentraciones de aislado menores al 15 % p/v, temperaturas cercanas a 70 °C y cortos tiempos de calentamiento (<15 minutos), poseen una matriz más desordenada con predominio de interacciones covalentes pero con una importante contribución de interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. En cambio en los geles formados a altas concentraciones de aislado (20 % p/v), elevada temperatura, (95 °C) y tiempo de tratamiento (30 minutos), las uniones disulfuro son las que prevalecen en la estabilización de la matriz proteica.

Se comprobó además que, la matriz de todos los geles preparados en las distintas condiciones, está formada principalmente por agregados de alta masa molecular formados por globulina IIS (polipéptidos de 35 y 28 kD) y globulina-P (monómeros de 56 kD) y por globulinas IIS y globulina-P no agregadas. En el espacio intersticial de la matriz del gel se localizarían especies monoméricas de 56 kD, 42 kD y de bajo peso molecular (14,4 y 20 kD). Estos polipéptidos estabilizan la estructura del gel por interacción no covalentes. Se ha demostrado que los geles de proteínas de soja se encuentran estabilizados principalmente por uniones no covalentes, a diferencia de los geles de proteínas de amaranto. De acuerdo a las reacciones de intercambio sulfhidrilo-disulfuro favorecidas a pH 8, los geles de proteínas de soja presentan una estructura ordenada formada por subunidades AB de glicinina y la subunidad β de β -conglucina (Renkena, 2001). En cambio los geles de amaranto presentan una matriz estructurada, constituida por agregados de alta masa molecular estabilizados principalmente por uniones disulfuro. Estos agregados se encuentran formados, como se mencionara anteriormente, por monómeros de 56, 42 y 20 kD unidos por interacciones no covalentes y puentes disulfuro.

Las globulinas IIS de soja, a elevada concentración, contienen una alta proporción de monómeros y oligómeros solubles y especies polimerizadas estabilizadas por uniones disulfuro. El tratamiento térmico induce el incremento de la masa molecular de los agregados solubles y como consecuencia la asociación lineal entre las cadenas proteicas por medio de interacciones hidrofóbicas, que conducen a la formación de la matriz del gel (Yamauchi y col., 1991).

Los geles del aislado A9 de amaranto en todas las condiciones ensayadas, fueron opacos con alto grado de agregación y baja WHC, en comparación con los geles de soja que son transparentes y presentan altos valores de WHC ($> 90\%$) (Puppo, 1997). En ambos casos dependiendo de las condiciones térmicas utilizadas para la gelificación, los geles con una estructura más agregada, fueron menos transparentes y presentaron menor WHC, que aquellos con una matriz ordenada. A diferencia de las proteínas de amaranto, el incremento de la concentración proteica, no modifica la WHC de los geles de soja (Puppo, 1997).

A elevada concentración proteica (20 % p/v), temperatura (95 °C) y tiempo de tratamiento térmico (30 minutos), la mayor interacción proteína-proteína, incrementa la formación de puentes disulfuro que contribuyen a la dureza y fracturabilidad de los geles de amaranto. La capacidad de las proteínas de formar puentes disulfuro intermoleculares durante el tratamiento térmico aumenta su capacidad de formar geles irreversibles, así como de estabilizar emulsiones, películas interfaciales y espumas (Damodaran, 1989).

Los valores de fracturabilidad y del componente elástico son altos en geles de proteína de soja, con alto contenido de interacciones covalentes (Van Kleef, 1986). De acuerdo a Ker y col, (1993), los geles de globulina de soja obtenidos a 80 °C presentan una estructura agregada de baja dureza, mientras que los obtenidos a 90 y 95 °C ($T_d=89,6\text{ °C}$), son más duros y con una matriz integral amplia, especialmente a la mayor temperatura de tratamiento.

Resultados similares a los nuestros, fueron obtenidos por Alting y col, (2004); para proteínas globulares (ovoalbúminas y proteínas del suero de leche), sometidas a un proceso de gelificación en frío inducido por tratamiento ácido. En este caso, la matriz proteica formada inicialmente se encontraba estabilizada por interacciones físicas y subsecuentemente por formación de uniones disulfuro. La formación de uniones disulfuro en proteínas globulares del tipo IIS, podría estar influenciada por cambios en la estructura secundaria y terciaria de las proteínas, durante el tratamiento térmico.

Los ensayos de espectroscopia FT-Raman de los aislados de amaranto tratados térmicamente nos permitieron concluir que la gelificación de A9 a 90 °C, se vería acompañada por la formación de una matriz integrada por proteínas con un alto grado de desnaturalización, en las que predomina la conformación tipo hoja plegada β , estabilizada por uniones no covalentes (puente hidrógeno e interacciones hidrofóbicas) y covalentes (puentes disulfuro).

El efecto de la concentración y el tratamiento térmico en los cambios estructurales de la matriz del gel, ha sido estudiado en otras proteínas. Wang y Damodaran (1991), usando espectroscopia IR y Raman, mostraron que el tratamiento térmico de las globulinas IIS de soja incrementa la formación de estructura desordenada (randon coil), a expensas de la estructura hoja plegada β produciendo una matriz estabilizada por interacciones electrostáticas. Estas interacciones aumentan la dureza del gel al aumentar la concentración de proteínas. Por otra parte Ker y col., (1993), utilizando FT-IR en fase sólida, encontraron que el calentamiento de globulinas IIS de soja (10 %), produjo un aumento de una estructura molecular más ordenada como consecuencia de un incremento del contenido de α hélice y la disminución de randon coil.

Dadas las características anteriormente discutidas los geles de proteínas de amaranto podrían ser utilizados en la elaboración de productos horneados como cremas y postres, así como reemplazar a ciertos productos alimenticios para pacientes intolerantes a la lactosa.

INDICE

INTRODUCCION

| | |
|--|----|
| 1. Reseña histórica | 1 |
| 2. Resurgimiento del amaranto | 1 |
| 3. Características de la planta de amaranto | 2 |
| 4. Proteínas de almacenamiento | 5 |
| 5. Propiedades funcionales de proteínas | 9 |
| 6. Relación entre las propiedades funcionales, estructurales y moleculares de las proteínas | 12 |
| 7. Gelificación | 15 |
| 8. Modelos de gelificación y tipo de geles | 17 |
| 9. Métodos de evaluación de geles proteicos | 20 |
| 10. Propiedades de geles | 21 |
| 11. Probables impactos y aportes de resultados | 24 |
| 12. Hipótesis | 26 |

| | |
|------------------|----|
| OBJETIVOS | 27 |
|------------------|----|

MATERIALES Y METODOS

| | |
|---|----|
| 1. Preparación de la harina | 28 |
| 2. Preparación de aislados proteicos | 28 |
| 3. Preparación de fracciones proteicas | 29 |
| 4. Determinación de la composición porcentual de la harina y los aislados proteicos | 29 |
| 5. Tratamiento térmico de dispersiones de aislados proteicos | 30 |
| 6. Tratamiento térmico de dispersiones de albúminas y globulinas | 30 |
| 7. Electroforesis de aislados y fracciones proteicas | 31 |
| 7.1 Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) | 31 |
| 7.2 Electroforesis no desnaturalizante en geles de poliacrilamida (PAGE-Nativo) | 32 |
| 7.3 Electroforesis bidimensional (PAGE-Nativo→PAGE-SDS y PAGE-SDS→SDS +2-ME-PAGE) | 32 |
| 8. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de aislados proteicos | 32 |
| 9. Hidrofobicidad superficial (H_0) de aislados proteicos | 33 |
| 10. Espectroscopia ultravioleta (UV) de aislados y fracciones proteicas | 34 |
| 11. Espectroscopia de fluorescencia de aislados y fracciones proteicas | 34 |
| 12. Espectroscopia FT-Raman de aislados proteicos | 35 |
| 13. Solubilidad de aislados y fracciones proteicas | 35 |
| 14. Preparación de geles proteicos | 36 |

| | |
|---|----|
| 15. Medidas viscoelásticas por método dinámico de dispersiones y geles del aislado A9 de amaranto | 36 |
| 15.1 Punto gel | 36 |
| 15.2 Cinética de gelificación | 37 |
| 15.3 Caracterización viscoelástica de dispersiones de aislado proteico de amaranto | 37 |
| 16. Humedad de geles proteicos | 37 |
| 17. Propiedades de color de geles proteicos | 37 |
| 18. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de geles proteicos | 38 |
| 19. Capacidad de retención de agua (WHC %) de geles proteicos | 38 |
| 20. Solubilidad de geles proteicos | 39 |
| 21. Perfil de textura, (TPA) de geles proteicos | 39 |
| 22. Análisis estadístico de los resultados | 40 |

CAPITULO I: Aislados y Fracciones Proteicas de Amaranto

| | |
|--|----|
| 1. Composición centesimal de la harina de amaranto | 42 |
| 2. Caracterización de los aislados proteicos de amaranto | 42 |
| 3. Efecto del tratamiento térmico en aislados y fracciones proteicas de amaranto | 50 |
| 3.1 Caracterización estructural de dispersiones proteicas | 50 |
| 3.1.1 Análisis electroforético | 50 |
| 3.1.2 Análisis calorimétrico | 60 |
| 3.1.3 Hidrofobicidad superficial | 65 |
| 3.1.4 Espectrofotometría ultravioleta (UV) | 68 |
| 3.1.5 Espectroscopia de fluorescencia | 76 |
| 3.1.6 Espectroscopia (FT-Raman) | 84 |
| 3.1.6.1 Efecto del tratamiento térmico | 89 |
| 3.2 Propiedades funcionales de aislados y fracciones proteicas tratadas térmicamente | 94 |
| 3.2.1 Solubilidad | 94 |

CAPITULO II: Geles Proteicos de Amaranto

| | |
|--|-----|
| 1. Condiciones de gelificación | 99 |
| 1.1 Determinación de concentración y temperatura crítica de gelificación | 101 |
| 2. Comportamiento reológico de las dispersiones proteicas | 103 |
| 2.1 Determinación del punto gel | 104 |
| 2.2 Cinética de gelificación | 105 |
| 3. Caracterización reológica de geles | 110 |
| 3.1 Comportamiento viscoelástico | 110 |
| 3.1.1 Efecto del tratamiento térmico | 111 |
| 3.1.2 Efecto de la concentración de aislado | 115 |
| 4. Propiedades de color de geles | 119 |
| 5. Aspectos estructurales de los geles | 121 |
| 5.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM) | 121 |
| 5.2 Solubilidad de proteínas de geles | 126 |

| | |
|--|-----|
| 5.3 Análisis de las proteínas presentes en las fracciones solubles por electroforesis | 129 |
| 5.4 Capacidad de retención de agua (WHC) | 133 |
| 5.5 Textura de geles (TPA) | 135 |
| | |
| DISCUSION GENERAL | 141 |
| | |
| CONCLUSIONES FINALES | 144 |
| | |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 146 |

INTRODUCCION

1. Reseña histórica.

En las épocas precolombinas el grano de amaranto era uno de los alimentos básicos, casi tan importante como el maíz y el frijol. Miles de hectáreas de tierra Azteca, Inca y de otras culturas, se encontraban cultivadas con estas plantas altas y rojizas. Antes de la conquista de América, 17 provincias mandaban más de 20.000 toneladas de granos de amaranto a la antigua Tenochtitlan, en tributo anual al emperador Azteca Moctezuma. En varias fechas del calendario religioso las mujeres aztecas, molían las semillas, las mezclaban con miel y formaban distintas figuras, entre ellas dioses, para ser comidas en las ceremonias en los grandes templos o en reuniones familiares. Este uso del amaranto en los rituales paganos intimidó a los conquistadores españoles quienes prohibieron la producción y el uso del mismo. Con el colapso de las culturas indias después de la conquista de América, el amaranto cayó en el olvido, solo se salvaron unas pequeñas áreas de cultivo esparcidas en zonas montañosas de México y los Andes. El maíz y el poroto, ambos cultivos nativos de las Américas, se convirtieron en dos de los cultivos principales, mientras que el amaranto pasó a la oscuridad (Bressani, 1989). La palabra amaranto proviene del griego y significa “planta que no se marchita”. Las flores del amaranto de cualquier especie, después de cortadas duran mucho tiempo y no pierden el color, asumen un aspecto más delicado que cuando están vivas razón por la cual eran utilizadas antiguamente para adornar las tumbas y simbolizaban la inmortalidad.

2. Resurgimiento del amaranto.

El continuo crecimiento de la población mundial, la creciente necesidad de proteínas y el continuo aumento del precio de la proteína animal, ha incentivado la búsqueda de fuentes alternativas capaces de ofrecer proteína de alto valor nutritivo y cualidades organolépticas aceptables. Por ello muchos estudios están dirigidos a materias primas de origen vegetal, con objeto de obtener tras diversos tratamientos, productos sustitutos o complementarios de las fuentes de proteínas clásicas para su utilización tanto en la alimentación humana como en la animal (Domínguez y col., 1991; Salgado y col., 1992). Conscientes de la conveniencia de diversificar la base alimentaria mundial la Academia Nacional de Ciencias de los EE.UU. condujo un estudio para precisar los cultivos óptimos para su desarrollo y disseminación. En base a los resultados publicados en 1975, el

amaranto fue considerado como uno de los 36 cultivos más prometedores del mundo (National Academy of Sciences, 1975).

El interés en los granos de amaranto ha aumentado en los últimos años debido a su alto valor nutritivo y algunas ventajas agrícolas como alto rendimiento de grano, resistencia a la sequedad y corto tiempo de producción (Mendoza y Bressani, 1987). Se ha propuesto como una nueva fuente alternativa de proteína de buena calidad (Castellani y col., 2000). Las proteínas de amaranto contienen niveles aceptables de aminoácidos esenciales, en particular, lisina, triptofano y metionina, que se encuentran en concentraciones bajas en los cereales y leguminosas de uso común (Teutónico y Knorr, 1985; Mendoza y Bressani, 1987).

La composición, propiedades y aplicaciones presentes y futuras del amaranto, demostrarían el potencial alimenticio de este cereal poco utilizado. Actualmente el amaranto es consumido en diferentes regiones de Latinoamérica y Asia en forma de alimentos basados en granos o harinas procesadas (tortillas, panes, galletas, pastas y cereales para el desayuno) (Paredes-López y col., 1994).

3. Características de la planta de amaranto.

El amaranto pertenece a la familia Amaranthaceae, clase Dicotyledoneae, orden Cariofilales, género *Amaranthus*. Es una planta de crecimiento rápido y fácil adaptabilidad a diferentes medios, desde tropicales a semiáridos. Presenta alta tolerancia a condiciones adversas y gran resistencia a distintas plagas (National Research Council, 1984).

Los amarantos son plantas, de las pocas no herbáceas, que producen cantidades significativas de granos comestibles. Por este motivo el amaranto también se conoce como “pseudocereal” para distinguirlo de los pastos que producen granos (National Research Council, 1984).

Sus hojas son grandes, brillantes y coloreadas, y sus flores son de variados colores: violetas, anaranjadas, rojas y doradas. Las panojas, algunas de hasta 50 cm de largo se parecen a las del sorgo.

Existen especies que son cultivadas para el consumo de sus hojas, (*A. tricolor* L, *A. viridis* L., *A. bitum* L), de características similares a la espinaca y acelga. Otras especies (*A. cruentus*, *A. caudatus*, *A. hypochondriacus*), se caracterizan por una alta producción de semillas (National Research Council, 1984). A estas últimas se las utilizan en varias formas tales como semillas infladas, semillas infladas con miel y productos de panadería.

Además su harina puede sustituir a la harina de trigo en el pan, galletitas, fideos, etc.; por lo que estos productos pueden ser consumidos por los enfermos celíacos.

Los granos son pequeños de aproximadamente 1-1,5 mm de diámetro de forma lenticular y de colores variados entre crema y negro.

La composición química de la harina de semillas de Amaranto de las principales especies productoras de granos se muestra en la tabla 1, (Bressani, 1994).

Tabla 1. Composición química de la harina proveniente de distintas especies de amaranto (g/100 g).

| <i>Análisis</i> | <i>A. hypochondriacus</i> | <i>A. cruentus</i> | <i>A. caudatus</i> |
|-----------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|
| Humedad | 10,4 | 9,7 | 10,7 |
| Proteína* | 15,6 | 17 | 14,9 |
| Lípidos* | 7,8 | 8,1 | 9,1 |
| Cenizas* | 3,5 | 3,5 | 2,9 |
| Carbohidratos* | 70 | 67,9 | 70,3 |
| Fibra bruta* | 3,1 | 3,4 | 2,8 |

* Los resultados están expresados en porcentaje en base seca

El contenido de lípidos se encuentra entre el 7 y 9 %, según la especie. Los mismos se localizan en el embrión y en el endosperma como cuerpos lipídicos de varios tamaños, dispersos en el citoplasma o agregados en grandes masas (Coimbra y Salema, 1994). Están compuestos principalmente por ácidos grasos insaturados, dentro de los cuales se encuentran, los ácidos oleico, linoleico y palmítico (Prakash y col., 1995; Bressani y col., 1987; Singhal y Kulkarni, 1988). Se ha encontrado un contenido relativamente alto de escualeno en el aceite de la semilla (1,32 %), él cual se obtiene comúnmente de la ballena y el tiburón (Marcone, 2000).

El contenido de minerales (cenizas) en las especies de amaranto es más alto que el observado en los cereales convencionales. Los niveles de calcio son 7 veces mayor que en el trigo, y comparando con la leche entera el amaranto posee 20 veces más de magnesio, el doble de potasio y cuatro veces más de fósforo (Singhal y Kulkarni, 1988; Alvarez y col.,

1993). Los niveles de cobre, manganeso y zinc son similares a los encontrados en cereales. Es importante desde el punto de vista nutricional su contenido relativamente alto en hierro (Bressani, 1994).

La proporción de vitaminas en la semilla es apreciable: tiamina 0,25; riboflavina, 0,29; ácido ascórbico 2,8 y niacina 1,15 mg/100g de grano (Teutónico y Knorr, 1985).

En el grano de amaranto el almidón es el carbohidrato más abundante y representa entre el 50 y 65 % de su peso seco. Se almacena en los amloplastos de las células del perisperma, no observándose almidón en el embrión ni en el endosperma (Coimbra y Salema, 1994). El almidón de amaranto está constituido principalmente por amilopectina, mientras que el contenido de amilosa puede variar entre 4,8 y 7,2 % (Saunders y Becker, 1984).

El contenido de proteínas en el grano de amaranto oscila entre 14 y 19 %, un poco más alto que el de los cereales tradicionales, por ejemplo el maíz contiene 9,33 %, el arroz 8,77 % y el trigo 14,84 % de proteínas (Bressani, 1994). La composición aminoacídica de las proteínas de amaranto no presenta gran variabilidad entre las distintas especies (Bressani, 1989). El contenido de lisina en las especies de amaranto es relativamente alto (3,2 – 6,4 %) comparado con los cereales comunes (2,2 - 4,5 %); y la concentración de aminoácidos azufrados (2,6 - 5,5 %) es mayor que en las principales legumbres (1,4 %), como, arveja, porotos, soja, etc. (Gorinstein y col., 1996b). Por lo tanto la lisina junto con otros aminoácidos esenciales, proporcionan a los granos un valor biológico de proteínas, comparable a la leche (Amaranto 75,5 %, leche 72,2 %) (National Research Council, 1984). La leucina es el aminoácido limitante en las proteínas de amaranto, mientras que isoleucina, valina y treonina se encuentran en valores cercanos a los requeridos en la dieta humana (FAO/WHO, 1973). El equilibrio de aminoácidos que presentan las proteínas de amaranto, las coloca como una de las mejores dentro de las proteínas de origen vegetal.

Los factores antinutricionales como ser taninos, saponinas, inhibidores de tripsina, aglutininas, ácido fítico, nitratos y oxalatos, se encuentran en una proporción equivalente a la de los cereales y leguminosas, sin ofrecer riesgos para la salud.

4. Proteínas de almacenamiento.

En el grano de amaranto el 65 % de las proteínas se localizan en el embrión y el resto en el endosperma, hecho que también lo diferencia de los cereales cuyas proteínas se encuentran mayoritariamente localizadas en el endosperma. Se ha observado por microscopía electrónica, que las proteínas de reserva del amaranto se encuentran en cuerpos proteicos, unidos a membranas en células del embrión y del endosperma, con forma y tamaño diferentes (Coimbra y Salema, 1994).

Las proteínas de almacenamiento de amaranto han sido aisladas mediante extracción secuencial con distintos solventes y se han clasificado en base al método de extracción de Osborne, (1924).

Las fracciones proteicas más abundantes son albúminas, glutelinas y globulinas cuyas proporciones con respecto al total de proteínas presentes en el grano son 50 a 65 %, 42 a 56 % y 13 a 20 %, respectivamente (Marcone, 2000). Las prolaminas son las proteínas minoritarias de este pseudocereal (1,5 - 11 %). Las principales características estructurales y fisicoquímica de estas fracciones han sido estudiadas por diferentes autores (Mora-Escobedo y col., 1990; Konishi y col., 1985 y 1991; Segura-Nieto y col., 1992, 1994; Marcone y col., 1991, 1992 y 1994 a y b; Romero-Zepeda y Paredes-López, 1996; Gorinstein, 1996 a y b; Marcone y Yada, 1997 a y b; Chen y Paredes-López, 1997; Martínez y col., 1997; Nakamura y col., 1998; Castellani y col., 1999, 2000; Abugoch y col., 2003; Aphalo y col., 2004).

Las albúminas están involucradas en diferentes funciones biológicas, mientras que las globulinas son la mayor fracción de las proteínas de almacenamiento en las semillas de amaranto (Castellani y col., 1998).

Konishi y col., (1991) informaron la existencia de dos fracciones de albúminas, albúminas-1, también descrita y caracterizada por otros laboratorios como fracción albúminas (Segura-Nieto y col., 1994, Marcone y col. 1994a) y albúminas-2 que se extrae con agua luego de la extracción de albúminas-1 y globulinas (Konishi y col., 1991).

Según Marcone y col., (1994a), la fracción albúmina-1 posee una masa molecular de 133,4 kD, y está compuesta por subunidades homogéneas de baja masa molecular (12 kD). Dichas subunidades se encuentran unidas por uniones no covalentes (puente hidrógeno e hidrofóbicas), mientras que no se encontraron evidencias de uniones disulfuro. En contraposición a Marcone esta fracción ha sido descrita como constituida por polipéptidos de tamaño variado, la mayoría entre 10 y 43 kD (Segura Nieto y col., 1992; Barba de la

Rosa y col., 1992a), aunque también se han detectado polipéptidos de mayor masa molecular, hasta 94 kD (Martínez y Añón, 1996). La mayoría de los polipéptidos son monoméricos no dissociables por 2-mercaptoetanol. La estabilidad térmica de esta fracción es baja, siendo su temperatura de desnaturalización 64 °C (Martínez y Añón, 1996). La composición aminoacídica muestra elevados valores de aminoácidos azufrados, glutamina-ácido glutámico y glicina (Segura-Nieto y col., 1992). Las albúminas presentan una elevada solubilidad en distintas soluciones salinas, mayor al 69 % (Konishi y col., 1991), y además un elevado contenido de estructura hoja plegada β , y bajo contenido de estructura terciaria (Marcone y col., 1994a). La estructura hoja plegada β tiene tendencia a ubicarse en el interior de las proteínas (Cid y col., 1982; Marcone y col., 1991; 1994a).

La fracción albúminas-2 comprende el 31 % del total de albúminas y globulinas y está integrada por proteínas insolubles en soluciones salinas. En la semilla se encuentran asociadas a cuerpos proteicos conjuntamente con globulinas (Konishi y col., 1991; Nakamura y col., 1998). Esta fracción proteica fue purificada parcialmente por Martínez (1997). Los estudios realizados demostraron que sus moléculas unitarias (monómeros) poseen características estructurales (tamaño, composición polipeptídica) y propiedades fisicoquímicas similares a las de la globulina 11S de amaranto (Martínez y col., 1997). Castellani y col., (1998), detectaron en esta fracción cambios estructurales frente a modificaciones del medio, semejantes a los que experimentan las globulinas 11S de varias semillas. A su vez la fracción albúmina-2 muestra un alto grado de polimerización. Debido a estas propiedades cabe considerar a esta fracción como otro tipo de globulina, más que como una albúmina, denominándosela globulinas-P (por polimerizable), (Martínez y col., 1997; Castellani y col., 1998, Castellani y col., 1999). Esta proteína está constituida por un 75 % de agregados de alta masa molecular (600 – 1500 kD), y un 23 % de moléculas unitarias de 280 kD (Castellani y col., 2000). La composición polipeptídica es similar a la de globulina 11S, contiene polipéptidos A y B unidos por puente disulfuro y grandes cantidades de un polipéptido de 56 kD (P56), el cual está involucrado en la estabilización de los polímeros (Castellani y col., 2000). La globulina-P tiene un alto contenido de uniones disulfuro, los más expuestos están estabilizando los polímeros, mientras que los puentes menos reactivos están uniendo polipéptidos de masa molecular de 20 y 30 kD o están formando uniones intermoleculares (Castellani y col., 1999). La globulina-P parcialmente purificada presenta elevada estabilidad térmica, con una $T_d = 99,7$ °C. Tanto los polímeros como las moléculas libres poseen la misma estabilidad térmica (Martínez, 1997). Las proteínas de esta fracción contienen altas concentraciones de aminoácidos

esenciales, valina, isoleucina y leucina (Gorinstein y col., 2002). Su alto grado de polimerización y elevada insolubilidad acercan a la globulina-P a las glutelinas y prolaminas (Martínez y col., 1997; Castellani y col., 1998, 1999). Estas particularidades abren interrogantes en cuanto a la función que juegan estas proteínas en la fisiología de la semilla así como el grado de homología que pueda existir entre la globulina-P y las demás fracciones proteicas.

La globulina-P presenta propiedades de solubilidad y estados de agregación intermedios entre las fracciones globulina 11S y glutelinas (Konishi y col., 1991; Castellani y col., 1998). Recientemente se ha informado, a partir de estudios inmunoquímicos, que la globulina-P posee algunos epítopes comunes con globulinas de quinoa y en menor grado con globulinas de girasol y avena; pero no los tiene con globulinas de soja, trigo, arroz y centeno (Apahlo y col., 2004). Gorinstein y col., (1996 b y c), han informado que la fracción globulina-P posee un 16 % de α hélice, 26 % de hoja plegada β y 53 % de estructura sin periodicidad. Dicha fracción presenta características estructurales comunes a la globulina 11S, pero su estructura es menos compacta y más hidrofóbica (Gorinstein y col., 2001).

La fracción globulina ha sido la más estudiada, la especie más abundante, de constante de sedimentación entre 11,5 y 12,7S, presenta una masa molecular, composición polipeptídica y estructura cuaternaria similar a la de las globulinas 11S presente en otros granos (Segura-Nieto y col., 1994; Marcone y col., 1994b; Romero-Zepeda y Paredes-López, 1996; Chen y Paredes-López, 1997; Martínez y col., 1997). Se ha determinado su alta estabilidad térmica mediante análisis calorimétrico (Martínez y Añón, 1996; Martínez y col., 1997; Martínez, 1997), y otras características como grado de glicosilación, contenido de sulfhidrilos y disulfuro, y análisis conformacional en presencia y ausencia de distintos agentes desnaturizantes (Gorinstein y col., 1996 a y b; Marcone y Yada, 1997 a y b). Se ha clonado y secuenciado también el cDNA que codifica para un polipéptido (59 kD) de esta globulina (Barba de la Rosa y col., 1996).

Los aminoácidos más abundantes en esta fracción son: ácido glutámico-glutamina y ácido aspártico-asparagina. En comparación con las globulinas de avena y soja, las globulinas de amaranto presentan mayores cantidades de aminoácidos azufrados y lisina (Segura-Nieto y col., 1994).

La mayoría de los residuos de cisteína de globulina 11S de amaranto están formando puentes disulfuro que contribuyen a la estabilización de la estructura cuaternaria. Al igual que para otras globulinas 11S, en la correspondiente a amaranto se han observado, en

pequeña proporción, agregados de mayor masa molecular estabilizados por uniones disulfuro (Marcone y Yada, 1998b, 1999; Martínez y col., 1997).

Mediante dicroísmo circular (CD), y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), se determinó que las globulinas presentan un elevado porcentaje de estructura en α hélice (31,4 %) y estructura desordenada (41,6 %), y el resto es hoja plegada β (27 %) (Gorinstein y col., 1996 b y c; Salnikow y col., 1998). Marcone y Yada (1998b), presentaron datos contrapuestos que indican un bajo porcentaje de α hélice (7 %), 18 % de giros β y una proporción variable de hoja plegada β (34,8 – 71 %).

También se ha descrito una especie de globulina minoritaria con composición polipeptídica y propiedades fisicoquímicas similares a las globulinas 7S de otros granos (Barba de la Rosa y col., 1992b; Martínez y col., 1997; Martínez, 1997). Los estudios realizados por Marcone (1999a) sobre esta fracción indican que es un hetero-oligómero de 186 kD constituido por ocho subunidades, de diferentes tamaños entre 15 y 90 kD, unidos de modo no covalente. Su estructura posee una baja cantidad de α hélice (12,6 %) y una elevada proporción de estructura hoja plegada β (50 %).

La fracción glutelinas muestra un comportamiento intermedio entre globulinas y globulina-P (Martínez y Añón, 1996; Martínez y col., 1997; Martínez, 1997). En tal sentido se ha observado que los perfiles electroforéticos (SDS-PAGE) de preparaciones crudas de glutelinas presentan similitudes con los correspondientes a globulinas (Barba de la Rosa y col., 1992a; Segura-Nieto y col., 1994; Martínez, 1997). Dichos perfiles también revelaron la presencia de subunidades agregadas de alta masa molecular, las cuales serían oligómeros unidos por enlaces disulfuro (Gorinstein y col., 1996b). De sus aminoácidos constituyentes el más abundante es el ácido glutámico-glutamina, luego le siguen en menor proporción arginina, leucina, fenilalanina y tirosina (Bressani y García Vela, 1990). También se ha determinado cierto grado de homología antigénica entre glutelinas de amaranto y globulinas de amaranto y avena, y glutelinas de arroz (Vasco-Méndez y Paredes-López, 1995).

Las glutelinas debido a sus propiedades de solubilidad se extraen de la harina a pH extremos o en condiciones desnaturalizantes, lo cual dificulta obtenerlas con las mismas características estructurales que aquellas que se encuentran en las semillas (Martínez y col., 1997; Chrastil y col., 1992). Abugoch y col., (2003), encontraron que las glutelinas extraídas con buffer borato pH 10 contienen moléculas agregadas, que por su tamaño, composición polipeptídica, estabilidad térmica y entalpía de desnaturalización son

similares a la globulina-P tratada en iguales condiciones. Las moléculas de glutelinas serían oligómeros hexaméricos de 300 kD aproximadamente, los cuales se encontrarían en estado más agregado en la semilla. Sin embargo las glutelinas extraídas en condiciones alcalinas (NaOH 0,1 N) están compuestas por moléculas desnaturalizadas y disociadas. Es decir que las condiciones de extracción influyen sobre el rendimiento y las propiedades fisicoquímicas de las glutelinas.

Haciendo uso de las diferencias que presentan las fracciones proteicas de amaranto en las propiedades fisicoquímicas y en el rendimiento, se pueden preparar aislados proteicos que contengan distintas proporciones de albúminas, globulinas y glutelinas con diferentes estructuras. Estos aislados pueden presentar diferente comportamiento funcional, lo cual sería conveniente para su utilización como ingredientes en la formulación de alimentos.

5. Propiedades funcionales de proteínas.

Las propiedades funcionales de las proteínas son aquellas propiedades fisicoquímicas que permiten que los alimentos exhiban características deseables. La mayor parte de las propiedades funcionales afectan las características sensoriales de los alimentos, aunque también pueden jugar un papel importante en su comportamiento físico, o en el de sus ingredientes durante la preparación, procesado o almacenamiento (Kinsella, 1976; Kinsella, 1982).

Hay varios factores que afectan las propiedades funcionales de las proteínas en los alimentos, están aquellos relacionados con la estructura de las proteínas y otros que dependen del medio ambiente como ser, la naturaleza del medio (acuoso u oleoso), la acidez, fuerza iónica y particularmente el tiempo y la temperatura de procesamiento.

Las propiedades funcionales de las proteínas se pueden subdividir en tres grandes grupos:

a) propiedades de hidratación: dependen de las interacciones proteína-agua. A este grupo pertenecen propiedades tales como: la absorción y retención de agua, la adhesión, la solubilidad y la viscosidad, a las cuales se las llaman propiedades hidrodinámicas.

b) propiedades relacionadas con las interacciones proteína-proteína: estas propiedades participan en procesos como la precipitación, formación de geles, fibras, películas y masa.

c) propiedades de superficie: este grupo está relacionado con la tensión superficial, la capacidad de emulsificación y las características espumantes de las proteínas.

Estos tres grupos no son totalmente independientes, por ejemplo, la formación de geles no solo implica interacciones proteína-proteína, sino también interacciones proteína-agua, y la viscosidad y la solubilidad dependen de las interacciones proteína-agua y proteína-proteína.

En un solo alimento suelen ser evidentes varias propiedades funcionales de una proteína (ver tabla 2), (Cheftel y col., 1993).

Tabla 2. Propiedades funcionales de proteínas en distintos tipos de alimentos.

| Alimentos | Propiedades funcionales |
|------------------------------------|--|
| Bebidas | Solubilidad, viscosidad |
| Sopas y salsas | Viscosidad, emulsificación, retención de agua |
| Productos de panadería | Formación de gel, absorción de agua, formación de espuma, emulsificación |
| Productos lácteos (queso, helados) | Emulsificación, retención de agua, viscosidad, formación de gel, coagulación |
| Productos cárnicos (salchichas) | Formación de gel, cohesión, retención de agua y grasa |
| Recubrimientos | Cohesión, adhesión |

Tal como hemos visto existe abundante información referente a las propiedades fisicoquímicas de las proteínas de amaranto (Bressani y García-Vela, 1990, Martínez y Añón, 1996; Martínez y col., 1997; Castellani y col., 1998, 1999; Marcone y col., 1998 a, b), sin embargo existe una reducida información sobre sus propiedades funcionales (Singhal y Kulkarni, 1991; Marcone y Kakuda, 1999). Los atributos funcionales críticos requeridos para la formulación de alimentos con un aislado proteico son: adecuada solubilidad, absorción de agua, gelificación, capacidad espumante y emulsificante, y buenas propiedades sensoriales (Damodaran, 1989; Gruener y col., 1997; Marcone y Kakuda, 1999).

Konishi y Yoshimoto (1989) observaron un incremento en la actividad emulsificante de globulinas de amaranto solubles en soluciones salinas tratadas térmicamente, lo cual está de acuerdo con el incremento de la hidrofobicidad superficial de las mismas. Marcone y Kakuda (1999) por su parte mostraron la existencia, en el rango de pH 3-9, de una alta capacidad espumante y actividad emulsificante para aislados de globulinas de amaranto, en comparación con los aislados de soja. La diferencia principal entre estos dos aislados fue la máxima actividad emulsificante a pH 7 que presentaron los aislados de amaranto. En conjunto las propiedades funcionales de los aislados de globulina de amaranto fueron mejores que las correspondientes a los aislados de soja, especialmente en la proximidad del punto isoeléctrico. Esto proporciona una ventaja potencial del uso de estos aislados en la formulación de alimentos procesados térmicamente dentro del rango de pH mencionado.

La posibilidad de obtener aislados y concentrados proteicos constituye una de las grandes potencialidades del grano de amaranto para la industria alimentaria. Este tipo de productos podrían ser utilizados como ingredientes alimentarios nutritivos en la medida que posean adecuadas propiedades funcionales. Se ha informado la preparación de concentrados proteicos de amaranto (Soriano-Santos y Córdoba-Salgado, 1995; Bejosano y Corke, 1998a) y su efecto sobre las propiedades de la masa de trigo y calidad de fideos cuando se adicionan a este tipo de productos (Bejosano y Corke, 1998b). También se han preparado aislados proteicos conteniendo diferentes cantidades de las fracciones albúminas, globulinas y glutelinas (Paredes-López y col., 1988; Martínez y Añón, 1996).

Otra de las propiedades funcionales que se ha estudiado en aislados proteicos de amaranto es la solubilidad, ya que es sabido que el uso de las proteínas de amaranto en la industria alimentaría se ve limitada por la baja solubilidad de las mismas en solventes acuosos; y además que dicha propiedad influye sobre otras propiedades funcionales de proteínas. Modificando las condiciones del medio se han podido obtener aislados más o menos solubles. Aislados de amaranto obtenidos a pH 9 presentan una solubilidad mínima entre pH 3 y 6,5, siendo su solubilidad algo mayor a pHs muy ácidos (pH = 2,1) y a pHs más alcalinos, (Abugoch y col., 2003). De esta manera, aislados con distintas características estructurales y diferente comportamiento frente al pH podrían ser utilizados en alimentos con diferente requerimiento funcional. La solubilidad de los aislados proteicos de amaranto se puede mejorar también por hidrólisis enzimática. Después del tratamiento térmico la solubilidad de aislados de amaranto decrece como consecuencia de la agregación de las proteínas (principalmente de globulinas), pero la hidrólisis con papaína antes del tratamiento térmico ha permitido obtener aislados con mayor solubilidad

que el aislado original, (Scilingo y col., 2002). Sobre la base de esto, los aislados modificados enzimáticamente también podrían usarse en alimentos que requieran de un tratamiento térmico.

6. Relación entre las propiedades funcionales, estructurales y moleculares de las proteínas.

Las diversas propiedades funcionales de las proteínas pueden ser consideradas como manifestaciones de dos propiedades moleculares importantes de estas biomoléculas: hidrodinámicas y de superficie. Las propiedades funcionales como viscosidad y gelificación son manifestaciones de las propiedades hidrodinámicas de las proteínas, mientras la solubilidad, formación de espuma y capacidad de emulsificación están relacionadas a las propiedades de superficie de las proteínas. Las propiedades hidrodinámicas están afectadas en gran medida por la forma y tamaño de las macromoléculas y son independientes de la composición y distribución de los aminoácidos. En cambio las propiedades de superficie activa de las proteínas están más influenciadas por la composición y distribución de los aminoácidos y flexibilidad molecular y en menor medida por la forma y tamaño de las proteínas (Damodaran, 1989).

La utilización de aislados de amaranto en la formulación de alimentos depende de las propiedades funcionales de las proteínas que los componen (Marcone y Kakuda, 1999). Es sabido que existe una relación entre la estructura y las propiedades funcionales de una proteína dada, y que la conformación proteica es afectada por las condiciones de procesamiento, métodos de obtención y variables del medio tales como temperatura, pH, fuerza iónica, tratamiento térmico (Damodaran, 1989; Gorinstein, y col., 1996a).

Las propiedades funcionales de aislados de soja asociados al comportamiento hidrodinámico así como a las interacciones proteína-proteína reflejan la composición y estructura de sus principales componentes, glicinina y β -conglucina y dependen básicamente del grado de disociación, desnaturalización y/o agregación de estas proteínas (Utsumi y col., 1984; Kinsella y col., 1985).

Conocer la relación entre estructura y propiedades funcionales de las proteínas alimentarias es difícil dado que solo se pueden determinar algunos parámetros moleculares y estructurales que aportan información parcial de la conformación y no reflejan necesariamente la complejidad de la molécula. Mediante el uso de tratamientos físicos, químicos y enzimáticos se ha logrado modificar la conformación de las proteínas

alimentarias, determinar los cambios estructurales producidos y relacionarlos con las propiedades funcionales exhibidas (Petruccelli, 1993; Yamauchi y col., 1991; Rhee, 1994).

Para estudiar la desnaturalización de las proteínas se utilizan técnicas como calorimetría diferencial de barrido (DSC), dicroísmo circular (CD), fluorescencia intrínseca (IF) y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR). El análisis calorimétrico (DSC), permite dilucidar la influencia de la temperatura y el tiempo de calentamiento en los procesos de desnaturalización y agregación, midiendo las entalpías de reacción puestas en juego. Los valores de entalpías (ΔH) son indicativos de las fuerzas predominantes en el mantenimiento de la estructura proteica y las temperaturas de máxima deflexión aportan información sobre la estabilidad térmica de este tipo de moléculas (Arntfield y col., 1990). Tanto la espectroscopia Raman como la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR y FT-Raman) pueden utilizarse para estudiar cambios en la estructura secundaria de proteínas, ya que estas técnicas pueden aplicarse a muestras líquidas, semisólidas y sólidas (Li-Chan y col., 1998; Clark, y col., 1981b). Esta información puede ser utilizada para mejorar las propiedades funcionales de las proteínas, específicamente la capacidad de gelificación.

El tratamiento térmico es usado con asiduidad en la industria de alimentos para controlar la actividad enzimática, inactivar microorganismos, desarrollar propiedades sensoriales deseables, e incrementar la disponibilidad de nutrientes. Basándose en esto decidimos estudiar el efecto que produce el tratamiento térmico en las propiedades funcionales de las proteínas de amaranto. La intensidad y las consecuencias de la desnaturalización de las proteínas por calor (cambios conformacionales y agregación), depende de numerosos factores, como la naturaleza de la proteína, la concentración de la misma, la actividad de agua, el pH, la fuerza iónica, y el tiempo y temperatura de tratamiento (Kinsella, 1976). Los tratamientos térmicos perturban las fuerzas que mantienen la integridad de la estructura de las moléculas proteicas (interacciones hidrofóbicas, iónicas, uniones puente hidrógeno y uniones disulfuro). Para comprender los cambios producidos en la estructura y en las propiedades funcionales, es necesario conocer la naturaleza y magnitud de dichas fuerzas (Damodaran, 1989). En el estado nativo la mayoría de los grupos apolares quedan ubicados en el interior de la proteína y los grupos polares en la superficie expuestos al medio. La contribución de las interacciones hidrofóbicas a la estabilidad de la proteína es superior a la de las uniones hidrógeno. En solución acuosa, la contribución de las uniones hidrógeno para mantener la estructura nativa de la proteína se ve limitada por la interacción proteína-agua; mientras que en el

interior de la proteína dicha contribución aumenta por la baja polaridad del medio (Damodaran, 1989). Los aminoácidos polares localizados en la superficie de las proteínas pueden formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua, contribuyendo a la estructura específica de la proteína y a su solubilidad (Cheftel y col., 1993). Los enlaces puente hidrógeno intra e intercatenarios entre los grupos peptídicos son fundamentales en la estabilización de las estructuras secundarias (α -hélice y hoja plegada β), y terciarias de las proteínas (Damodaran, 1989). Los enlaces cruzados covalentes entre restos de cisteína, limitan el número de estructuras proteicas posibles y contribuyen a la estabilización de las que se forman. Así las moléculas proteicas que posean de 5 a 7 enlaces disulfuro por cada 100 aminoácidos son especialmente estables, sobre todo en condiciones que inducen desnaturalización, como ser pHs extremos o temperaturas elevadas (Cheftel y col., 1993).

La pérdida de la estructura nativa de una proteína por acción del calor es crítica para las propiedades nutritivas y funcionales como ser: gelificación, emulsificación y formación de espumas de aislados de proteínas de soja (Kinsella, 1976). Algunos de los efectos de la desnaturalización proteica por calor son disminución de la solubilidad debido a la exposición de los grupos hidrófobos y a la agregación de las moléculas proteicas desplegadas, modificación de la capacidad de fijación de agua y aumento de la viscosidad (Kinsella, 1979). Wagner y Añón (1990) por su parte informaron que la desnaturalización térmica de las proteínas de soja afecta la interacción con el agua promoviendo la agregación de las mismas.

Se ha determinado la relación estructura-función de aislados de soja con distintos estados y grados de agregación, (Sorgentini y col., 1995; Wagner y col., 1996; Petruccelli y Añón, 1994). Añón y col., (2001) compararon las propiedades funcionales relacionadas a las interacciones proteína-agua de aislados de soja comerciales con aislados de soja obtenidos en el laboratorio, los cuales fueron modificados por tratamientos térmicos y ácidos. Como resultado de dichos estudios se establecieron condiciones de preparación de aislados de sojas para poder abarcar un amplio rango de propiedades funcionales, y en base a esto utilizarlos como ingredientes en la formulación de alimentos.

Hoy en día los tratamientos con altas presiones se presentan como una técnica alternativa a las ya existentes (químicas, físicas, enzimáticas y desnaturalización térmica) para modificar las propiedades funcionales de proteínas (Cheftel, 1992). Los tratamientos con presión pueden disminuir la eficiencia de emulsificación de la β - lactoglobulina bovina (Galazka y col., 1996), concentrados de suero lácteo (Galazka y col., 1995) y de globulina 11S de Vicia Faba (Galazka y col., 1999); y aumentar la capacidad emulsificante de las

proteínas de soja (Molina y col., 2001). A una determinada presión y concentración de proteínas se formarán geles de manera similar a los tratamientos térmicos. La naturaleza de los geles inducidos por presión es muy distinta aquellos formados por calor, mientras que el calor provoca, principalmente, la ruptura de los enlaces de hidrógeno, la presión afecta las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Ledward, 1995).

7. Gelificación.

El estudio de las propiedades gelificantes es muy importante debido a que la formación de un gel proteico está vinculada con características típicas de los alimentos como ser, textura, propiedades organolépticas, rendimiento y calidad de los productos como quesos, yogurt, tofu, huevo duro, postres de gelatina etc. (Pilosof, 2000). La gelificación de proteínas también se utiliza para mejorar la absorción de agua, los efectos espesantes, la fijación de partículas, y para estabilizar emulsiones y espumas (Cheftel y col., 1993). La capacidad de gelificación de un producto es uno de los factores más importantes en la elaboración de nuevos productos o para obtener productos análogos con mínimos efectos en el sabor, color, valor nutricional y sin ninguna degradación (Balny y Masson, 1993; Rogers, 1999).

En la mayoría de los casos, la formación del gel requiere de un tratamiento térmico con frecuencia seguido de un enfriamiento y puede verse favorecido por una ligera acidificación. A veces puede ser necesaria la adición de sales, especialmente iones calcio lo que aumenta la velocidad de gelificación y la firmeza del gel (proteínas de soja, suero lácteo, seroalbúmina). Sin embargo, algunas proteínas pueden formar geles sin ser sometidas a tratamiento térmico, bajo el efecto de una hidrólisis enzimática muy limitada (micelas de caseína, clara de huevo), la simple adición de iones calcio (micelas de caseína), o la alcalinización seguida de un ajuste del pH a valores neutros o al pH isoeléctrico (proteínas de soja).

En presencia de calcio, se favorece más la formación de agregados que el desplegamiento molecular, y pueden disminuirse las temperaturas de gelificación. También es sabido que los iones de calcio favorecen a la dureza de los geles formados bajo la acción del calor, como los de proteína de soja (Puppo, 1997).

Aunque la mayor parte de los geles se forman a partir de disoluciones proteicas (ovoalbúmina, β -lactoglobulina, seroalbúmina, proteínas de soja), también se pueden formar a partir de dispersiones de proteínas insolubles o poco solubles en medios acuosos o

en disoluciones salinas (colágeno, concentrado proteico de soja). Es decir que la solubilidad proteica no siempre es indispensable para la gelificación.

Algunos tipos de proteína forman geles cuando se calientan junto con otras (cogelificación). También pueden formar geles por interacción con determinados polisacáridos (Cheftel y col., 1993).

La formación de la red proteica durante el proceso de gelificación, se puede considerar como el resultado de un balance de interacciones proteína-proteína y proteína-agua, y de las fuerzas de atracción y repulsión que ocurren entre cadenas polipeptídicas adyacentes (Matsumura y Mori, 1996), las cuales producen una red tridimensional continua, exhibiendo una estructura rígida.

Las fuerzas de atracción incluyen interacciones hidrofóbicas (potenciadas por las temperaturas elevadas), electrostáticas (como los puentes de calcio), puente hidrógeno (potenciados por el enfriamiento), e interacciones covalentes (puentes disulfuro). Las fuerzas de repulsión que actúan principalmente a pH alejados del punto isoeléctrico y las interacciones proteína-agua, ayudan a mantener las cadenas polipeptídicas separadas favoreciendo la formación de una matriz homogénea (Heertje, 1993). La contribución de cada tipo de unión depende de la naturaleza de las proteínas en el momento de la gelificación, así como del pH y de la fuerza iónica del medio (Utsumi y Kinsella, 1985 a y b; Damodaran, 1988; Puppo y col., 1995). El aumento de la concentración proteica facilita la interacción intermolecular y la gelificación. A concentraciones proteicas altas, la gelificación puede tener lugar incluso en condiciones ambientales que no sean especialmente favorables para la agregación (sin calentamiento, a valores de pH alejados del punto isoeléctrico, etc.).

Las fuerzas involucradas en la formación y estabilización de geles de proteínas 7S, 11S y aislado proteico de soja son diferentes. En la formación de geles de glicinina y aislado proteico participan interacciones electrostáticas, puente hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y uniones disulfuro; mientras que en los geles de β -conglucina solo lo hacen las interacciones hidrofóbicas y puente hidrógeno (Utsumi y Kinsella, 1985a; Renkena y col., 2001).

En legumina de poroto, las interacciones hidrofóbicas y las uniones disulfuro son las principales fuerzas moleculares involucradas en la formación de la matriz del gel (Zheng y col., 1991).

La formación de enlaces disulfuro durante el calentamiento de ovoalbúmina (Van Kleef, 1986) y β -lactoglobulina (Dumay, 1988; Ziegler, 1990), lleva a la formación de

geles irreversibles. Por el contrario los geles de gelatina son reversibles, en donde las uniones puente hidrógeno son las responsables de la estabilidad del gel (Ledward, 1986).

Las proteínas con alto contenido de aminoácidos no polares forman agregados hidrofóbicos, y cuando la concentración proteica es alta estos agregados coagulan para formar un gel tipo coagulo irreversible. En cambio si el contenido de aminoácidos no polares es bajo se forman agregados solubles que se transforman en un gel transparente y reversibles por enfriamiento (Damodaran, 1989).

Algunos geles presentan estructuras inhomogéneas con algunas zonas de alta y otras de baja densidad, debido a los distintos tipos de cadena y entrecruzamiento y/o a la formación de poros de diferentes tamaños. Las inhomogeneidades se originarían durante el proceso de gelificación, o luego de que se ha formado el gel, especialmente si el material formado no es un gel estable (Stading y col., 1992, 1993). Si la gelificación ocurre antes que la precipitación, se formará una matriz elástica homogénea, en cambio si predominan las fuerzas de separación se producirá el fenómeno de microsinéresis, en donde se forma una matriz con regiones ricas en polímeros y otras con una densidad polimérica menor (Stading y col., 1992).

La capacidad gelificante y las interacciones moleculares involucradas en la estabilización de la matriz formada de varias proteínas, soja, (Damodaran, 1988; Kang y col., 1991; Puppo y col., 1995; Puppo y Añón, 1998a, 1998b, 1999b; Renkema y col., 2001, 2002, 2004; Molina y col., 2002; Molina y Ledward, 2003), suero lácteo, (Walkenström y col., 1998; Boye y col., 2000; Lowe y col., 2003), ovoalbúmina (Van Kleef, 1986; Doi y col., 1987; Rossi y Schiraldi, 1992), y mezclas de proteínas (Comfort y Howell, 2002; Olsson y col., 2002), fueron ampliamente estudiadas. Hasta el momento no hay resultados informados sobre la gelificación de proteínas de amaranto.

8. Modelos de gelificación y tipo de geles.

La gelificación consiste en dos etapas: a) cambios conformacionales o desnaturalización parcial de moléculas proteicas y b) asociación o agregación gradual de las proteínas desnaturalizadas (Matsumura y Mori, 1996). Cuando más lenta sea la etapa de agregación comparada con la de desnaturalización, los polipéptidos parcialmente desplegados se pueden orientar mejor, lo cual favorece la formación de un gel ordenado, homogéneo, elástico, transparente y estable. Por el contrario los geles formados por partículas proteicas agregadas, son opacos y carecen de elasticidad.

Se han propuestos varios mecanismos para explicar la agregación proteica. Para proteínas monoméricas como ovoalbúmina y seroalbúmina bovina la agregación térmica es normalmente precedida por la desnaturalización proteica ($N \rightarrow D \rightarrow A$) (Ferry, 1948). En cambio para proteínas oligoméricas con estructura cuaternaria compleja como ser glicinina de soja, el tratamiento térmico causa asociación/disociación de los oligómeros y seguidamente ruptura de la estructura cuaternaria lo cual conduciría a la agregación (German y col., 1982; Yamagishi y col., 1987). La glicinina de soja ha sido usada como modelo para estudiar la agregación térmica de proteínas (Yamagishi y col., 1980, 1981a, 1981b) donde se encontró que los residuos sulfhidrilos y disulfuro juegan un rol importante en la formación de agregados.

Para Damodaran (1989) la gelificación es un proceso donde la proteína sufre una transformación del estado sol al de una estructura tipo gel por acción del calor u otros agentes, en donde las moléculas de proteínas interactúan entre sí para formar una matriz tridimensional. En el proceso de gelificación por calor se produce la transformación, generalmente irreversible, de la proteína del estado sol al estado progel a temperaturas superiores a la temperatura de desnaturalización. Esta transformación involucra varias reacciones, desnaturalización, disociación-asociación y agregación (Hermansson, 1986; Renkena, 2001). En la etapa de desnaturalización la proteína se despliega y se exponen los grupos funcionales (grupos sulfhidrilos e hidrofóbicos); subsecuentemente estos grupos expuestos pueden interactuar con otros para formar agregados (Wang y Damodaran, 1991). Cuando la concentración de proteínas es elevada la agregación conduce a la formación del gel, en cambio a bajas concentraciones la agregación lleva a la precipitación de las proteínas (Renkena, 2001).

Como se dijo anteriormente un cambio conformacional de las moléculas proteicas es un prerequisite para la agregación de las mismas. Entre el estado nativo y el desnaturalizado, existe un estado intermedio (estado globular fundido). Dicho estado puede ser definido como una molécula globular compacta con estructura secundaria nativa y estructura terciaria desplegada (Ptitsyn, 1992). Clark y Lee-Tuffnell (1986) informaron que durante el calentamiento el contenido de α hélice de la seroalbúmina bovina decrece a medida que se incrementa la estructura hoja plegada β . Estos indicadores de la alteración de la estructura secundaria en el proceso de calentamiento durante la gelificación se contradicen con el concepto de la estructura del estado intermedio de glóbulo fundido. El incremento del contenido de estructura hoja plegada β se debe al incremento de estructura

hoja plegada β intermolecular inducida por la asociación entre las moléculas desnaturalizadas. La presencia de agentes desnaturalizantes (urea, guanidina), facilita el desplegamiento de la estructura secundaria y terciaria de los polipéptidos (Katsuta y Kinsella, 1990).

Durante y después de la agregación de las proteínas, tiene lugar el reordenamiento de los agregados. Las partículas proteicas pueden cambiar su posición original enrollándose unas con otras antes que formen enlaces entre ellas. Este proceso puede ocurrir antes que se formen los agregados más densos, que más tarde formaran el gel. El reordenamiento durante la agregación puede resultar en la precipitación de proteínas en vez de la formación del gel (Bremer y col., 1995). Por otro lado el reordenamiento conduce a la formación de una matriz particulada de los geles (Van Vliet y col., 1997). Una vez que se ha formado el gel pueden tener lugar reordenamientos en la estructura de la matriz los cuales dependerán de ciertos factores como: temperatura, pH y presencia de sales (Renkena, 2001).

El tipo de gel que se forme depende de las propiedades moleculares de la proteína en el estado desplegado (interacciones proteína-proteína y proteína-agua) y de las condiciones durante la formación del gel (temperatura, concentración proteica, pH, tipo de ión presente, fuerza iónica). Existe una concentración mínima de proteínas por debajo de la cual no se forma el gel, este valor puede modificarse variando el pH o el tipo de ión presente en la solución (Damodaran, 1988). Para seroalbúmina bovina a pH 6,3 la concentración mínima de proteína para gelificar es de 6,8 % (Clark y Lee-Tuffnell, 1986) mientras que para otros biopolímeros como agar y gelatina los valores son menores, 0,2 y 1,2 % respectivamente (Clark y col., 1983). En el caso de los aislados de soja la concentración crítica de gelificación es de 3 % a pH 7,6 y fuerza iónica 0,2M, y 6,5 % a pH 7 (Renkena, 2001). En cambio para glicinina la concentración proteica requerida para gelificar es de 2,5 % a pH 7,6 y fuerza iónica 0,5M; y para β -conglucina se necesita 7,5 % (Nakamura y col., 1986a).

Hermansson (1994) clasificó a los geles desde el punto de vista estructural en geles formados por una red de filamentos finos, y en geles agregados o particulados, basándose en observaciones microscópicas. Los geles finos son transparentes y están formados por filamentos pequeños, asociados en forma ordenada y no covalente. Esta estructura es típica de polisacáridos y es poco común en los geles proteicos salvo para la gelatina. Estos geles retienen mucha agua y son termorreversibles. La formación de geles agregados ocurre a pHs cercanos al punto isoeléctrico, por desnaturalización parcial de la proteína o por la presencia de sales. En este caso la asociación de las moléculas proteicas es covalente. Los

geles agregados son opacos y tiene menor capacidad de retención de agua. Existen geles de estructura intermedia entre estos dos tipos de geles, donde las moléculas se asocian en forma covalente y no covalente formando filamentos de pequeñas partículas. Estos últimos son los geles mixtos constituidos por ambos tipos de estructura (fino y particulado) (Foegeding y col., 1995).

Más recientemente Mellena y col., (2002), clasificaron a los geles de caseína en base a su comportamiento mecánico. Utilizaron dos parámetros: el número de enlaces deformable en una cadena y el tipo dominante de deformación microscópica por ejemplo deformación (bending) y estiramiento (stretching). Se distinguieron cinco categorías de geles con un tipo específico de hebra: desordenado, curvo, visagra, recto y rígido. El tipo de deformación que predomina en las primeras tres categorías es la deformación (bending), mientras que en las últimas dos prevalece el estiramiento (stretching).

9. Métodos de evaluación de geles proteicos.

Los geles se pueden caracterizar desde el punto de vista macroestructural, microestructural y molecular. La evaluación macroestructural involucra propiedades físicas y químicas del sistema como un todo. Dentro de estas propiedades se encuentran la viscoelasticidad, textura y capacidad de retención de agua. La caracterización microestructural implica el seguimiento de cambios físicos que no se pueden observar a simple vista. Los análisis microestructurales se realizan mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía óptica y calorimetría de barrido (DSC) (Pilosof, 2000). Las transformaciones moleculares que ocurren durante la formación del gel se pueden determinar mediante espectroscopia infrarroja o Raman con transformada de Fourier (Wang y Damodaran, 1991).

La mayoría de los geles presentan comportamiento viscoelásticos, por tal motivo es una propiedad que ha sido objeto de muchos estudios mediante técnicas reológicas. Las propiedades de textura y reológicas de los geles pueden determinarse por numerosas métodos. En general estos métodos se pueden clasificar en dos grupos: destructivos y no destructivos de la muestra. La evaluación de las propiedades reológicas por medio de medidas oscilatorias proveen un método no destructivo para determinar los componentes viscoso (G'') y elástico (G') de los geles. En este tipo de ensayos se aplica una deformación oscilatoria de amplitud constante y se mide como señal el esfuerzo de corte de

respuesta. Los cambios en los módulos elástico (G') y viscoso (G''), pueden medirse en función del tiempo y/o temperatura, siendo estas propiedades independientes del tamaño y forma de las muestras. La deformación no destructiva es útil para entender la gelificación. Los resultados obtenidos por este método no siempre están relacionados a las propiedades texturales percibidas por análisis sensorial. Esto se debe a que las percepciones sensoriales están relacionadas a la ruptura de la muestra. Dentro de los métodos destructivos se encuentra el análisis de perfil de textura (TPA), cuyos parámetros (dureza, fracturabilidad, cohesividad, adhesividad y elasticidad), dependen del tamaño y forma de la muestra (Hamann, 1987; Bourne, 1982a). Este método está correlacionado con el análisis sensorial de la textura. El ensayo comprende la compresión de la muestra dos veces seguidas, imitando el proceso de masticación (Pilosof, 2000).

10. Propiedades de geles proteicos.

Las condiciones de procesamiento en la elaboración de productos alimenticios difieren en relación a variaciones de temperatura, pH, contenido de sales, combinaciones de ingredientes etc. Estas variaciones afectarán el proceso de formación del gel, la estructura de la matriz, las propiedades reológicas y la capacidad de retención de agua del gel formado.

Las propiedades reológicas como la viscoelasticidad y textura están estrechamente relacionadas con la microestructura del gel (Ross-Murphy, 1995a). Los geles de matriz más cerrada (geles finos), son más duros y retienen más agua que aquellos de matrices más abierta (geles particulados) (Foegeding y col., 1995). Los grandes poros de los geles particulados inhiben la capacidad de inmovilizar el agua por fuerzas de capilaridad (Bowland y Foegeding, 1995). La permeabilidad aumenta y la capacidad de retención de agua disminuye en los geles particulados; sin embargo no hay una relación directa con sus propiedades reológicas. Stading y Hermansson (1991) observaron que la fracturabilidad y dureza de los geles de β -lactoglobulina transparentes (geles finos) formados a pHs mayor a 6, fueron mayores que aquellos geles finos formados a pHs menor a 4.

Las contribuciones de las uniones covalentes y no-covalentes a la textura y viscoelasticidad de geles son diferentes. Las uniones disulfuro juegan un papel importante en el incremento de la dureza y estabilización de la matriz del gel y las uniones puente hidrógeno e interacciones hidrofóbicas son responsables de conservar la estructura y el aumento de la viscosidad (Zheng y col., 1993a; Puppo y Añón, 1998b). El aumento de la

dureza del gel con el intercambio sulfhidrilo-disulfuro, está favorecido con el aumento de la concentración de proteínas (Sone y col., 1983).

Las proteínas del lactosuero en solución a una concentración superior a 5 % tienen buenas propiedades gelificantes cuando se calientan a temperaturas de 70-85 °C. Los geles obtenidos son en general menos firmes y menos elásticos que los de ovalbúmina o de proteínas de soja; son irreversibles probablemente, a causa de la formación de puentes disulfuro intermoleculares. Las proteínas de la clara del huevo (conalbúmina y ovoalbúmina), son con frecuencia considerados como el mejor agente gelificante (Cheftel y col., 1993)

Los requerimientos para la gelificación de los aislados proteicos de soja y de sus respectivas fracciones son diferentes. Los aislados y las mezclas de glicinina y β -conglucina en igual proporción muestran mejores características de gelificación que sus fracciones constituyentes (Babajimopoulos y col., 1983).

La formación de geles de aislado de proteínas de soja a pH neutro, mediante tratamiento térmico, involucra diversos procesos, desnaturalización, agregación donde los puentes disulfuro cumplen un rol importante en la formación de la matriz y endurecimiento del gel. Se encontró que la desnaturalización por calor es un prerrequisito para la formación de estos geles. Esto se determinó a partir de que la temperatura de gelificación (84 °C) de estos aislados se encuentra por encima del comienzo de la temperatura de desnaturalización de glicinina; y a su vez la dureza del gel, medida a través del módulo G' , se incrementa con la proporción de proteínas desnaturalizadas. Los geles fueron más rígidos a calentamientos prolongados a 90 °C (aumento de G'); esto se debe a reordenamientos de la matriz y probablemente a la incorporación de proteína desnaturalizada a la matriz. La rigidez del gel con el enfriamiento fue termoreversible y no involucró la formación de enlaces disulfuro ni reordenamientos en la estructura de la matriz (Renkena, 2001).

La glicinina y β -conglucina de soja forman geles de estructura ordenada. Los geles de β -conglucina son más irregulares y entrecruzados que los de glicinina (Hermansson, 1986). Los geles por calentamiento de β -conglucina son transparentes e independientes de la concentración proteica en tanto y en cuanto supere el 7,5 % p/p. La dureza de los mismos se incrementa con el incremento de la concentración, pero no varía con el tiempo de calentamiento (Nakamura y col., 1986a). Los geles de glicinina son más fuertes que los de β -conglucina, esto podría deberse a la mayor presencia de grupos SH en la fracción

11S; y a medida que la razón 7S/11S del aislado aumenta, la fuerza del gel disminuye (Yao y col., 1990). Las globulinas 11S de soja contienen más residuos sulfhidrilos y disulfuro, que las globulinas 7S. Umeya y col., (1980), indicaron diferencias en el fenómeno de dureza entre la globulina 11S y 7S; la viscosidad aparente de la globulina 7S incrementa considerablemente en el proceso de enfriamiento después de calentar, mientras que la globulina 11S no ofrece cambios significativos. Saio y col., (1978), informaron diferencias en las propiedades físicas (textura, etc.), entre los alimentos preparados con globulina 7S y aquellos preparados con globulina 11S.

Como se dijo anteriormente otros factores del medio que afectan las propiedades de los geles son la fuerza iónica y el pH. Nagano y col., (1994 a y b); Puppo y col., (1995); Renkena, (2001) y Renkena y col., (2002a), estudiaron la influencia de estos factores en las características de los geles de soja. La influencia de dichos factores en la formación del gel de proteínas de soja ha sido estudiada por métodos reológicos (Van Kleef, 1986; Nagano y col., 1994c); microscopía (Hermansson, 1994); y espectroscopia infrarroja (FT-IR) (Nagano y col., 1994c).

Las diferencias encontradas en las propiedades reológicas de los geles de aislado de soja con el pH y la fuerza iónica, podrían ser parcialmente explicadas por la cantidad de proteína incorporada a la matriz del gel. Los geles de aislado de soja a pH neutro fueron menos rígidos (bajos valores de G') cuando más proteína disuelta quedó después del calentamiento no formando parte de la matriz (Renkena y col., 2000; Renkena col., 2002a). De todos modos este factor no puede explicar todo este comportamiento. Estudios realizados con otras proteínas (Van Kleef, 1986; Doi y Itavateke, 1989; Bremen y col., 1990; Stading y Hermansson, 1990; Verheul y Roef, 1998 a y b; Mellena y col., 2002), han demostrado que también la estructura de la matriz determina las propiedades reológicas de los geles.

Los aislados proteicos de soja de pH ácido poseen propiedades de solubilidad y composición de especies proteicas semejantes a la de un aislado alcalino. El comportamiento frente al tratamiento térmico es diferente para ambos aislados. (Puppo, 1997). Los aislados de soja que contienen principalmente β -conglucina y glicina, a pH 3,8 y 5,2 gelifican a la temperatura de desnaturalización de la β -conglucina; mientras que a pH 7,6 la gelificación comienza a la temperatura de desnaturalización de la glicina (Renkena y col., 2000).

Al mismo pH y fuerza iónica la β -conglucina es menos estable térmicamente que la glicina (Puppo y Añón, 1999a). Las temperaturas de desnaturalización de ambas proteínas son más altas a pH 7,6 que a pH 3,8 y a su vez se incrementa con el aumento de la fuerza iónica (Maruyama y col., 1998, 1999; Lakemond y col., 2000b). Nagano y col., (1994a) observaron que los geles de β -conglucina se forman a menor temperatura que los geles de glicina.

Los geles de aislado de soja de pH ácidos (pH = 2,75), son más blandos, menos frágiles, más resistentes a la deformación y más elásticos que los geles alcalinos (pH = 8), siendo su capacidad de retención de agua equivalente. Esta diferencia se debe, en parte, al tipo de uniones que estabilizan ambos geles; en el caso de los geles ácidos las proteínas interactúan entre sí a través de uniones no covalentes (puente hidrógeno e hidrofóbicas), mientras que a pH 8 contribuyen además a la estabilización de la matriz uniones disulfuro (Puppo, 1997).

Los geles de aislados de soja son más rígidos a pH < 6 que a pH > 6, esto se debe a las variaciones en el comportamiento asociación/disociación de las proteínas de soja durante el calentamiento, como función del pH (Renkena, 2001).

Al mismo pH y concentración de proteínas los geles de glicina son más duros que los de β -conglucina. El efecto del pH en las propiedades reológicas de los geles de glicina y β -conglucina es similar a los geles de aislado de soja. La razón por la cual la glicina es más eficiente y mejor agente gelificante que la β -conglucina es debido a la diferencia en la estructura de la matriz y en las fuerzas de las interacciones entre las moléculas proteicas (Renkena, 2001).

11. Probables impactos y aportes de resultados.

De lo expuesto surge claramente que los granos de amaranto contienen proteínas de alto valor biológico, debido a su excelente balance aminoacídico y baja proporción de factores antinutricionales. Dadas estas características el amaranto constituye una fuente alimentaria alternativa interesante para el consumo humano, no sólo bajo la forma de grano entero o de harina, sino también como proteínas aisladas, alternativas o complementarias de las usadas habitualmente en la formulación de alimentos.

La preparación de aislados con capacidad de gelificación conocida constituirá el paso preliminar en la formulación de alimentos que los incluya como ingredientes. De obtenerse

resultados positivos estos podrían ser transferidos al sector productivo, previo un análisis de factibilidad económica. Asimismo los resultados obtenidos contribuirán al conocimiento básico existente tanto sobre proteínas de amaranto como sobre los mecanismos de gelificación y propiedades de los geles proteicos. La gelificación de las proteínas de amaranto podría mejorar la elaboración de productos horneados como cremas y postres. Los geles de amaranto podrían reemplazar también a ciertos productos alimenticios para pacientes intolerantes a la lactosa y a prolaminas de trigo, avena y centeno.

Hipótesis.

Teniendo en cuenta las características estructurales de las proteínas presentes en un aislado proteico de amaranto (albúminas, globulinas y glutelinas), especialmente aquellas relacionadas con su capacidad de desenrollamiento y polimerización, se supone que las mismas deben poseer una buena capacidad para formar geles. Por ello, el análisis de las condiciones de obtención de los mismos y de sus principales características y propiedades permitirá la preparación de ingredientes funcionales para uso alimentario con características de gelificación definidas.

Rechazar o confirmar, que las globulinas presentes en los aislados de proteína de amaranto son las principales responsables de los cambios estructurales y funcionales de los aislados proteicos y las que imparten las características a la matriz de los geles.

La realización de estos estudios contribuirá al conocimiento de las propiedades funcionales de las proteínas de amaranto y al existente sobre la relación estructura - función de proteínas en general.

OBJETIVOS

General

Estudiar las proteínas de amaranto desde el punto de vista funcional a efectos de obtener conocimientos que permitan, en un futuro, incorporar estas proteínas de alto valor nutricional en alimentos destinados al consumo humano.

Específicos

* Determinar las propiedades funcionales dependientes de la interacción proteína - proteína de aislados proteicos de amaranto, específicamente la capacidad de gelificación, y analizar las relaciones existentes entre dicha propiedad y las características estructurales de las proteínas presentes en los aislados.

* Analizar el proceso cinético y la capacidad de gelificación de un aislado nativo de amaranto y ahondar en el estudio de la influencia del tratamiento térmico y concentración de proteína en las propiedades viscoelásticas y texturales de geles de proteína de amaranto.

* Estudiar los cambios conformacionales que sufren las principales fracciones proteicas presentes en los aislados de proteína de amaranto (albúminas y globulinas), frente al tratamiento térmico, y analizar las relaciones existentes entre las características estructurales de estas fracciones y la capacidad de gelificación de los aislados.

* Correlacionar las características estructurales y fisicoquímicas de las fracciones de proteínas presentes en los aislados, con la capacidad de gelificación y las propiedades de los geles obtenidos.

**MATERIALES
Y
METODOS**

1. Preparación de la harina.

Las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* usadas en este trabajo provienen de la Estación Experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), Chapingo, México; donadas al laboratorio de proteínas del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) por el Dr. Octavio Paredes-López.

La harina se preparó en la cátedra de Cerealicultura de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata. Para ello las semillas enteras fueron molidas en un molino Udy de 1 mm de mesh y se tamizaron a través de un cedazo de 10 mesh xx. La harina se desgrasó mediante tratamiento con n-hexano 10 % p/v, bajo agitación continua durante 24 horas a 4 °C. La harina tratada se separó del hexano mediante filtración a temperatura ambiente, se secó en las mismas condiciones y luego se almacenó a 4 °C hasta su utilización.

2. Preparación de aislados proteicos.

Se prepararon aislados proteicos con diferente proporción de albúminas, globulinas y glutelinas de acuerdo a condiciones previamente determinadas en nuestro laboratorio (Martínez y Añón, 1996). Los aislados proteicos se obtuvieron mediante la precipitación isoelectrica de una dispersión de proteínas, obtenida a partir de harina desgrasada mediante extracción acuosa a pH alcalino. De esta manera se dispuso de diferentes clases de aislados proteicos de amaranto, en los que predominan una o más de las fracciones proteicas antedichas.

La harina desgrasada fue suspendida en agua 10 % p/v, llevándose al pH requerido con NaOH 2N. Dadas las características de solubilidad de estas proteínas y sobre la base de resultados previos (Martínez y Añón, 1996), se seleccionaron como pHs de extracción 9 y 11 con posterior precipitación en el punto isoelectrico (pH 5). La suspensión se mantuvo con agitación a temperatura ambiente, durante 30 minutos al pH seleccionado. Posteriormente se centrífugo a 9000 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes resultantes se llevaron a pH 5 con HCl 2 N, luego de lo cual se centrífugo a 9000 x g durante 20 minutos a 4 °C. Los precipitados obtenidos se resuspendieron en un pequeño volumen de agua, se neutralizaron con NaOH 0,1 N y se liofilizaron. Los aislados así obtenidos se denominaron A9 y A11 de acuerdo al pH de extracción.

3. Preparación de fracciones proteicas.

A partir de la harina desgrasada se realizó una extracción secuencial de albúminas y globulinas, según el método descrito por Konishi y col., (1991). Con cada solvente utilizado se realizaron 3 extracciones de 60, 30 y 30 minutos respectivamente. En cada extracción la suspensión se mantuvo con agitación a temperatura ambiente. La relación harina/solvente empleada en la extracción (gr/ml), fue en todos los casos de 1/10.

Para las albúminas se utilizó como solvente de extracción agua destilada. Después de cada extracción el residuo fue separado por centrifugación a 9000 x g durante 20 minutos a 20 °C. Los tres sobrenadantes obtenidos se juntaron y se llevaron a pH 5 con HCl 2N. El precipitado se separó por centrifugación a 9000 x g durante 20 minutos a 4 °C, y luego se lo resuspendió en agua destilada, se neutralizó con NaOH 0,1 N y se liofilizó.

La fracción globulina se extrajo, tratando el residuo de la fracción albúmina con buffer A (K_2HPO_4 32,5 mM, KH_2PO_4 2,6 mM, (pH =7,5) conteniendo NaOH 0,4 M); de la misma manera descrita para albúminas. Luego se juntaron los tres extractos y se llevaron a pH 5 con HCl 2 N. El precipitado proteico se separó mediante centrifugación a 9000 x g durante 20 minutos a 4 °C. El mismo se suspendió en agua destilada ajustando el pH a 7 con NaOH 0,1 N, y luego se liofilizó.

4. Determinación de la composición porcentual de la harina y los aislados proteicos.

La composición química de la harina y de los aislados A9 y A11 de amaranto fue determinada mediante el empleo de distintas técnicas analíticas.

El contenido de proteínas de la harina y los aislados, se determinó mediante microKjeldhal, de acuerdo con la AOAC (Official Methods of Analysis), fifteenth edition 1990; el factor de conversión utilizado fue 5,85 gramos de proteína/gramo de nitrógeno, dado que es el factor que mejor se ajusta para las proteínas de amaranto (Becker y col., 1981; Segura-Nieto y col., 1994). Las determinaciones se hicieron por triplicado, se calculó el promedio de las mismas, y se las refirió a peso seco.

La humedad de la harina y de los aislados se determinó por diferencia de pesada, calentando la muestra en estufa a 105 °C hasta peso constante.

El contenido de cenizas totales de la harina, se realizó calentando la muestra hasta la desaparición de humos blancos, luego se dejó en la mufla durante 3 horas a 550 °C y posteriormente se pesó (AOAC, 1990).

Para la determinación del contenido de hidratos de carbono de la harina se utilizó el método colorimétrico de la antrona (Rose y col., 1991). Esta técnica detecta entre 1-15 µg de glucosa en 0,5 ml de muestra. Para determinar el contenido de almidón en las muestras se utilizó una curva patrón obtenida con solución de dextrosa. Las absorbancias se midieron a 625 nm.

En todos los casos se realizaron tres determinaciones por muestra. Se informaron los valores promedios y sus desviaciones standard.

5. Tratamiento térmico de dispersiones de aislados proteicos.

Se prepararon suspensiones de los aislados A9 y A11 en agua a una concentración de 1 mg/ml (0,1 % p/v). Un volumen de 8 ml se introdujo en tubos de vidrio de 1,5 cm de diámetro y 10 cm de alto tapados, para evitar pérdidas por evaporación, posteriormente los mismos fueron introducidos en un baño termostatzado a 70 y 90 ± 0,05 °C y fueron mantenidos durante 3, 5, 10, 15, y 30 minutos con agitación periódica. Mediante una termocupa se comprobó que el tiempo para que la suspensión alcance la temperatura del baño fuera inferior a 40 segundos, para la temperatura más baja, el cual no es significativo en el tiempo total. Luego del tratamiento las muestras se enfriaron rápidamente en un baño a 0 °C durante 10 minutos y las dispersiones resultantes se liofilizaron.

6. Tratamiento térmico de dispersiones de albúminas y globulinas.

Se prepararon suspensiones de 1 mg/ml, de la fracción albúminas y globulinas en agua y en buffer B (K₂HPO₄ 33,3 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, pH = 8,5, µ = 0,08), respectivamente. Las mismas se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 9000 x g durante 15 minutos a 20 °C. Los sobrenadantes de las suspensiones se trataron térmicamente en un baño termostatzado a 70 y 90 ± 0,05 °C con agitación periódica. Al igual que en los aislados se comprobó, mediante una termocupa, que el tiempo para que la suspensión alcance la temperatura del baño fuera inferior a 40 segundos, para la temperatura más baja, el cual no es significativo en el tiempo total. A diferentes tiempos de calentamiento (3, 5, 15, 30 y 60 minutos) se tomaron alícuotas de las suspensiones, se enfriaron rápidamente en un baño a 0 °C durante 10 minutos; y se centrifugaron a 9000 x g durante 15 minutos a 20 °C. De los sobrenadantes resultantes se

tomaron muestras para medir el contenido proteico, y realizar los espectros de fluorescencia y UV. El resto de las dispersiones se liofilizó para llevar a cabo los ensayos de electroforesis mono y bidimensionales.

7. Electroforesis de aislados y fracciones proteicas.

Todos los geles fueron corridos en microplacas con el equipo BIO RAD, modelo Miniprotean II.

7.1 Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

Para las corridas electroforéticas se utilizó el sistema de buffer disociante, que contiene: 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8 y 0,1 % SDS para el gel apilador; 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 y 0,1 % SDS para el gel separador; y 0,025 M Tris-HCl, 0,192 M glicina y 0,1 % SDS pH 8,3 para el buffer de corrida, (Laemmli, 1970). Se utilizaron geles formados por un gel apilador (acrilamida 4 % p/v) y un gel separador (acrilamida 12 % p/v); o solo por un gel separador en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15 % p/v, (Petruccelli y Añón, 1994). Las muestras se prepararon disolviendo 1 mg de la proteína liofilizada en 100 µl de buffer de muestra de pH 6,8, (0,125 M Tris-HCl, 0,1 % SDS, 40 % v/v glicerol, 0,05 % azul de bromofenol), con o sin 2-ME al 5 % v/v. Cuando se trataba de soluciones proteicas las muestras se prepararon agregando 3 volúmenes de las mismas a 1 volumen de buffer de muestra 4x. En el caso de las muestras con 2-ME, las mismas se calentaron durante 1 minuto a baño maría. Las muestras antes de ser cargadas en el gel, se centrifugaron a 9000 x g (SIGMA 1-15K; IEC (Centra MP4R, International Equipment Company); durante 20 minutos a 20 °C, y los sobrenadantes se sembraron a razón de 30-40 µg de proteína por calle. Las corridas se llevaron a cabo durante 1 hora a voltaje constante de 200 V.

Para el cálculo de las masas moleculares de los péptidos se utilizaron las proteínas patrón suministradas por Pharmacia: fosforilasa (94.000), seroalbumina bovina (67.000), ovoalbúmina (45.000), anhidrasa carbónica (30.000), inhibidor de tripsina (20.100), α lactoalbúmina (14.400) Da. Las mismas fueron solubilizadas en 100 µl de buffer de muestra desnaturalizante con 2-ME, y sometidas al mismo tratamiento que se le aplicó a las muestras. En los geles se sembraron 3 µl de la solución patrón. Las curvas de calibración se construyeron relacionando la distancia recorrida por las distintas proteínas

(Rf), con el logaritmo de su masa molecular. $Rf = D_x/D_f$; (D_x : distancia recorrida por el polipéptido x y D_f : distancia recorrida por el frente de corrida).

7.2 Electroforesis no desnaturizante en geles de poliacrilamida (PAGE-Nativo).

Para este tipo de electroforesis se utilizó el mismo sistema buffer que para las desnaturizantes, pero sin el agregado de SDS. Se prepararon geles continuos de acrilamida al 7 % p/v, y las corridas se realizaron a voltaje constante de 200 V durante 1 hora y media aproximadamente. Las muestras se prepararon disolviendo 3 mg de proteína liofilizada en 100 μ l de buffer de muestra de pH 8,8 (0,75 M Tris-HCl, 40 % v/v glicerol y 0,05 % azul de bromofenol); y se centrifugaron a 9000 x g durante 20 minutos a 20 °C.

7.3 Electroforesis Bidimensional (PAGE-Nativo→PAGE-SDS y PAGE-SDS→SDS + 2-ME-PAGE).

Luego de correr la primera dimensión en geles de 0,75 mm de espesor, se cortó la porción del gel correspondiente a dos calles con la proteína a analizar y se trataron con 10 volúmenes de buffer de tratamiento, (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 1 % SDS, sacarosa 20 % p/v, 0,2 M 2-ME); durante 30 minutos a 55 °C, con dos cambios de solución. La porción del gel tratada se colocó en el tope del gel de la segunda dimensión de 1 mm de espesor, SDS-PAGE o SDS + 2-ME-PAGE según corresponda. En este mismo gel, se sembró en una calle el patrón de proteínas de masas moleculares. La electroforesis se desarrolló de la misma forma que las anteriores.

Coloración. Los geles obtenidos por las técnicas de electroforesis fueron fijados y teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0,1 % en agua/metanol/ácido acético (10:10:4), durante 12 horas; y desteñidos con una solución de metanol 25 % p/v y ácido acético 10 % p/v.

Obtención de las imágenes y análisis de los geles. Las imágenes de las electroforesis fueron digitalizadas utilizando un equipo BIO RAD (Gel Doc 1000), y el análisis de las masas moleculares y las proporciones de las bandas obtenidas en el gel, se realizaron con el programa Molecular AnalystTM/PC (versión 1.5) (BIO RAD).

8. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de aislados proteicos.

Las determinaciones se realizaron en un calorímetro Polymer laboratories (Reometric Cientific). El equipo fue calibrado con indio, ácido láurico y esteárico como standard, tanto

para la escala de temperatura como para la de flujo térmico, a una velocidad de 10 °C/minuto.

Las muestras se prepararon con 12-16 mg de los aislados proteicos A9 y A11, nativos y tratados térmicamente, previamente liofilizados, suspendidos en agua (20-25 % p/p), y se colocaron en cápsulas de aluminio herméticamente cerradas, usándose como referencia una cápsula doble vacía. El calentamiento se realizó a una velocidad de 10 °C/minuto, en el rango de 25 a 120 °C.

Luego de cada análisis las cápsulas se perforaron y se dejaron en estufa a 105 °C durante 12 horas. La materia seca se determinó por diferencia de pesada entre la cápsula vacía y la misma cápsula con la muestra, luego de secarla en estufa hasta peso constante.

A partir de los termogramas obtenidos se determinaron las temperaturas (Td) y entalpías (ΔH) de desnaturalización, utilizando un software Plus V5.41. La Td es la temperatura del máximo de la transición endotérmica, y el ΔH se calculó como el área correspondiente a la transición endotérmica. Dicha área se obtuvo trazando una línea de base recta uniendo el comienzo y la finalización de la transición térmica.

El grado de desnaturalización fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de desnaturalización (GD) \%} = \frac{\Delta H_o - \Delta H_t}{\Delta H_o} \times 100 \quad (\text{ec.1})$$

donde ΔH_o es la entalpía de la muestra no calentada y ΔH_t es la entalpía de la muestra calentada por t (tiempo en minutos), a 70 y 90 °C.

9. Hidrofobicidad superficial (H_0) de aislados proteicos.

Para nuestras determinaciones se empleo el método de Hayakawa y Nakai (1985), utilizando como sonda fluorescente 8-anilino-1-naftalensulfonato de amonio (ANS, Aldrich Chemical Co.).

Se prepararon soluciones de 5 ml (2 mg/ml) de liofilizado de los aislados A9 y A11 tratados y no tratados térmicamente, usando como solvente buffer KH_2PO_4 0,1 M pH 7. Luego de 15 minutos de agitación a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron en una centrífuga Sorvall a 10.000 x g, durante 30 minutos a 20 °C.

A partir de estas soluciones se hicieron 8 diluciones sucesivas con el buffer fosfato para cada muestra; y por otro lado se preparó una solución de ANS 8 mM en metanol.

Se utilizó un equipo Perkin Elmer 2000, al cual se le ajustó la sensibilidad del detector llevando a cero con 3 ml de metanol y a 800 unidades de fluorescencia con una mezcla de 3 ml de metanol y 20 μ l de ANS 8 mM. Se determinaron dos blancos diferentes: el correspondiente a cada dilución proteica sin el agregado de la sonda fluorescente y una mezcla de 3 ml de buffer KH_2PO_4 0,1 M pH 7 con 20 μ l de ANS. Para la cuantificación de las muestras, se mezclaron 3 ml de cada dilución con 20 μ l de ANS y se midió la fluorescencia a 475 nm habiendo producido una excitación a 364 nm. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

La hidrofobicidad superficial se calculó a partir de la pendiente obtenida al graficar las unidades de intensidad de fluorescencia en función de la concentración de proteína ($\mu\text{g/ml}$). La concentración proteica se determinó por el método de BCA (ácido bicinconínico) (Smith y col., 1985).

10. Espectroscopia ultravioleta (UV) de aislados y fracciones proteicas.

Se prepararon dispersiones acuosas de los aislados A9 y A11 (0,1 % p/v), se trataron térmicamente a dos temperaturas (70 y 90 °C), durante distintos períodos de tiempo (3, 5, 10, 15 y 30 minutos), se dejaron enfriar en baño de hielo durante 10 minutos, se centrifugaron a 1200 x g durante 30 minutos a 20 °C; y luego se midió la densidad óptica del sobrenadante a 260 nm y 280 nm, en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, a 25 °C, utilizando un espectrofotómetro Metrolab 1700 UV-visible. Para realizar las mediciones espectrofotométricas en el ultravioleta (UV), de las fracciones solubles de albúminas y globulinas tratadas y no tratadas térmicamente, preparadas según lo descrito en el ítem 6, se utilizaron las mismas condiciones espectrométricas que en el caso de los aislados.

11. Espectroscopia de fluorescencia de aislados y fracciones proteicas.

Se prepararon suspensiones acuosas al 0,1 % p/v de los aislados A9 y A11 nativos. Las suspensiones se calentaron a 70 y 90 °C a distintos tiempos (3, 5, 10, 15 y 30 minutos) y se dejaron enfriar 10 minutos en baño de hielo (0 °C). A estas dispersiones las denominamos fracción total. La fracción soluble se obtuvo después de centrifugar la dispersión total (0,1 % p/v) a 1200 x g durante 30 minutos a 20 °C. Se realizó el espectro

de fluorescencia de ambas fracciones utilizando una longitud de onda (λ) de excitación de 280 nm, y el espectro de emisión se barrió entre 300 y 420 nm.

El espectro de fluorescencia de las fracciones solubles de albúminas y globulinas tratadas y no tratadas térmicamente, preparadas como se describió en el ítem 6, se midió utilizando las mismas condiciones espectrales que en el caso de los aislados.

En todos los casos las determinaciones se realizaron por duplicado en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS-50B en celdas de vidrio de 1 cm de paso óptico a 25 °C.

12. Espectroscopia FT-Raman de aislados proteicos.

Los espectros FT-Raman de los liofilizados de los aislados A9 y A11 tratados y no tratados térmicamente fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker M 66 equipado con un láser Nd:YAG de 1064 nm con una potencia de 500 mW (75 mW en la muestra). Los espectros fueron registrados a temperatura ambiente, con una resolución de 4 cm^{-1} y resultaron del promedio de 1000 escaneos. Se llevó a cabo una normalización vectorial en la zona 1480-950 cm^{-1} (zona vibracional mixta). Las normalizaciones, los cálculos de alturas y posición de picos fueron realizados empleando el software Opus 4.0 (Bruker). Los resultados informados corresponden al promedio de al menos tres muestras independientes.

13. Solubilidad de aislados y fracciones proteicas.

Alícuotas de los liofilizados de los aislados A9 y A11 tratados y no tratados térmicamente, preparados como se describió en el ítem 5, se dispersaron en agua (1 mg/ml). Las suspensiones se agitaron durante 30 minutos en un vortex, y luego se centrifugaron a 1200 x g durante 30 minutos a 20 °C. El contenido de proteína de los sobrenadantes se determinó por el método de Lowry (Lowry y col., 1951; Stoschek, 1990), para lo cual se realizó una curva de calibración con una solución de seroalbúmina bovina disuelta en agua (10 mg/ml). Las lecturas se realizaron a 750 nm, en un espectrofotómetro Metrolab 1700 UV-visible. La solubilidad se expresó como:

$$S (\text{g } \%) = 100 \times \frac{\text{contenido de proteínas en el sobrenadante}}{\text{contenido de proteínas totales}} \quad (\text{ec. 2})$$

Para las mediciones de solubilidad de las fracciones albúminas en agua y globulinas en Buffer B, (K_2HPO_4 33,3mM; KH_2PO_4 1,7mM pH 8,5 $\mu = 0,08$), tratadas y no tratadas térmicamente, como se detalló en el ítem 6, se utilizó el método de Lowry, como se describió previamente para los aislados proteicos.

14. Preparaciones de geles proteicos.

Las dispersiones acuosas del aislado proteico de amaranto (A9), de concentración conocida, (10, 15 y 20 % p/v), a pH 7, se prepararon en tubos de 6 cm de largo y 1,5 cm de diámetro sellados en ambos extremos con tapones de goma. La gelificación fue realizada de acuerdo a la técnica utilizada por Puppo y Añón (1995). El calentamiento de los tubos se llevó a cabo en un baño de agua termostatzado, a diferentes temperaturas (70, 80, 90 y 95 °C) y tiempos de calentamiento (10, 20 y 30 minutos). Luego del tratamiento térmico los geles fueron enfriados inmediatamente en un baño de agua a 15 °C y seguidamente se guardaron a 4 °C durante 24-48 horas antes del análisis.

15. Medidas viscoelásticas por método dinámico de dispersiones y geles del aislado A9 de amaranto.

El rango de viscosidad lineal fue determinado a 1 Hz de frecuencia. Dentro de este rango se seleccionó una deformación de 1 % para los barridos de tiempo y frecuencia de todas las muestras. Los ensayos se realizaron en un reómetro Paar Physica MCR 300, usando un sensor de platos paralelos con una separación (gap) de 1 mm. Para el proceso de gelificación la dispersión se colocó sobre el plato inferior termostatzado. Para prevenir la deshidratación se colocó silicona de baja viscosidad alrededor del borde de los platos, favoreciendo un contacto total entre la muestra y la silicona. Se usó un software US 200 V2.21 para analizar los datos.

15.1 Punto gel. La capacidad de gelificación (G' y $\tan \delta$ vs. tiempo) de dispersiones acuosas al 15 % p/v de aislado A9 fue analizada por medición de parámetros viscoelásticos a diferentes temperaturas de tratamiento (50, 60, 70, 80, 90 y 95 °C), durante 20 minutos. El tiempo de gelificación (punto gel) para cada temperatura, se determinó en el punto de cruce entre las curvas de G' (módulo elástico) y G'' (módulo viscoso) vs. el tiempo. Se determinaron las condiciones mínimas necesarias para asegurar la gelificación (temperatura crítica T_{crit} , y concentración crítica, C_{crit}). Se puede interpretar a C_{crit} y T_{crit}

como la concentración y temperatura, respectivamente, a las cuales G' comienza a diferenciarse de G'' . Dichas condiciones se determinaron a partir de la variación de los parámetros dinámicos G' y G'' (medidos a 1 Hz de frecuencia) con la concentración de aislado y la temperatura.

15.2 Cinética de gelificación. Se determinó la cinética de gelificación de geles del aislado A9 (15 % p/v), a partir de las curvas G' vs tiempo a las distintas temperaturas ensayadas. Los datos experimentales se ajustaron a la siguiente fórmula empírica: (Puppo y Añón, 1998b).

$$G'(t) = G'_{\text{sat}} [1 - \exp(-kt)] \quad (\text{ec. 3})$$

donde G'_{sat} es el módulo elástico de saturación, K la constante de tratamiento térmico y t el tiempo. Las constantes de velocidad de gelificación (K) se obtuvieron por medio de un modelo no-lineal, usando el software Microcal Origin version 5.0, (1997).

15.3 Caracterización viscoelástica de dispersiones de aislado proteicos de amaranto. Dispersiones del aislado A9 de amaranto (15 % p/v), fueron tratadas térmicamente a diferentes temperaturas (50, 60, 70, 80, 90 y 95 °C) durante 20 minutos. Similares ensayos fueron realizados con dispersiones de aislado A9 a diferentes concentraciones proteicas (5, 7, 10 y 15 % p/v), las cuales fueron tratadas térmicamente durante 20 minutos a 90 °C. Después del calentamiento todas las dispersiones fueron enfriadas a 25 °C para la gelificación. Las muestras fueron caracterizadas por ensayos reológicos durante el calentamiento (dispersiones) y después del enfriamiento (geles). Se realizaron medidas de los parámetros, G' (módulo elástico), G'' (módulo viscoso), $\tan \delta$ (tangente del ángulo de desfasaje), en función de la frecuencia de oscilación.

16. Humedad de geles proteicos.

Se determinó la humedad de los geles por calentamiento en estufa a 105 °C hasta peso constante. Las determinaciones se hicieron por triplicado en cada condición de gelificación.

17. Propiedades de color de los geles proteicos.

Se realizaron mediciones del color superficial de los geles del aislado A9 de amaranto preparados en distintas condiciones; con un colorímetro Chroma Meter CR-300C, (MINOLTA, Osaka, Japan). La luminosidad de los geles se determinó por medio del

parámetro “L”, el equilibrio entre el color verde y rojo por el valor “a”, y el equilibrio entre el amarillo y el azul por medio del valor “b”. A partir de estos parámetros se calcularon los atributos de color (hue, H*) e intensidad del color (chroma, C*):

$$H^* = \text{tg}^{-1} (b/a) \quad a > 0 \quad (\text{ec. 4})$$

$$H^* = 180 + \text{tg}^{-1} (b/a) \quad a < 0 \text{ y } b \geq 0 \quad (\text{ec. 5})$$

$$C^* = (a^2 + b^2)^{1/2} \quad (\text{ec. 6})$$

Los parámetros fueron medidos en distintas zonas del gel, realizándose un promedio de 10 lecturas por gel. Los resultados que se presentan son los valores medios de las determinaciones efectuadas.

18. Microscópica electrónica de barrido (SEM) de geles proteicos.

Se tomaron muestras de 2 mm de diámetro de los geles del aislado A9, preparados en distintas condiciones (concentración, temperatura y tiempo), y se conservaron durante 48 horas en glutaraldehído al 2,5 %. Se les agregó rojo de rutenio 0,1 % p/v y KCl 0,025 M, se dejaron 72 horas. Se lavaron varias veces con solución de KCl 0,025 M. Se seccionaron en trozos de 1 mm³ y se introdujeron en solución de OsO₄ 2 % p/v por 2 horas. Se lavaron con agua destilada durante 1 hora y se procedió a una deshidratación creciente, en frío (4 °C), con acetona 25, 50, 70 y 90 % a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se hicieron tres lavados de 30 minutos cada uno, con acetona 100 %. Las muestras fueron luego sometidas a un secado por punto crítico, en un equipo Polaron. Se montaron sobre cinta doble faz en porta muestras de bronce. Seguidamente se evaporó oro en un equipo de evaporación de metales en plasma de Argón. La observación se realizó en un microscopio de barrido JEOL 35 CF con una aceleración de voltaje 5 KV.

19. Capacidad de retención de agua (WHC %) de geles proteicos.

Se pesaron entre (0,3-1,3 g) de gel del aislado A9, preparados en distintas condiciones (concentración, temperatura y tiempo), equilibrados a temperatura ambiente y se colocaron sobre una membrana de Nylon (diámetro de poro 5.0 mm Micronsep) mantenida en el medio de un tubo de centrífuga de 50 ml usando como soportes tubos de acrílico. Se determinó la pérdida de agua por diferencia de pesada luego de centrifugar a 120 x g durante 5 minutos a

15 °C (Puppo y Añón, 1995). La capacidad de retención de agua fue expresada como una relación porcentual entre la cantidad de agua retenida luego de la centrifugación y la cantidad de agua inicial presente en el gel. Para cada gel se calculó el promedio de cuatro determinaciones y su desviación standard.

20. Solubilidad de geles proteicos.

Muestras de geles del aislado A9 (0,5 g), preparados bajo distintas condiciones de concentración proteica, temperatura y tiempo de calentamiento; se dispersaron en diferentes medios de extracción (relación 1:5): agua destilada (W); 0.1 M buffer fosfato pH 7 (P); 0,1 M buffer fosfato pH 7 con 0,5 % SDS (PS); 0,1 M buffer fosfato pH 7 con 8 M urea (PU); 0,1 M buffer fosfato pH 7 con 0,5 % SDS y 8 M urea (PSU). Las dispersiones se agitaron durante 30 minutos por medio de un agitador magnético y luego se centrifugaron a 9335 x g durante 15 minutos a 15 °C. El contenido de proteínas del sobrenadante de los geles se determinó mediante el método de Lowry (Lowry y col., 1951; Stoschek, 1990).

Las fracciones solubles de los medios de extracción (W, P, PS, PU), PSU), de los geles del aislado A9 (15 % p/v), preparados a distintas temperaturas (70, 80 y 95 °C), se caracterizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida, mono (PAGE-SDS; PAGE-SDS+2-ME) y bidimensional (PAGE-SDS→SDS+2-ME-PAGE), con la misma metodología usada para los aislados (ítem, 7.1; 7.3).

21. Perfil de textura (TPA) de geles proteicos.

Se prepararon geles del aislado A9 de amaranto de 2 cm de diámetro y 1,5 cm de altura a distintas concentraciones (10, 15, y 20 % p/v), temperaturas (70, 80 y 95 °C) y tiempos de tratamiento térmico (10, 20 y 30 minutos), a pH 7.

Los geles se comprimieron a 20 °C, al 80 % de su altura original (1,5 cm) antes de la ruptura (Puppo y Añón, 1998b), en un analizador de textura TA-XT2i Texture Analyser, (Vienna Court, England), con el software Texture Export para windows versión 1.0. Para determinar el perfil de textura, se ensayó un test de compresión uniaxial de dos ciclos, (TPA analysis), (Steffe, 1996), en platos paralelos con una sonda SMSP/75 (0.98 N) a una velocidad constante de 0,5 mm/s. De las curvas obtenidas, fuerza vs. distancia, se

calcularon los parámetros de fracturabilidad, dureza, adhesividad, cohesividad y elasticidad de los geles.

Se ensayaron 4 replicaciones por muestra calculándose los valores medios y su desviación standard.

22. Análisis estadístico de los resultados.

Los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) (Statistix, 1996) y (SYSTAT, 1990). La comparación de las medias de varios tratamientos, se realizó con el test de diferencia menos significativa (LSD) a un grado de significación ($\alpha= 0,05$).

CAPITULO I

AISLADOS Y FRACCIONES PROTEICAS DE AMARANTO

Tal como se describió previamente (ver ítem 6 Introducción), los tratamientos térmicos a los que habitualmente son sometidos los aislados proteicos para su incorporación en productos alimenticios, afectan la funcionalidad de los mismos.

Con el objeto de estudiar los efectos que el tratamiento térmico produce sobre los aislados proteicos de amaranto, realizamos distintas experiencias para cuantificar los cambios que pueden producirse en las características estructurales de las fracciones proteicas que integran los aislados y explicar los efectos que los mismos tienen sobre la capacidad de gelificación. También se analizó el efecto del tratamiento térmico sobre las albúminas y globulinas con el propósito de dilucidar cual de dichas fracciones sería la principal responsable de los cambios detectados en los aislados.

Sobre la base de estudios previos realizados en nuestro laboratorio, (Martínez y Añón, 1996); seleccionamos dos condiciones de extracción de las proteínas, pH 9 y 11, seguida por una precipitación a pH 5. Estos aislados los denominamos A9 y A11, por el pH utilizado en su extracción. Martínez y Añón (1996; 1997) demostraron que el aislado A9 contiene las fracciones globulina-P, globulina 11S y albúminas, mientras que el aislado A11 está formado principalmente por las fracciones globulina 11S y glutelinas.

Para conocer la composición polipeptídica y las modificaciones que pudieran tener lugar luego del tratamiento térmico de los aislados proteicos (A9 y A11) y de dos de las principales fracciones proteicas en estudio (albúminas y globulinas), se realizaron electroforesis mono y bidimensionales, en geles de poliacrilamida en condiciones nativa y desnaturizante.

Mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), evaluamos el grado de desnaturalización y la estabilidad térmica de los aislados proteicos antes y después del tratamiento térmico; y las diferencias de comportamiento térmico y contribución de las distintas fracciones proteicas (albúminas, globulinas y glutelinas), a los aislados A9 y A11 de amaranto. Estas diferencias podrían corresponderse con diferentes propiedades funcionales de los aislados.

Es sabido que los aminoácidos aromáticos presentan picos característicos en la región ultravioleta (UV). Por medio de dicha propiedad se evaluaron las diferencias del contenido de residuos aromáticos en los aislados (A9 y A11) y en las fracciones albúminas y globulinas; y los cambios conformacionales asociados al tratamiento térmico.

Los cambios producidos a nivel de la estructura cuaternaria y terciaria de las proteínas de los aislados A9 y A11 y de las fracciones albúminas y globulinas, se estudiaron utilizando espectroscopia de fluorescencia, mientras que mediante la

espectroscopia FT-Raman se evaluaron los cambios conformacionales a nivel de la estructura secundaria de las proteínas de dichos aislados y fracciones, bajo distintas condiciones de tratamiento térmico.

La hidrofobicidad superficial de las proteínas es esencial para entender la funcionalidad de las proteínas. Hay muchos estudios en proteínas, que demuestran la importancia de la superficie hidrofóbica en las propiedades hidrodinámicas como la solubilidad (Li-Chan y col., 1984; Nakai y col., 1986). La superficie hidrofóbica de las proteínas determina la tendencia de las moléculas proteicas a agregarse y por lo tanto a perder solubilidad. Las medidas de hidrofobicidad superficial de los aislados de amaranto nos permitieron evaluar el comportamiento de los grupos hidrofóbicos durante el tratamiento térmico, en donde por lo general dichos grupos se exponen por acción del calor y luego forman agregados.

Las proteínas exhiben muchas propiedades funcionales, una de las más importantes es la solubilidad. Mediante las medidas de solubilidad de los aislados proteicos (A9 y A11) y de las fracciones albúminas y globulinas pudimos caracterizar las modificaciones de la fracción soluble de las proteínas y la formación de agregados por acción del tratamiento térmico.

1. Composición centesimal de la harina de amaranto.

La harina original utilizada poseía un $20,0 \pm 1,3$ % de proteínas; $64,0 \pm 2,4$ % de hidratos de carbono; $6,5 \pm 0,8$ % de lípidos; $3,0 \pm 0,2$ % de cenizas; $12,4 \pm 0,1$ % de humedad; respondiendo a la composición habitual de una harina desgrasada de amaranto, la cual se caracteriza por poseer un mayor contenido proteico que la proveniente de los cereales (National Research Council, 1984).

2. Caracterización de los aislados proteicos de amaranto.

Las semillas de amaranto poseen proteínas de diferente solubilidad en proporciones comparables (Segura-Nieto y col., 1994). Esta característica permite obtener, variando las condiciones de extracción y precipitación, aislados que contengan distintas proporciones de las diferentes fracciones de proteínas (Martínez, 1997). La utilización de estos aislados en la formulación de alimentos no solo dependerá de su alto valor nutricional sino también de sus propiedades funcionales, las que están relacionadas a las características estructurales

de las proteínas que los componen (Paredes-López y col., 1988; Soriano-Santos y col., 1992).

Basándose en esto preparamos aislados extrayendo las proteínas a pHs 9 y 11, precipitándolas a pH 5, y liofilizando a pH 7; y realizamos la caracterización molecular de los mismos. De ahora en adelante llamaremos a estos aislados A9 y A11. El rendimiento en g de un aislado liofilizado por cada 100 g de harina, aumenta con el pH de extracción (Paredes-López y col., 1988; Soriano-Santos y col., 1992; Martínez, 1997). En el caso del aislado A9 y A11 el rendimiento obtenido fue $9,3 \pm 1$ y 12 ± 1 g de aislado/100g de harina, respectivamente.

El aislado A9 contenía $92,0 \pm 1,1$ % de proteínas en base seca, $10,0 \pm 0,9$ % de humedad y $2,7 \pm 0,3$ de hidratos de carbono en base seca. Por su parte el aislado A11 poseía una concentración proteica de $98,2 \pm 0,8$ % en base seca, $10,0 \pm 0,9$ % de humedad y $2,5 \pm 0,4$ % de hidratos de carbono en base seca. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Martínez y Añón (1996).

A efectos de analizar la composición polipeptídica de los aislados se llevaron a cabo electroforesis en condiciones nativas y desnaturalizantes. En las corridas electroforéticas efectuadas en condiciones nativas en ausencia de 2-ME (figura 1), se observó que el aislado A9 presenta tres bandas proteicas de diferente movilidad, con $R_f = 0,38$ (flecha roja); $0,61$ (flecha azul) y $0,90$ (flecha verde), respectivamente; y material retenido al comienzo del gel separador. La banda de menor movilidad es ancha, no pudiéndose descartar la posibilidad de que exista más de una especie polipeptídica que contribuya a la misma. En el aislado A11 se observó con mayor claridad una nueva banda de menor movilidad ($R_f = 0,27$) (flecha negra), probablemente debida a especies de mayor masa molecular, además de las tres bandas presentes en el aislado A9 ($R_f = 0,38$; $0,61$ y $0,90$).

El perfil electroforético en condiciones nativa (PAGE-Nativo), de la fracción globulina presentó una banda ancha de $R_f = 0,4$, mientras que las glutelinas mostraron dos bandas de $R_f = 0,25$ y $0,35$ (Martínez, 1997).

En presencia de 2-ME, en ambos casos (A9 y A11), pudo observarse una banda principal definida ($R_f = 0,38$) (flecha roja), y otra menos intensa de mayor movilidad ($R_f = 0,57$), (flecha azul), además de material que no entra al gel (figura 1). Los resultados indican que a pH 11 se extraen especies proteicas de mayor masa molecular y/o mayor carga; muy probablemente se trate de agregados estabilizados por puentes disulfuro dado que en presencia de 2-ME no son detectados.

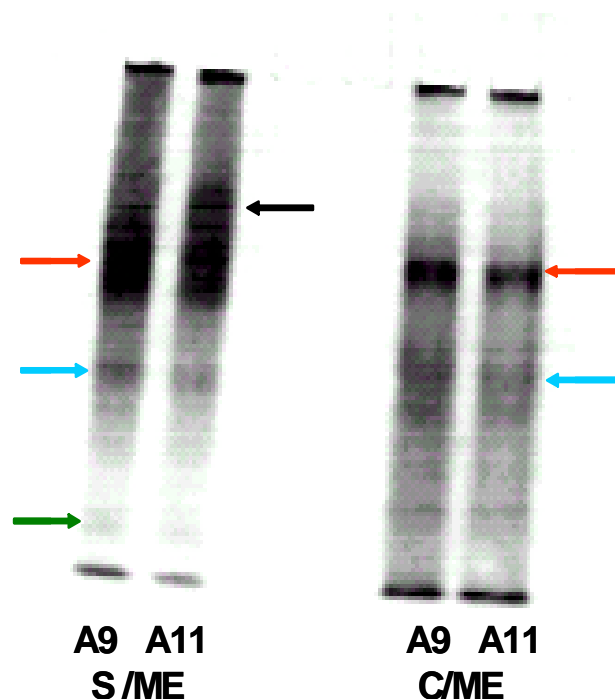


Figura 1. PAGE-Nativo. Perfil electroforético de los aislados A9 y A11, en condiciones nativas con y sin 2-ME.

En los perfiles correspondientes a ambos aislados obtenidos en condiciones desnaturalizantes no-reductoras se puede observar la presencia de agregados de alta masa molecular que no entran al gel separador, además de especies proteicas de: 85 ± 1 ; 77 ± 2 ; 68 ± 2 ; 55 ± 2 ; 52 ± 2 ; 41 ± 2 ; 34 ± 1 ; 30 ± 1 ; 19 ± 2 ; 16 ± 1 kD (figura 2 a).

El aislado A9, en condiciones reductoras, presentó especies polipeptídicas de masa molecular: 68 ± 2 ; 54 ± 2 ; 41 ± 2 ; 34 ± 1 ; 30 ± 1 ; 24 ± 1 ; 20 ± 1 y 16 ± 1 kD (figura 2 b). En el aislado A11 se pudieron observar los mismos péptidos más una octava especie polipeptídica de 85 ± 1 kD (flecha roja), (figura 2 b). La ausencia de especies polipeptídicas de alta masa molecular en ambos aislados, revela la existencia de agregados proteicos estabilizados por puentes disulfuro.

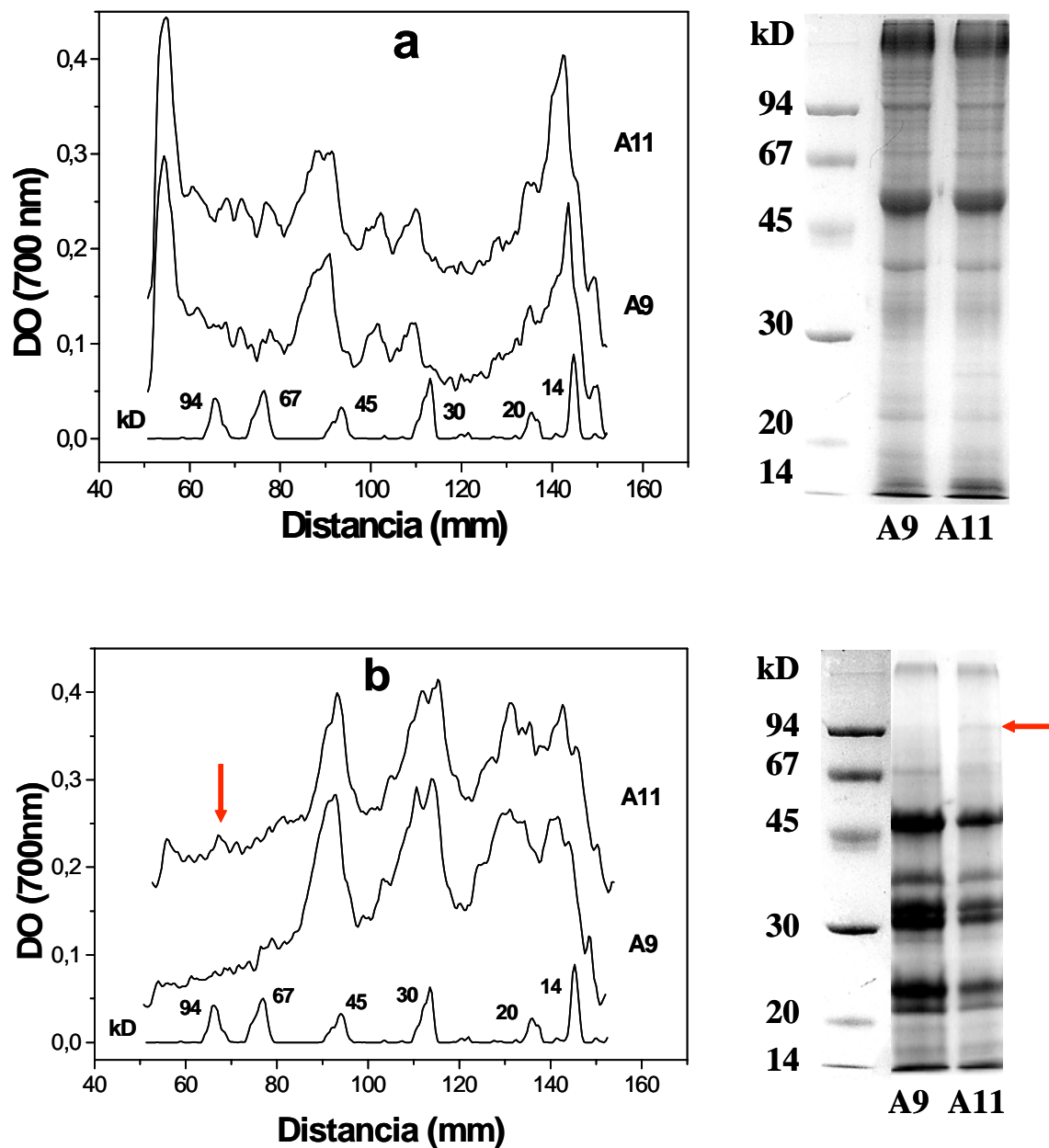


Figura 2. PAGE-SDS. Perfiles electroforeticos con sus correspondientes densitogramas de los aislados A9 y A11, (a) sin 2-ME (b) con 2-ME. kD: patrón de masas moleculares.

En la figura 3 a y b, se muestran los perfiles bidimensionales, PAGE-Nativo→SDS-PAGE de los aislados A9 y A11. Ambos aislados muestran el mismo perfil con varias bandas de menor movilidad y abundante proteína en la zona de siembra. Las especies polipeptídicas predominantes son las de 52 kD (flecha negra) y 56 kD (flecha roja) y los polipéptidos de alta masa molecular. Los polipéptidos de alta masa molecular corresponden a agregados de aproximadamente 240 kD, formados por polipéptidos de $81 \pm$

2 kD (flecha verde), 67 ± 2 kD (flecha azul), 41 ± 2 kD (flecha naranja), 27 ± 2 kD (flecha rosa), 22 ± 2 kD (flecha marrón) kD, y agregados de 160-150 kD, formados por los mismos polipéptidos que los agregados de 240 kD menos el de 81 kD.

En los perfiles bidimensionales, PAGE-SDS→SDS+2-ME-PAGE de ambos aislados (A9 y A11), mostrados en la figura 3 c y d, se observaron agregados solubles de 160-150 kD formados por polipéptidos de 67 ± 2 , 43 ± 2 , 27 ± 2 y 22 ± 2 kD (flecha roja); subunidades diméricas de 52 y 56 kD constituidas por polipéptidos 34-30 kD y 22-18 kD (flecha negra), monómeros de 56-54 kD (flecha verde); 45-40 kD (flecha azul); y polipéptidos de baja masa molecular (< 20 kD).

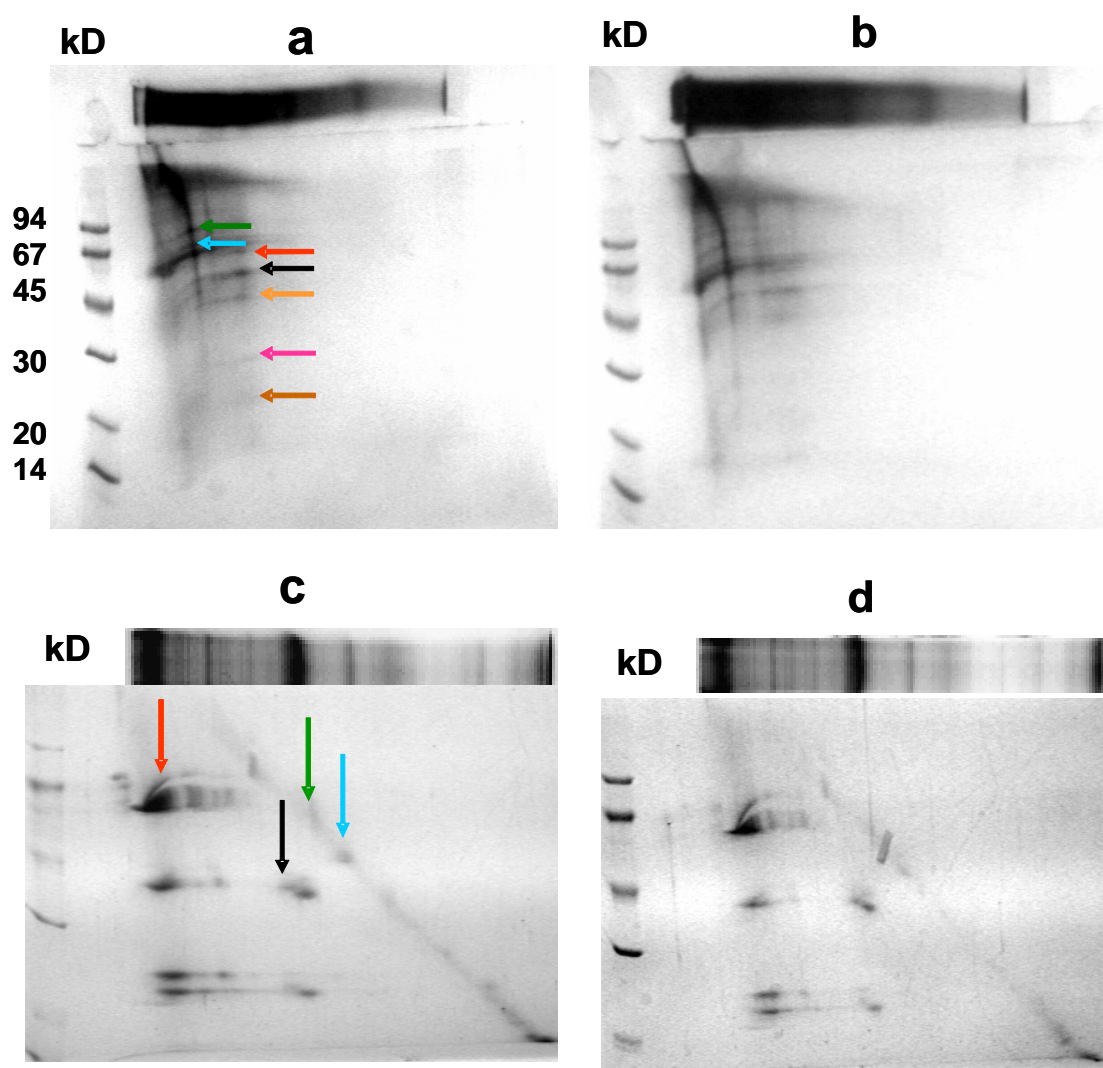


Figura 3 Electroforesis bidimensional PAGE-Nativo→SDS-PAGE, (a) aislado A9 y (b) aislado A11. Electroforesis bidimensional PAGE-Nativo→SDS + 2-ME-PAGE, (c) aislado A9 y (d) aislado A11. Primera dimensión, geles poliacrilamida 7 %; segunda dimensión geles poliacrilamida 12 %. kD: patrón de masas moleculares.

De acuerdo a resultados obtenidos por Marcone y Yada, (1991; 1992), las subunidades polipeptídicas de la fracción globulina 11S de amaranto presentes en condiciones no reductoras poseen masas moleculares de 75, 62, 56, 52, 46, 39 y 38 kD. En condiciones reductoras estos polipéptidos están prácticamente ausentes, por lo que se ha propuesto que los mismos están formados por polipéptidos más pequeños de 37-31, 26-20 y 14 kD, unidos por puentes disulfuro.

Martínez y col., (1997), informaron que los perfiles electroforéticos en condiciones desnaturizantes no reductora de la fracción globulina-P presentan varias especies de alta masa molecular (> 67 kD), denominadas subunidades agregadas (SA), polipéptidos de 52 y 56 kD, y una baja proporción de proteínas de masas moleculares entre 35 y 20 kD. En condiciones reductoras dicha fracción presentó monómeros no dissociables de 56, 36, 31, 26 y 22 kD (Castellani, 2000). Las subunidades agregadas (SA), estaban integradas por subunidades diméricas (D), constituidas por polipéptidos de 34-31 kD unidos covalentemente a polipéptidos de 26-20 kD, y por el polipéptido de 56 kD que se encuentra en mayor proporción en la globulina-P.

En la fracción glutelina de amaranto se ha descrito, en condiciones desnaturizantes no reductoras y reductoras, la presencia de polipéptidos con masas moleculares entre 67-50 kD, 38-30 kD y 28-20 kD, además de subunidades agregadas que no entran al gel. La disminución de agregados de alta masa molecular, en condiciones reductoras, indicó que los mismos eran oligómeros unidos por enlaces disulfuro (Vasco-Méndez y Paredes-López, 1995; Gorinstein y col., 1998).

En base a los resultados obtenidos en las electroforesis realizadas en condiciones nativa y desnaturizante de los aislados A9 y A11, y teniendo en cuenta la composición polipeptídica de las fracciones proteicas descrita por otros autores podemos concluir que los aislados estarían constituidos principalmente por las fracciones globulina 11S, globulina-P y glutelinas. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente por Martínez (1997).

Una vez conocida la composición polipeptídica de los aislados en estudio procedimos a determinar sus características estructurales. Mediante el análisis térmico pudimos evaluar inicialmente la diferente contribución de cada fracción proteica, su estabilidad térmica y grado de conformación.

Resultados obtenidos con anterioridad (Martínez y Añón, 1996) han mostrado que la fracción albúmina presenta una sola endoterma a 64 °C, la fracción purificada de globulina-P muestra una única endoterma a 94 °C; la fracción de globulina 11S dos endotermas a 69 °C y a 94 °C siendo la segunda de mayor magnitud; en tanto que la fracción de glutelinas muestra dos endotermas a 70 °C y a 96 °C con prevalencia de la primera de ellas. La endoterma de mayor Td corresponde a estructuras de estabilidad térmica semejantes a globulinas y globulina-P. En el caso de globulina cruda de amaranto la temperatura de desnaturalización (Td), es de 101 °C, que corresponde al componente globulínico mayoritario (globulina 11S) (Gorinstein y col., 1996a). La alta temperatura de desnaturalización podría ser consecuencia de la presencia de un alto número de interacciones hidrofóbicas consolidando su estructura (Martínez, 1997).

Los estudios anteriormente mencionados han también indicado que las albúminas presentan una baja entalpía de desnaturalización ($\Delta H = 2,2$ J/g). Esto indicaría que las proteínas poseen una conformación con baja energía de enlace o que se produce agregación durante el calentamiento. Por otro lado, el valor de la entalpía de desnaturalización de la fracción globulina ($\Delta H = 8$ J/g) es menor al de globulina-P ($\Delta H = 17,5$ J/g), mientras que el de glutelinas ($\Delta H = 8,5$ J/g) es menor que el de globulina-P y similar al de globulinas (Martínez, 1997).

Los termogramas de A9 y A11 obtenidos en este trabajo exhibieron dos endotermas (tabla 3), la primera se corresponde con la desnaturalización de la fracción glutelina y del componente minoritario de la fracción globulinas (7S), y la segunda a las globulinas 11S, globulinas-P y glutelinas. En A9 predomina la segunda endoterma, mientras que en A11 ambas endotermas contribuyen de manera casi igualitaria al termograma, lo cual indicaría una mayor proporción de globulinas en el aislado extraído a pH 9 y de glutelinas en el correspondiente a pH 11.

La entalpía de desnaturalización decreció al aumentar el pH de extracción de las proteínas, siendo iguales a $6,2 \pm 0,3$ y $2,9 \pm 0,2$ mJ/mg para el aislado A9 y A11 respectivamente; esto se debería a un mayor desplegamiento de las proteínas a pH alcalino y a la presencia de mayor contenido de glutelinas (ΔH inferior a globulina-P) en el aislado A11 (Martínez, 1997). Resultados similares respecto al comportamiento térmico de los aislados A9 y A11 de amaranto fueron obtenidos por Martínez (1997).

Cabe indicar que los máximos de absorbancia en la región del espectro UV para ambos tipos de aislados se encontraron a 260 nm, y no a 280 nm. Esto podría deberse a la presencia de ácidos nucleicos que interfieren en la absorbancia de las proteínas. Las medidas de absorbancias dan idea del contenido de aminoácidos aromáticos expuestos en las proteínas, y consecuentemente del estado conformacional de las mismas. El aislado A11 presentó una absorbancia aproximadamente 2 veces menor a la correspondiente al aislado A9, (tabla 3), indicando un menor número de aminoácidos aromáticos expuestos debido probablemente a la diferente composición aminoacídica de las fracciones proteicas presentes. Esta última consideración es válida en la medida que el pH de extracción proteico no modifique la cantidad de ácidos nucleicos extraídos, y por consiguiente la absorbancia en el UV corresponda exclusivamente a proteínas.

Las diferencias encontradas entre los aislados proteicos A9 y A11, en cuanto a la composición polipeptídica, la proporción de las fracciones proteicas y el estado conformacional, fueron confirmadas al determinar las características de superficie de las proteínas presentes en los mismos y su solubilidad en agua.

Las proteínas del aislado A11 presentaron una menor hidrofobicidad superficial (H_0) que las del aislado A9, lo que indica diferencias en los residuos de aminoácidos no polares expuestos al medio (tabla 3). Castellani y col., (2000), mostraron que la fracción globulina-P, y globulina 11S de amaranto presentan una alta hidrofobicidad, siendo el valor de la primera el doble de la segunda. A su vez dichas fracciones presentaron una hidrofobicidad mayor que las globulinas 11S de soja. Esta diferencia de hidrofobicidad entre los aislados está de acuerdo al mayor contenido de la fracción globulina (11S y P), en el aislado A9 y su mayor contenido en aminoácidos aromáticos. Por otro lado en el aislado A11 al estar más desnaturizado que el aislado A9, debido a las condiciones de extracción empleadas, los residuos hidrofóbicos expuestos podrían haber interactuado entre sí y formado agregados.

La solubilidad de las proteínas en agua es indicativa del grado de desnaturización y agregación de las proteínas, en general se observa que a mayor solubilidad menor desnaturización y consecuentemente menor agregación. De acuerdo a los resultados obtenidos la solubilidad del aislado A9 es prácticamente dos veces a la del aislado A11 (tabla 3). La menor solubilidad de A11 es coincidente con su menor entalpía de desnaturización térmica y su menor hidrofobicidad superficial, justificable por las diferencias del pH de extracción. Los pHs de extracción de proteínas superiores a 9 ejercen efectos desnaturizantes (Hermansson, 1978; Arntfield y Murray, 1981). A su vez las

proteínas vegetales tienen tendencia a formar agregados durante los procesos de precipitación y liofilización (Arntfield y col., 1990).

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos de los aislados proteicos de amaranto.

| | % proteína | Td (°C) | ΔH (mJ/mg) | DO $\lambda=260\text{nm}$ | H_0 IF x $\mu\text{g/ml}$ | S % |
|------------------------|----------------|----------------------------------|-----------------------|------------------------------|--------------------------------|------------|
| Aislado A9 | 92,0 \pm 1,1 | 69,9 \pm 0,3 98,8 \pm 0,3 | 6,2 \pm 0,3 | 1,5 \pm 0,01 | 1,6 \pm 0,07 | 90 \pm 2 |
| Aislado A11 | 98,2 \pm 0,8 | 69,4 \pm 0,3 102 \pm 0,3 | 2,9 \pm 0,2 | 0,9 \pm 0,02 | 1,3 \pm 0,05 | 50 \pm 2 |

3. Efecto del tratamiento térmico en aislados y fracciones proteicas de amaranto.

3.1 Caracterización estructural de dispersiones proteicas

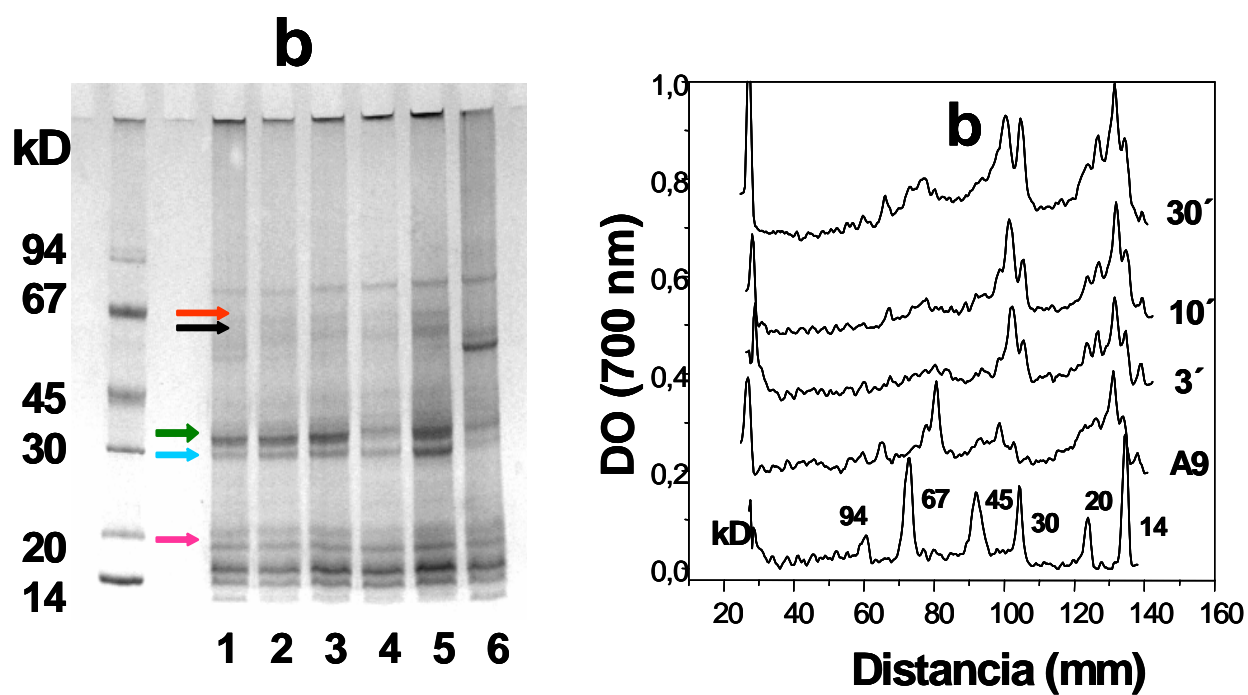
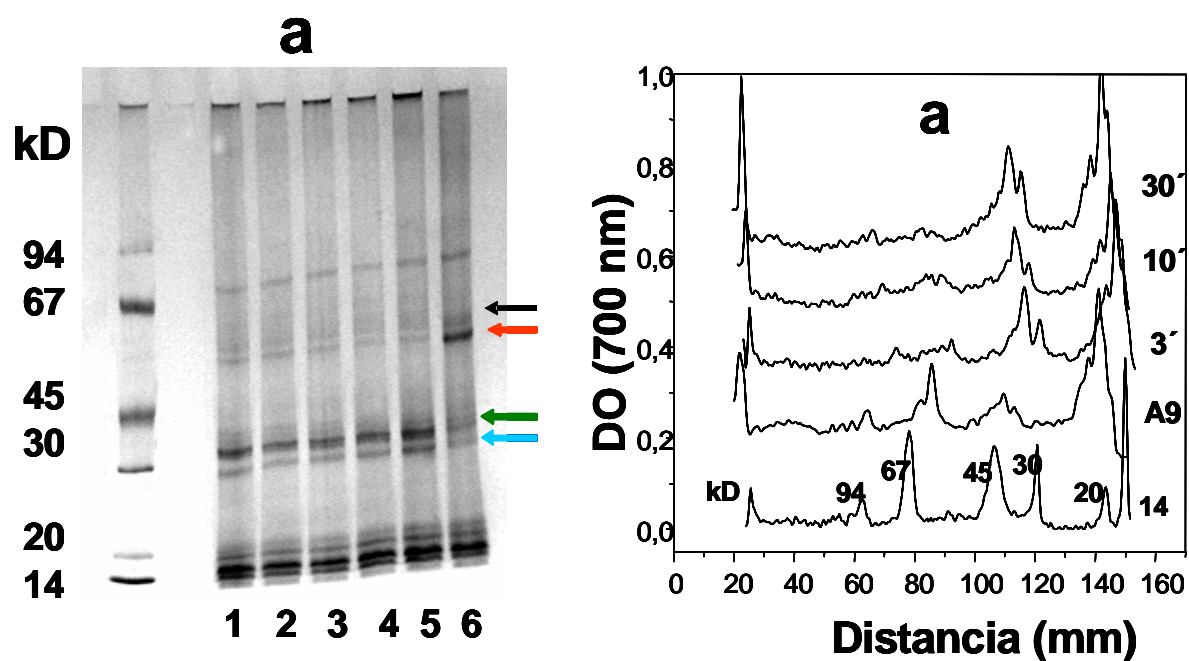
3.1.1 Análisis electroforético.

Los liofilizados de los aislados A9 y A11 (0,1 % p/v), tratados térmicamente a 70 y 90 °C durante diferentes tiempos, se caracterizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, tratando o no a las muestras antes de la siembra con 2-ME. El objetivo de estos ensayos fue determinar la naturaleza y la proporción de los polipéptidos y agregados formados durante el tratamiento térmico en dichos aislados.

En el caso del aislado A9, en condiciones no reductoras, a 70 °C (figura 4 a), se observó una disminución de la intensidad de las bandas correspondientes a los polipéptidos de 56 \pm 2 kD (flecha negra) y 52 \pm 2 kD (flecha roja); (monómeros) y un ligero aumento de las especies proteicas de 31-33 kD (flecha verde), y 28 \pm 2 kD (flecha azul), a medida que aumentó el tiempo de calentamiento. A 90 °C (figura 4 b), fue posible observar la presencia de agregados solubles de alta masa molecular, alguno de los cuales no penetraron en el gel separador. A tiempos superiores a 3 minutos de calentamiento se detectó la desaparición de las especies polipeptídicas de 56 y 52 kD, la aparición de especies proteicas de 64 \pm 2 kD (flecha roja) y 59 \pm 2 (flecha negra), y la intensificación de las bandas correspondientes a los polipéptidos de 34 \pm 2 kD (flecha verde), 29 \pm 2 kD (flecha azul), y 22-18 kD (flecha rosa). Estos cambios en el perfil electroforético sugieren la

formación de agregados, como consecuencia del tratamiento térmico, especialmente a 90 °C, así como una posible disociación de la subunidad AB, con la liberación de polipéptidos A y B, (Martínez, 1997). En condiciones reductoras, a ambas temperaturas y todos los tiempos de tratamiento ensayados, se obtuvo un perfil electroforético equivalente a la muestra no calentada a saber, polipéptidos de 70 ± 2 kD, 54 ± 2 kD, 41 ± 2 kD, 34 ± 2 kD, 30 ± 1 kD, 24 ± 2 kD, 20 ± 1 kD y 16-13 kD, y la desaparición de los polipéptidos de alta masa molecular que no entran al gel. Esto último estaría indicando la participación de uniones disulfuro en la formación de los agregados solubles e insolubles, como consecuencia del tratamiento térmico, además de uniones de tipo no covalente (puente hidrógeno e hidrofóbicas), (datos no mostrados).

Para el aislado A11 tanto a 70 como a 90 °C, fue posible detectar en el perfil electroforético obtenido bajo condiciones no reductoras (figura 4 c y d), la aparición de especies proteicas de alta masa molecular solubles, efecto que tuvo mayor incidencia a 90 °C y tiempos de calentamiento prolongados. Además se pudo observar que a tiempos prolongados (15 y 30 minutos) de tratamiento térmico a 70 °C y a todos los tiempos a 90 °C, las bandas correspondientes a los polipéptidos de 56 ± 2 (flecha negra) y 52 ± 2 kD (flecha roja) no aparecen; y se intensifican las bandas correspondientes a los polipéptidos de 33-31 kD (flecha verde), 29 ± 2 kD (flecha azul) y 22-18 kD (flecha rosa). Estos resultados indicarían que las principales especies proteicas que forman los agregados de alta masa molecular en el aislado A11, serían los polipéptidos de 56 y 52 kD, efecto que estaría acompañado por una disociación de las subunidades A y B. Los agregados de alta masa molecular, producto del tratamiento térmico, son más evidentes en el aislado A11 que en el aislado A9, a las dos temperaturas ensayadas. En condiciones reductoras, el perfil electroforético de las muestras tratadas térmicamente del aislado A11 no presentó modificaciones respecto al perfil correspondiente al aislado no tratado térmicamente. Dicho perfil concuerda con el mencionado anteriormente para el aislado A9; la única diferencia detectada fue la presencia de una especie proteica de 87 ± 2 kD, que no se encontró en las muestras del aislado A9, (datos no mostrados). En ambos aislados (A9 y A11), los agregados formados como consecuencia del tratamiento térmico, estarían parcialmente estabilizados por uniones disulfuro, tal como lo evidencian los perfiles electroforéticos obtenidos en presencia de 2-ME, donde se aprecian las mismas especies proteicas, en cantidad y calidad, tanto en las muestra calentadas como en las no calentadas (datos no mostrados).



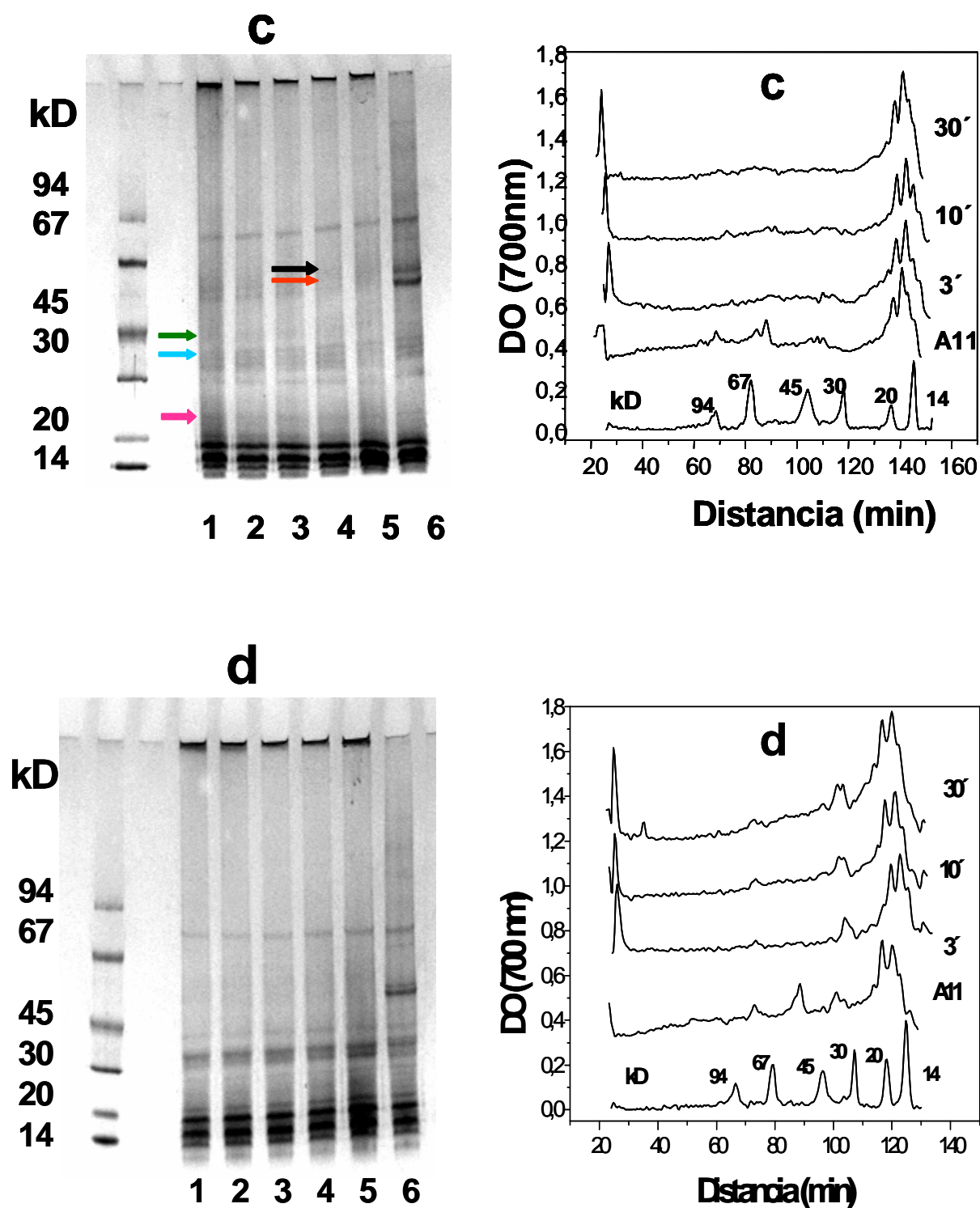


Figura 4. Perfiles electroforeticos (PAGE-SDS sin 2-ME) con sus correspondientes densitogramas. (a) A9 70 °C, (b) A9 90 °C. (c) A11 70 °C y (d) A11 90 °C. kD: patrón de masas moleculares. 1: 3 minutos de calentamientos, 2: 5 minutos de calentamiento, 3: 10 minutos de calentamiento, 4: 15 minutos de calentamiento, 5: 30 minutos de calentamiento, 6: aislado sin tratar.

A efectos de evaluar la incidencia de las fracciones de albúminas y globulinas en el comportamiento de los aislados, las mismas fueron sometidas a tratamientos térmicos equivalentes y analizadas mediante electroforesis.

En condiciones no reductoras, no se detectaron diferencias en la composición polipeptídica de la fracción albúmina total y soluble, (figura 5 a, calles 1 y 2). Se observan agregados de alta masa molecular que no entraron al gel separador, proteínas al comienzo del gel que corresponderían a agregados solubles también de alta masa molecular, especies proteicas mayores a 94 kD, polipéptidos de 67 ± 2 , 54-52, 45 ± 1 , 38-37, 35-34, 32 ± 2 , 30 ± 2 kD, y predominio de péptidos de bajo peso molecular (< 30 kD). Estos resultados concuerdan con el perfil PAGE-SDS de albúminas informado por Martínez y Añón, (1996), quienes indicaron que las albúminas están constituidas por varias especies proteicas de tamaños variados, principalmente entre 30 y 60 kD, péptidos menores a 30 kD y proteínas al comienzo del gel que corresponden a algún tipo de agregados.

Durante el tratamiento térmico de las albúminas a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, se observó que a medida que aumentaba el tiempo de calentamiento disminuía la intensidad de la banda correspondiente al polipéptido de 30 ± 2 kD (flecha negra) y de 20 ± 2 kD (flecha rosa), y en paralelo aumentaba la intensidad de las bandas correspondientes a los polipéptidos menores a 20 kD (flecha naranja) (figura 5 a, calles 3, 4, 5). A $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ no solo se detectó una menor intensidad de la banda de los polipéptidos de 30 y 20 kD más acentuada que a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, sino también la disminución de las intensidades de las bandas correspondientes a los polipéptidos de 35-34 (flecha azul); 32 (flecha verde) y 26-20 (flecha bordó) kD, principalmente a tiempos prolongados de calentamiento. Al igual que a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, se observó una mayor intensidad en la zona de los polipéptidos menores a 20 kD (flecha naranja), y además la formación de agregados de alta masa molecular que no entran al gel, la cual se incrementa con el aumento del tiempo de calentamiento (figura 5 a, calles 6, 7, 8).

En el perfil electroforético en condiciones reductoras de las muestras de albúminas tratadas y no tratadas térmicamente, no se observaron diferencias respecto al obtenido en condiciones no reductoras, lo que indica que la mayoría de los polipéptidos son monómeros no dissociables por ruptura de enlaces disulfuro (figura 5 b). Esto está de acuerdo con los perfiles bidimensionales de albúminas obtenidos al tratar con 2-ME una primera dimensión en SDS-PAGE, donde la mayoría de los polipéptidos son monómeros (datos no mostrados). Los agregados de alta masa molecular estarían estabilizados

principalmente por uniones de tipo no hidrofóbicas, ya que siguen apareciendo en dichas condiciones.

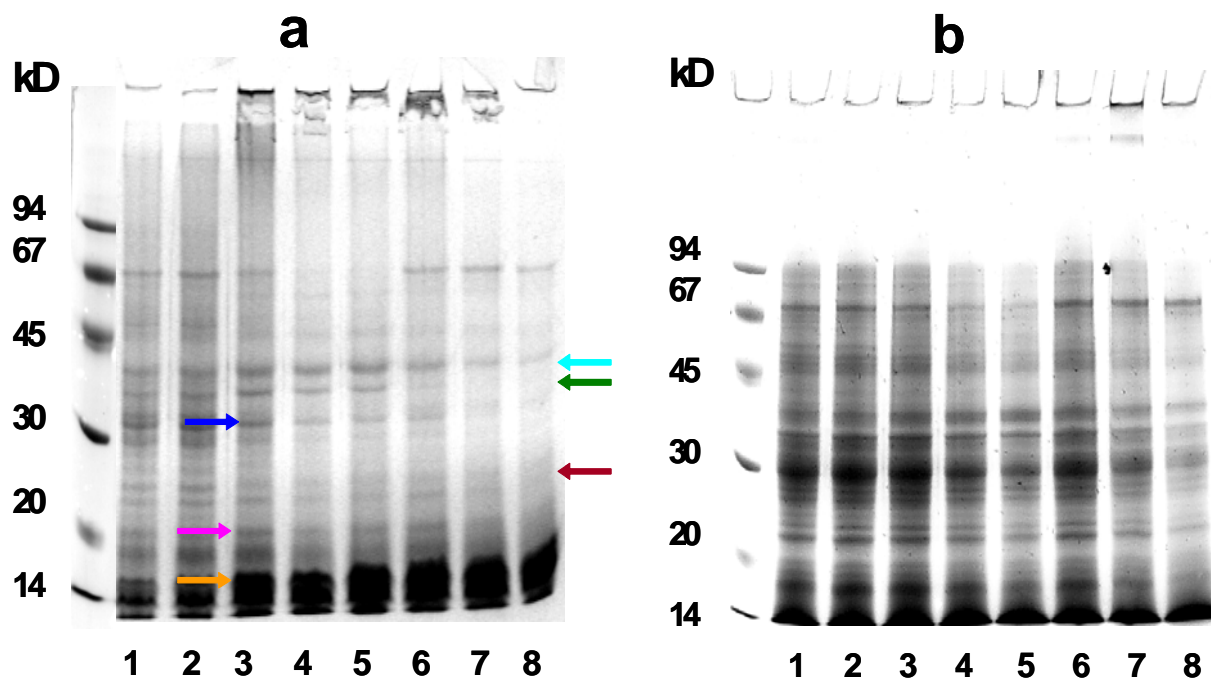


Figura 5. Electroforesis PAGE-SDS. a) en condiciones no reductoras y b) en condiciones reductoras de las fracciones solubles de albúminas tratadas térmicamente. kD: patrón de masas moleculares; 1) fracción total nativa; 2) sin tratar; 3) 5 minutos 70 °C; 4) 15 minutos 70 °C; 5) 30 minutos 70 °C; 6) 5 minutos 90 °C; 7) 15 minutos 90 °C; 8) 30 minutos 90 °C.

La figura 6 muestra los perfiles SDS-PAGE de las fracciones solubles de globulinas tratadas y no tratadas térmicamente. En ausencia de 2-ME, la fracción total (globulina cruda), y soluble de globulina presentan agregados solubles de alta masa molecular, polipéptidos de 94 ± 2 , kD, 70 ± 1 kD, 57 ± 2 kD, 53 ± 2 kD, 41 ± 2 kD, 34 ± 2 kD, 31 ± 1 kD y péptidos alrededor de 20-14 kD. Esta composición polipeptídica es similar a la ya informada por Barba de la Rosa y col., (1992a); Marcone y Yada (1992); Martínez (1997). El tratamiento térmico a 70 °C provocó, a medida que aumentó el tiempo de calentamiento, la formación de agregados de alta masa molecular que no entraron al gel separador (figura 6 a calles 3,4,5). No se observaron diferencias del resto de los polipéptidos de la fracción soluble, a los distintos tiempos de calentamiento. La adición de 2-ME, provocó la

desaparición de los agregados de alta masa molecular, presentes en todas las muestras (tratadas y no tratadas); lo cual estaría indicando la participación de uniones disulfuro en su formación. Se observó un aumento de la intensidad de las bandas correspondientes a los polipéptidos 34-31 kD (flecha azul) y 24-20 (flecha bordó) kD (figura 6 b), unidos por enlaces disulfuro, que constituyen las subunidades diméricas de 57 ± 2 kD (flecha negra) y 53 ± 2 kD (flecha roja), respecto a lo observado en condiciones no reductoras (figura 6 a).

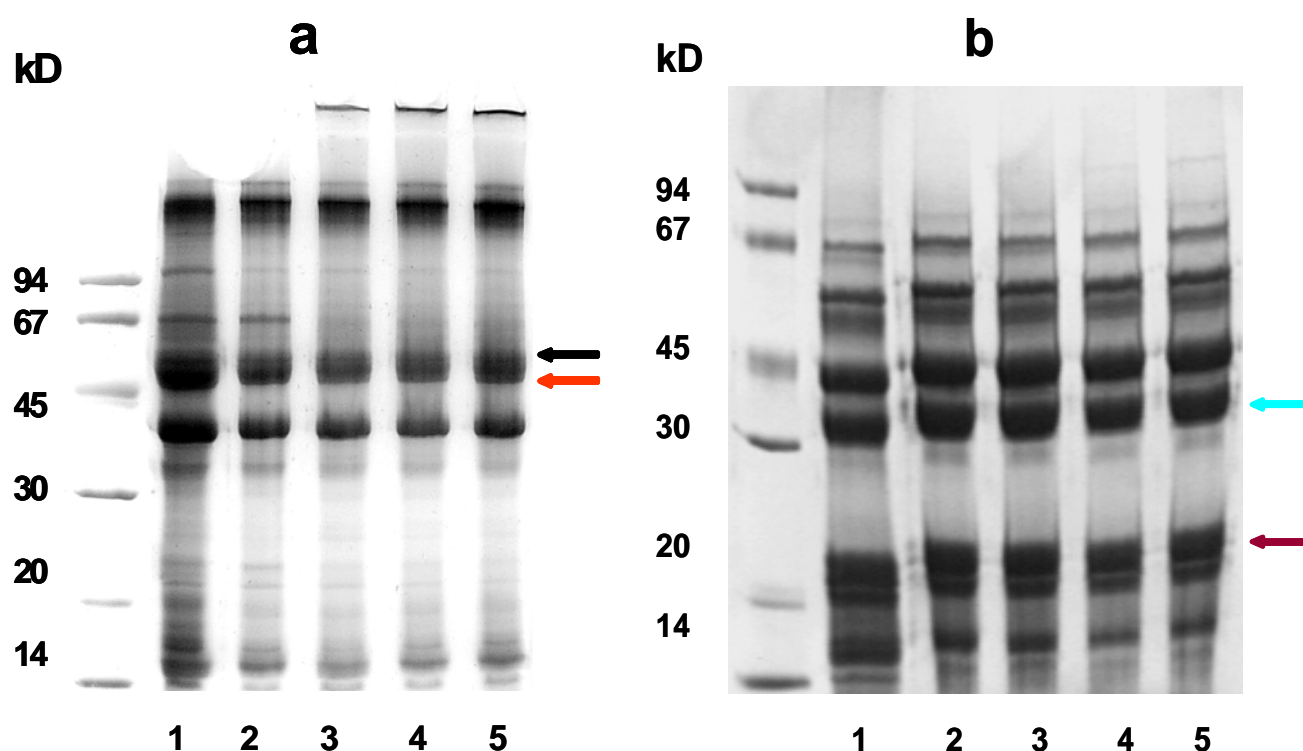


Figura 6. Electroforesis PAGE-SDS a) en condiciones no reductoras y b) en condiciones reductoras de las fracciones solubles de globulina tratadas térmicamente kD: patrón de masas moleculares; 1) fracción total sin tratar; 2) fracción soluble sin tratar; 3) fracción soluble 5 minutos 70 °C; 4) fracción soluble 15 minutos 70 °C; 5) fracción soluble 30 minutos 70 °C.

En condiciones no reductoras a 90 °C y tiempos prolongados de calentamiento se observó, en las muestras de globulinas, un incremento de los agregados que no entran al gel separador. Además se detectó una disminución de la intensidad de los agregados solubles de alta masa molecular, desaparición del polipéptidos de 94 kD (flecha marrón), y una menor intensidad de las bandas correspondientes a los polipéptidos de 57 ± 2 kD (flecha negra) y 53 ± 2 kD (flecha roja) (figura 7 a). En presencia de 2-ME, no se observaron cambios significativos durante el tratamiento térmico de las muestras, salvo un aumento de la intensidad de las bandas correspondientes a los polipéptidos 34-31 kD (flecha azul) y 24-20 kD (flecha bordó) (figura 7 b), respecto a lo observado en condiciones no reductoras (figura 7 a).

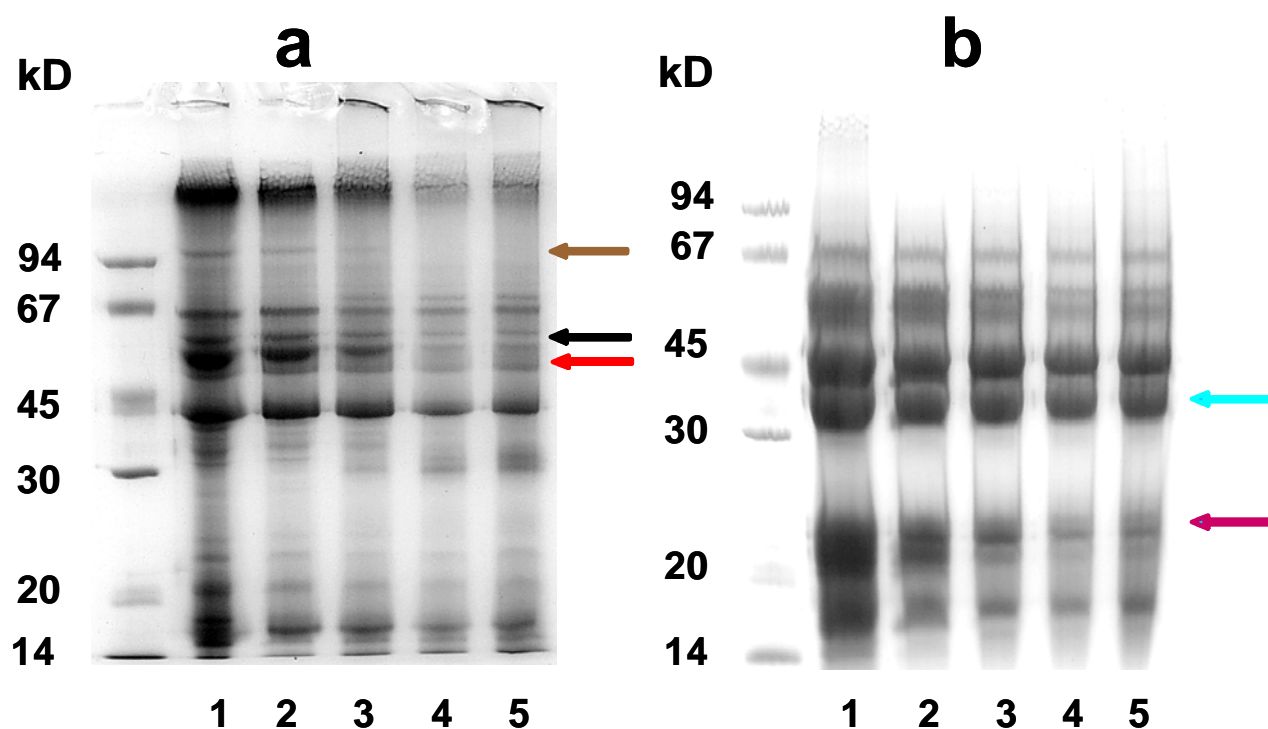


Figura 7. Electroforesis PAGE-SDS a) en condiciones no reductoras y b) en condiciones reductoras de las fracciones solubles de globulina tratadas térmicamente. kD: patrón de masas moleculares; 1) fracción total sin tratar; 2) fracción soluble sin tratar; 3) fracción soluble 5 minutos 90 °C; 4) fracción soluble 15 minutos 90 °C; 5) fracción soluble 30 minutos 90 °C.

En las electroforesis bidimensionales (PAGE-SDS→SDS+2-ME-PAGE), de las fracciones globulina total y soluble no tratadas térmicamente, (figura 8 a y b), se observaron polipéptidos de 34-31 kD y 24-20 kD (flecha roja), componentes de las subunidades intermedias de la globulina tipo 11S de amaranto de 57 ± 2 kD y 53 ± 2 kD. También se observaron polipéptidos de alta masa molecular formados por los polipéptidos de 67 ± 2 kD, 57 ± 2 kD, 34-31 kD, 24 ± 2 kD y 20 ± 1 kD (flecha verde), estabilizados mediante enlaces disulfuro. En la globulina 11S de soja también se ha detectado agregados de las subunidades intermedias unidos por enlaces disulfuro (Wolf, 1993).

El polipéptido de 57 ± 2 kD (flecha marrón), también aparece como monómero, en condiciones reductoras, al igual que el polipéptido de 70 ± 2 kD (flecha azul), y el polipéptido de 41 ± 1 kD (flecha negra), está constituido por dos polipéptido de 24-20 kD unidos por enlaces disulfuro. Los dímeros de polipéptidos básicos de 18 kD fueron informados en algunos casos para la glicinina de soja (Utsumi y col., 1980). Estos perfiles concuerdan con las características de las globulinas tipo 11S y 7S de amaranto, informados por Martínez (1997).

La diferencia más importante observada en los perfiles bidimensionales de las fracciones solubles de globulina tratadas térmicamente fue la disminución de la intensidad de los péptidos que constituyen los polipéptidos de alta masa molecular, principalmente a 90 °C, (figura 8 f, g, h). Los mismos pasarían a formar parte de agregados de mayor masa molecular que no entran al gel separador, como fue demostrado en los perfiles monodimensionales, (figura 7 a). Las bandas de los polipéptidos de 30-20 kD aparecen más intensas en la diagonal, lo cual indicaría que también están presentes como monómeros (figura 8 g,h), y que se liberan con el tratamiento térmico. El resto de los polipéptidos que constituyen la fracción globulina no presentaron modificaciones significativas con el tratamiento térmico.

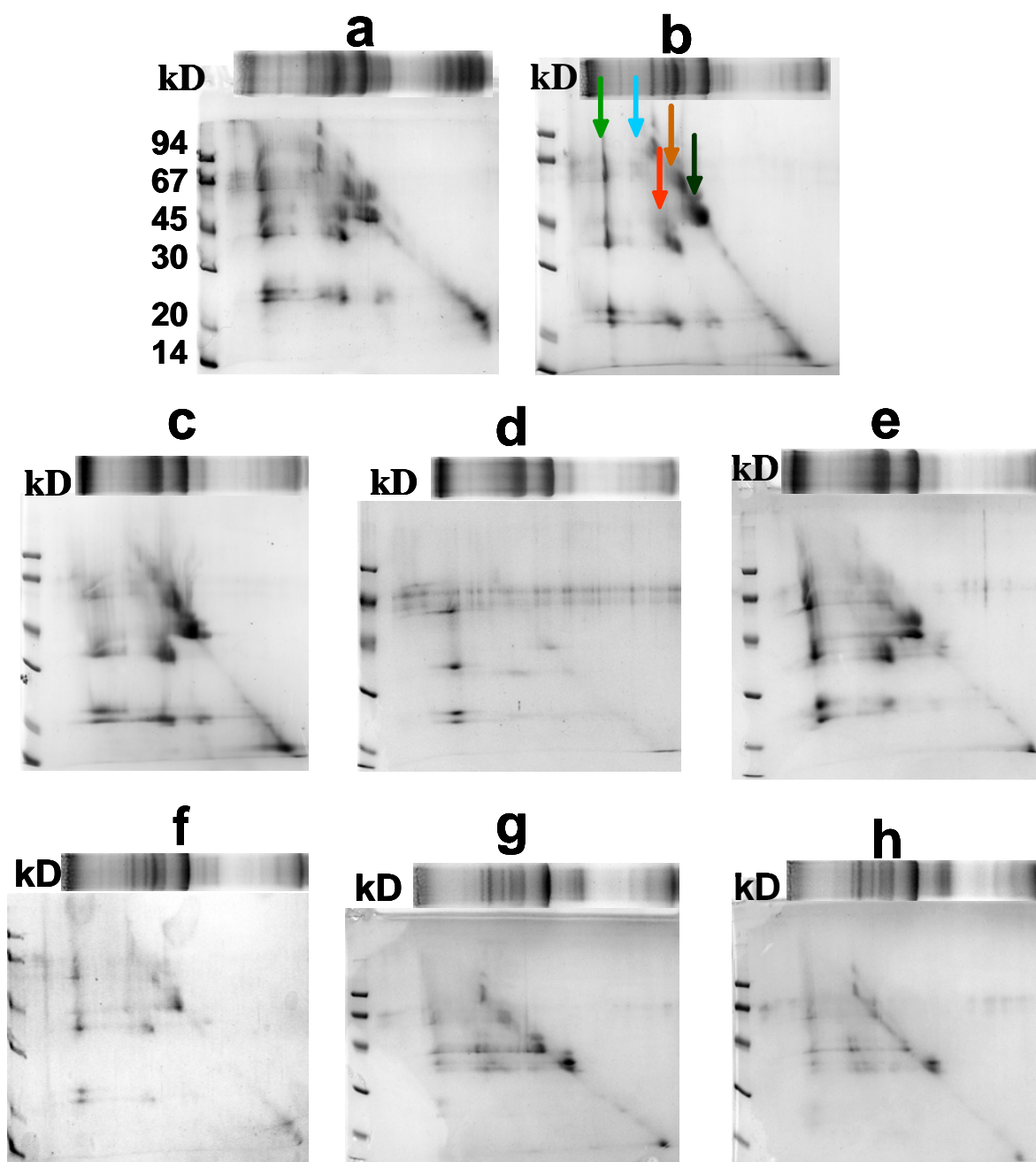


Figura 8. Electroforesis bidimensional PAGE-SDS→SDS+2-ME a) globulina nativa. b) globulina soluble sin tratar. c) globulina soluble 70 °C 5 minutos. d) globulina soluble 70 °C 15 minutos. e) globulina soluble 70 °C 30 minutos. f) globulina soluble 90 °C 5 minutos. g) globulina soluble 90 °C 15 minutos. h) globulina soluble 90 °C 30 minutos. kD: patrón de masas moleculares.

3.1.2 Análisis calorimétrico.

Los cambios conformacionales de la estructura cuaternaria y terciaria de las proteínas, que influyen en la funcionalidad de las mismas, se pueden determinar por calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Arntfield y col., 1990). Dicha técnica se basa en el análisis del proceso de desnaturalización o desplegamiento de la molécula de proteína inducido por el tratamiento térmico.

El análisis de un termograma nos permite determinar dos parámetros, (Martínez, 1997): la temperatura de transición o temperatura de desnaturalización (T_d) y el calor puesto en juego en la reacción o entalpía de desnaturalización (ΔH). La temperatura de desnaturalización refleja la termoestabilidad de la proteína, mientras que los cambios en la entalpía son función de la hidrofobicidad y/o hidrofiliidad de la molécula, número y tipos de uniones que estabilizan a la molécula, así como del grado de agregación (Arntfield y Murray, 1981).

Los termogramas obtenidos para todas las muestras analizadas, correspondientes tanto a los aislados A9 como A11 (0,1 % p/v), calentadas a 70 y 90 °C entre 3 y 30 minutos, mostraron una sola endoterma, (termograma 2 y 3), respecto a los aislados sin tratar, en los cuales se evidencian dos endotermas, (termograma 1) (figura 9 a y b). La mayor amplitud de la endoterma con el tratamiento térmico sugiere la existencia de distintas formas intermedias durante el proceso de desnaturalización lo que podría estar asociado a ruptura de uniones puente hidrógeno por efecto de la temperatura (Wang y Damodaran, 1991; Nagano y col., 1994a).

El análisis de dichos termogramas muestra un ligero incremento de la temperatura de desnaturalización (T_d), respecto del aislado sin calentar, cuando ambos aislados son calentados a 70 °C, ($102 \pm 0,3$ °C en A9 y $104 \pm 0,3$ °C en A11), incremento que se manifiesta a tiempos cortos de calentamiento (figura 10 a). A 90 °C los aislados responden de manera diferencial, mientras que el tratamiento térmico a tiempos cortos, sólo provoca un ligero aumento de la estabilidad térmica del aislado más alcalino (A11), en el aislado A9 se detecta un corrimiento progresivo de la T_d hacia mayores temperaturas, alcanzando un valor de $108 \pm 0,5$ °C al cabo de 30 minutos de calentamiento (figura 10 b). El incremento de la T_d durante el calentamiento estaría indicando un reordenamiento de las moléculas proteicas para formar una conformación compacta y ordenada, con mayor estabilidad térmica que las proteínas sin calentar. A su vez estas altas temperaturas sugieren que la cantidad de interacciones hidrofóbicas es elevada, ya que se ha encontrado

una correlación positiva entre éstas y la Td (Arntfield y Murray, 1981; Privalov y Khechinashvili, 1974; Konishi y Yoshimoto, 1989). Estas interacciones estarían consolidando la estructura de las proteínas a medida que aumenta el tiempo y temperatura de calentamiento, principalmente en el aislado A9.

El hecho que todos los termogramas obtenidos para las muestra calentadas, independientemente del aislado o del tratamiento efectuado, presenten una sola endoterma se debería a una desnaturalización total de las proteínas que contribuyen a la primer endoterma en las muestras control y/o a la formación de agregados, con una estabilidad térmica más elevada.

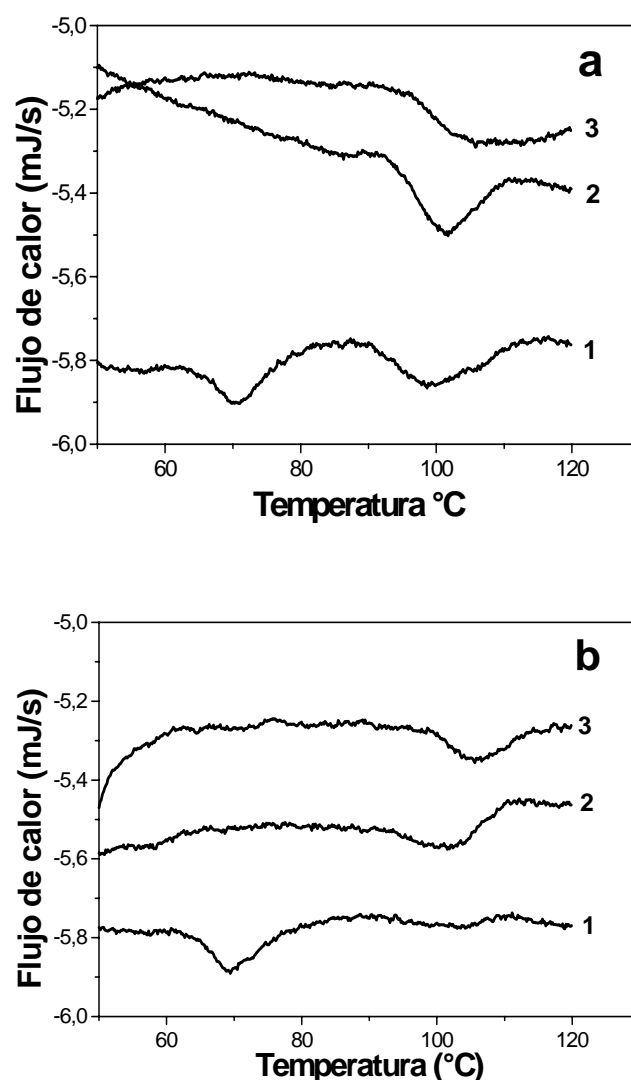


Figure 9. (a) Termogramas de los aislados A9 y (b) A11. (1) sin calentar, (2) calentado 15 minutos a 70 °C, (3) calentado 15 minutos a 90 °C.

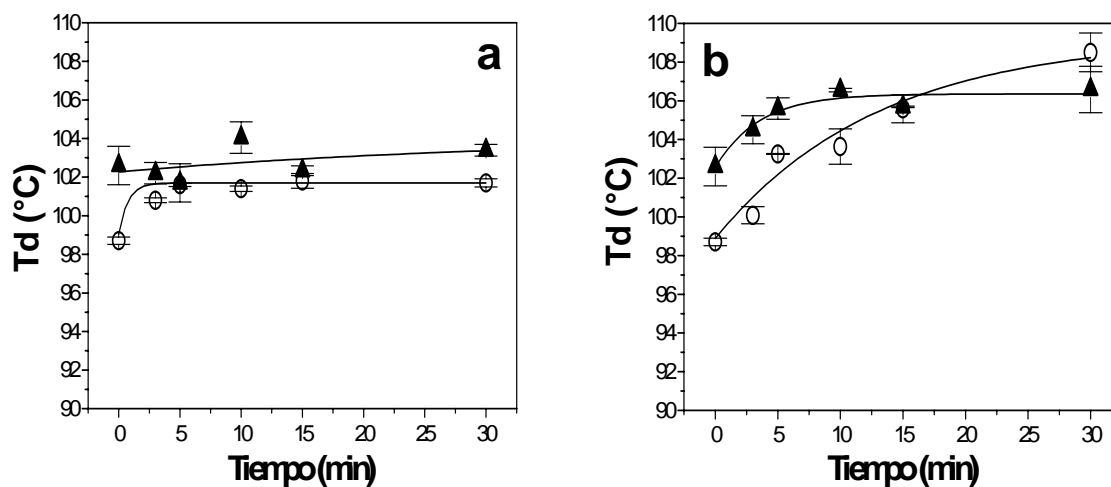


Figura 10. Temperatura de desnaturalización (T_d) en función del tiempo de tratamiento térmico (a) 70 °C y (b) 90 °C de los aislados (O) A9 y (▲) A11.

La figura 11 muestra la variación de la entalpía de desnaturalización y el grado de desnaturalización alcanzado para los aislados A9 y A11 durante el calentamiento a 70 y 90 °C respectivamente. Puede observarse que a la menor temperatura de tratamiento (70 °C), ambos aislados experimentan una reducción inicial de la entalpía de desnaturalización, la cual a partir de los 3-5 minutos de calentamiento se mantiene constante (figura 11 a). En estas condiciones ambos aislados se desnaturalizan aproximadamente un 30 % respecto al aislado sin calentar (figura 11 c). A 90 °C el aislado A9 experimenta un descenso más marcado de la entalpía de desnaturalización con el tiempo de calentamiento (figura 11 b); en estas condiciones el grado de desnaturalización alcanza un valor del 60 % al cabo de 5 minutos de calentamiento y de aproximadamente 80 % luego de 15 minutos (figura 11 d). En iguales condiciones el aislado A11 si bien experimenta una mayor desnaturalización que a 70 °C, el máximo grado de desnaturalización obtenido, fue de aproximadamente 55 % a los 30 minutos de calentamiento, valor sensiblemente inferior al obtenido para el aislado A9 (figura 11 d).

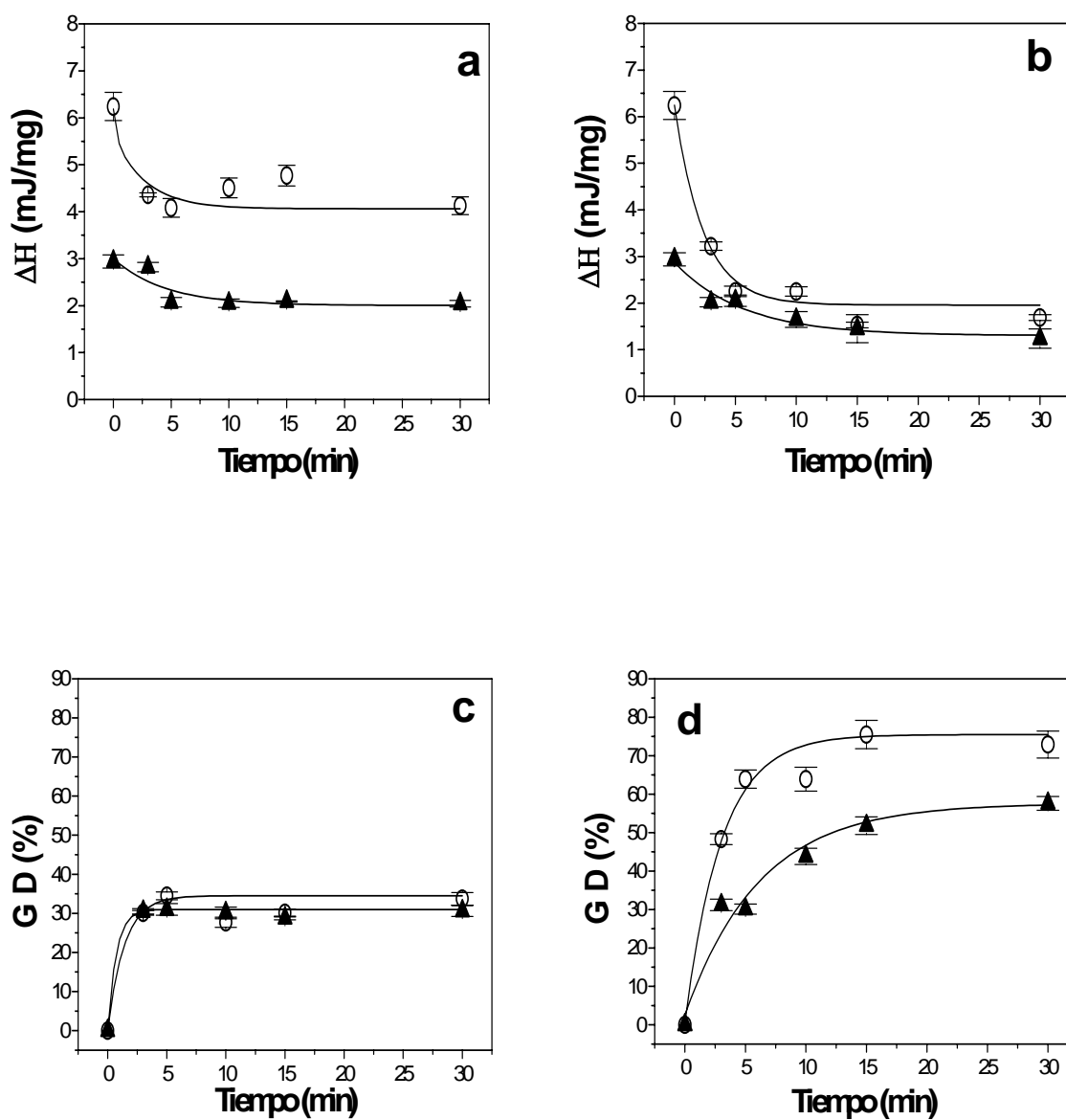


Figura 11. (a) Entalpía de desnaturalización (ΔH) en función del tiempo de tratamiento a 70 °C y (b) 90 °C de los aislados (○) A9 y (▲) A11. (c) Grado de desnaturalización en función del tiempo de tratamiento térmico a 70 °C y (d) 90 °C de los aislados (○) A9 y (▲) A11.

El calor puesto en juego durante el proceso de desnaturalización térmica es el resultado de la combinación de reacciones endotérmicas, como la ruptura de puente hidrógeno (Privalov y Khechinashvili, 1974); y de reacciones exotérmicas que incluyen la ruptura de interacciones hidrofóbicas, y la agregación de proteínas (Jackson y Brandts, 1970; Arntfield y Murray, 1981). La desnaturalización térmica de proteínas involucra la ruptura de puentes disulfuro que contribuyen con una $\Delta H = 25$ Kcal/mol y una insignificante ΔS ; mientras que la ruptura de uniones puente hidrógeno implican una $\Delta H = 4$ Kcal/mol y una $\Delta S = 0,012$ Kcal/mol, por molécula de proteína (Hamm, R. 1977; Arntfield y Murria, 1981). La ruptura de uniones puente hidrógeno durante la desnaturalización térmica de proteínas implica una disminución en el contenido de α -hélice en las proteínas desnaturalizadas (Kato y col., 1987). A su vez las uniones puente hidrógeno son las principales fuerzas involucradas en la estabilidad de las proteínas.

Gorinstein y col., (1996a) informaron que las globulinas de amaranto tratadas térmicamente a 100 °C, presentaron una progresiva disminución de la entalpía de desnaturalización (ΔH), indicando una desnaturalización parcial. Con respecto a la temperatura de desnaturalización (T_d), se observó un marcado incremento de la misma, lo cual sugiere la agregación de las globulinas y la formación de estructuras más compactas con alta estabilidad térmica.

Por otra parte Meng y col., (2002), encontraron que la entalpía de desnaturalización de globulinas de legumbres tratadas térmicamente a distintas temperaturas (80, 90 y 100 °C) y periodos de tiempo, disminuye debido a la formación de agregados solubles e insolubles con el calentamiento.

Basándose en nuestros resultados podríamos decir, que una disminución del valor de ΔH , evidencia la existencia de agregación y una mayor participación de interacciones hidrofóbicas en la estabilización de dichos agregados. Estos efectos revistieron mayor importancia en el aislado A9 cuando se lo trató a 90 °C. En el caso del aislado A11, éste presentó una menor sensibilidad al tratamiento térmico, hecho que puede ser atribuido al mayor desplegamiento inicial de las proteínas presentes en éste aislado ocasionado por el efecto del pH de extracción. Por lo tanto los tratamientos térmicos efectuados desnaturalizan las proteínas menos estables térmicamente, es decir las que corresponden a la primer endoterma.

3.1.3 Hidrofobicidad superficial.

La hidrofobicidad de las proteínas es una propiedad fisicoquímica que resulta de la relación entre la composición de aminoácidos hidrofóbicos y su ubicación espacial en la estructura proteica. Su influencia sobre propiedades funcionales ha sido ampliamente estudiada (Kato y Nakai, 1980; Kinsella, 1979; Konishi y Yoshimoto, 1989; Sorgentini y col., 1995; Marcone y Kakuda, 1999).

La fluorescencia de sondas extrínsecas provee información adicional a cerca de la integridad de la conformación de proteínas. El 8-anilino-1-naftalensulfonato (ANS), es una de las sondas más utilizadas por presentar un rango de linealidad más grande (Hayakawa y Nakai, 1985). Dicha sonda fluoresce débilmente cuando se encuentra libre en solución, pero cuando está unida a una superficie no polar la fluorescencia es mayor. Originalmente esta sonda ha sido usada en ensayos competitivos, para monitorear la unión de ácidos grasos a la albúmina, en estudios de conformación de proteínas, de los estados parcialmente desnaturalizados en equilibrio así como también de estados intermedios transitorios que se producen durante el plegamiento de las proteínas (Christensern y col., 1994).

En general las proteínas nativas que están totalmente plegadas, se unen a una cantidad limitada de ANS, sin embargo esto es suficiente para caracterizar la hidrofobicidad de la superficie de un cierto número de proteínas (Cardamone y col., 1992). Las proteínas totalmente desplegadas no se unen al ANS, mientras que proteínas parcialmente plegadas o desplegadas si lo hacen, indicando la presencia de grupos no polares asociados en la superficie, o la existencia de núcleos hidrofóbicos empaquetados y relativamente libres donde el ANS se puede intercalar. Esta sonda y otras similares son muy usadas como indicadores empíricos de cambios conformacionales, así como de ciertos mecanismos de interacción que no están muy bien definidos. La absorbancia de una sonda fluorescente unida a la proteína, provee información acerca de las distancias aproximadas entre los grupos hidrofóbicos y los cambios conformacionales de las proteínas. Un ejemplo de aplicación del ANS fue descrito por Agashe y col., (1995), quienes estudiaron el plegamiento de proteínas.

Las medidas de hidrofobicidad superficial, se realizaron a través de la determinación de la pendiente de la recta que se obtiene al representar gráficamente la fluorescencia relativa en función de la concentración de proteínas (Kato y Nakai, 1980). Dicha pendiente es función del número de sitios de unión y de la naturaleza y cantidad de grupos constituyentes de estos sitios que determinan la afinidad y la energía transferida a la sonda (Castellani, 2000). Debido a la existencia de interacciones proteína-proteína a elevadas concentraciones, para la determinación de hidrofobicidad superficial (H_0), se toma la pendiente inicial de la relación antedicha.

La figura 12 muestra la hidrofobicidad superficial (H_0), de las proteínas presentes en los aislados A9 y A11 en función del tiempo de tratamiento térmico a 70 y 90 °C. A la menor temperatura de tratamiento, el aislado A9 mostró una disminución inicial de la H_0 , (hasta los 10 minutos), seguido por un incremento de la misma a tiempos mayores, sin llegar a alcanzar el valor correspondiente al aislado sin tratar. Por su parte A11 mostró una disminución más pronunciada hasta los 10 minutos de calentamiento, seguido de un ligero aumento a tiempos mayores, pero de menor magnitud al observado en el aislado A9 (figura 12 a). La disminución inicial de la hidrofobicidad en los primeros minutos de calentamiento, tanto en A9 como en A11, podría atribuirse a cambios conformacionales de las proteínas ocasionados por el calentamiento que involucran la participación de grupos hidrofóbicos en la formación de agregados.

A 90 °C el aislado A9 experimentó un aumento de la hidrofobicidad en los primeros minutos de tratamiento, seguido por una ligera disminución y posterior aumento, (figura 12 b); mientras que en el aislado A11 se observó un incremento de la H_0 hasta los 10 minutos, seguido por una marcada disminución de la misma al cabo de 30 minutos de calentamiento (figura 12 b). Los altos valores de hidrofobicidad del aislado A9 a 90 °C concuerdan con los resultados obtenidos por DSC, en los cuales se evidencia un mayor grado de denaturalización de dicho aislado a 90 °C (figura 11 d).

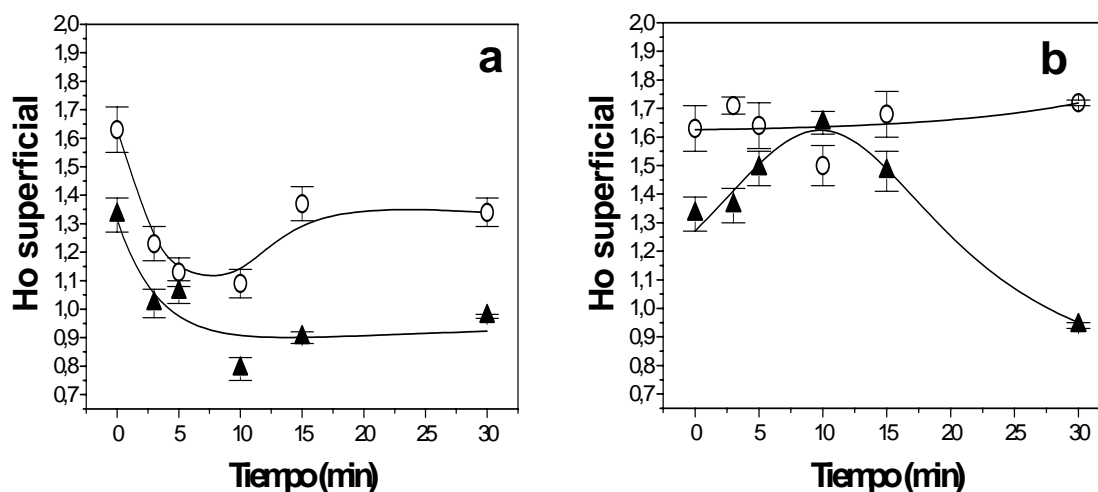


Figura 12. Hidrofobicidad superficial (IF x µg/ml), en función del tiempo de tratamiento (a) 70 °C y (b) 90 °C de los aislados (○) A9 y (▲) A11.

Durante la desnaturalización térmica de proteínas globulares los residuos hidrofóbicos ocultos se exponen, por lo cual se incrementa la hidrofobicidad superficial de las proteínas (Kato y Nakai, 1980). Con la extensión de la desnaturalización, los grupos hidrofóbicos expuestos pueden involucrarse en las interacciones hidrofóbicas durante la formación de agregados, resultando en una disminución de la superficie hidrofóbica expuesta de las proteínas.

Las variaciones de hidrofobicidad expuesta observada en los aislados A9 y A11, durante el tratamiento térmico, sugieren la existencia de reacciones de desnaturalización seguida por agregación. Las primeras serían más evidentes en el aislado A9, mientras que las segundas prevalecerían en A11. En este último tipo de aislado los agregados formados, estarían en parte estabilizados por uniones hidrofóbicas.

La mayor agregación observada en el aislado A11, no solo se debería a una desnaturalización parcial provocada por el pH alcalino del medio de extracción, sino también estaría relacionado a la mayor proporción de glutelinas. Como se mencionó en el ítem 2 las glutelinas tienen menor ΔH que la globulina-P, por lo tanto tendrían mayor tendencia a la agregación.

Un comportamiento similar de la hidrofobicidad frente al tratamiento térmico fue observado en legumina de proto, en donde la disminución de la hidrofobicidad a tiempos

prolongados de calentamiento se atribuyó a la formación de agregados vía interacciones hidrofóbicas (Zheng y col., 1993a). Estudios realizados con otras proteínas globulares muestran resultados variables. En el caso de ovoalbúmina la superficie hidrofóbica expuesta aumenta (Galazka y col., 1999) mientras que para seroalbúmina bovina disminuye (Kato y col., 1983) con el tratamiento térmico. En el caso de β -lactoglobulina los cambios en la superficie hidrofóbica dependen de la temperatura de tratamiento, por debajo de la temperatura de desnaturalización de la proteína no se observaron cambios significativos en la superficie hidrofóbica, mientras que por encima de la misma, la hidrofobicidad superficial se incrementa (Relkin y col., 1998).

3.1.4 Espectrofotometría ultravioleta (UV).

La desnaturalización térmica de proteínas involucra cambios conformacionales de la estructura nativa, los cuales pueden seguirse por técnicas espectrofotométricas como: dicroísmo circular (CD), espectrofotometría en el ultravioleta (UV) y espectroscopia de fluorescencia en el UV.

Diferencias en la espectrofotometría de absorción han sido usadas desde hace muchos años para estudiar cambios conformacionales de proteínas por desnaturalización (Donovan, 1969). Los aminoácidos aromáticos presentan picos característicos en la región del UV cercano; fenilalanina a 254 nm, tirosina a 274 nm y triptofano a 280 nm (Dyer, 1973). Los cambios en la longitud de onda (λ), máxima y en la intensidad de estos picos, se atribuyen a cambios conformacionales que sufren las proteínas como consecuencia de reacciones de desnaturalización, acidificación o hidrólisis (Leach y Scheraga, 1960). En base a esto podemos determinar si existen diferencias en cuanto a la exposición de los residuos aromáticos durante los cambios estructurales que sufren las proteínas presentes en los aislados proteicos A9 y A11, como consecuencia del tratamiento térmico.

Los cambios en el medio ambiente alrededor de los grupos cromóforos, causados por la desnaturalización de las proteínas o por perturbación del solvente, podría ser la causa del corrimiento de los picos en el espectro de absorción hacia menores longitudes de onda (Solli y Herskovit, 1973).

La figura 13 muestra, los espectros de absorción de las dispersiones de los aislados A9 y A11 (0,1 % p/v), calentados a 90 °C durante distintos tiempos. El máximo a 260 nm, para las proteínas de A9 y A11 no calentados, se desplazó hacia menores longitudes de

onda (λ), con el aumento del tiempo de calentamiento; hecho que fue más pronunciado a 90 °C que a 70 °C, (figura 13). El corrimiento del pico máximo en las muestras calentadas, hacia el azul, indica que hay desplegamiento de las proteínas (Ma y Ventktesh, 1988). Este desplegamiento fue mayor en las dispersiones del aislado A9, lo cual indica una mayor desnaturalización proteica (figura 13 a). Estos resultados coinciden con los obtenidos en el análisis calorimétrico de los aislados, en donde el aislado A9 presentó un grado de desnaturalización del 80 %, y el aislado A11 del 55 %, a 90 °C (figura 11 d).

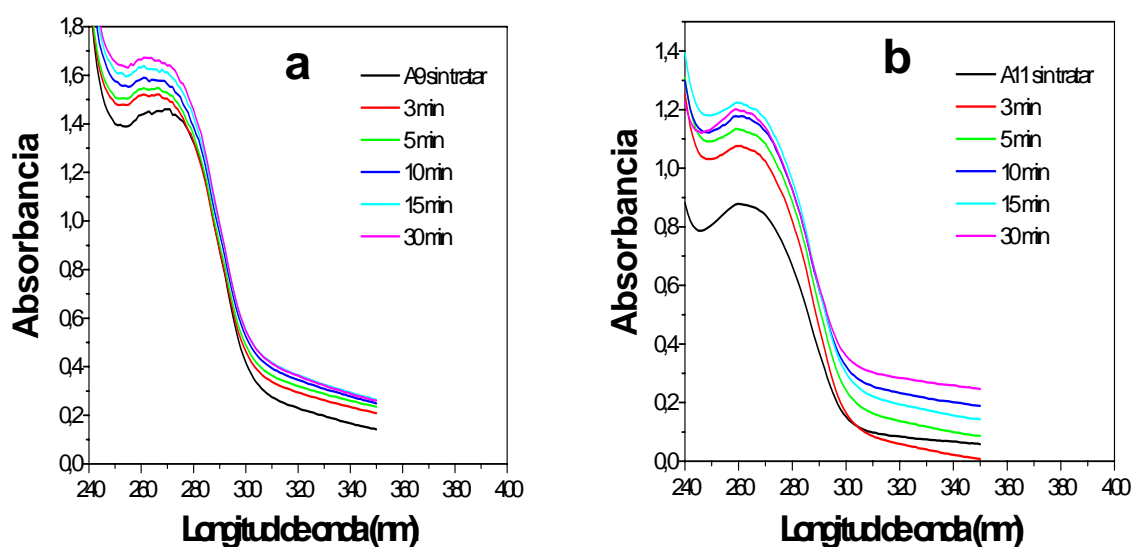


Figura 13. Espectros UV de las dispersiones acuosas de los aislados (1 mg/ml) tratadas a 90 °C durante distintos tiempos (a) A9 y (b) A11.

A efectos de analizar la incidencia de las fracciones de albúminas y globulinas en los cambios estructurales detectados en los aislados, las mismas fueron analizadas en iguales condiciones; concentración proteica de 1 mg/ml (0,1 % p/v), y temperaturas de 70 y 90 °C. Debido a que los espectros de las dispersiones acuosas de albúminas en dichas condiciones, fueron ruidosos y con máximos de absorbancias superiores a 2, solo se muestran los espectros correspondientes a globulinas en buffer B (ver ítem 6 de Materiales y Métodos), (figura 14). A 70 °C no se detectaron cambios significativos en los máximos de absorbancia y longitud de onda de los espectros de las globulinas (figura 14 a). En cambio a 90 °C la desnaturalización de la fracción globulinica fue notoria, lo cual se

evidenció por el corrimiento del máximo de absorbancia hacia menores longitudes de onda y un aumento de la absorbancia con el tiempo de tratamiento térmico (figura 14 b).

En el caso de las globulinas de avena el pico de máxima absorbancia a 277 nm para la proteína nativa, se desplazó hacia menores longitudes de onda con el incremento del tiempo de tratamiento, este efecto fue más pronunciado a 110 °C que a 100 °C (Ma y Ventktesh, 1988). Esto indica que las globulinas de avena no se desnaturalizan completamente a 100 °C, lo cual concuerda con la alta estabilidad térmica que presentan estas proteínas cerca de la temperatura de desnaturalización (110 °C), (Ma y Harwalkar, 1984).

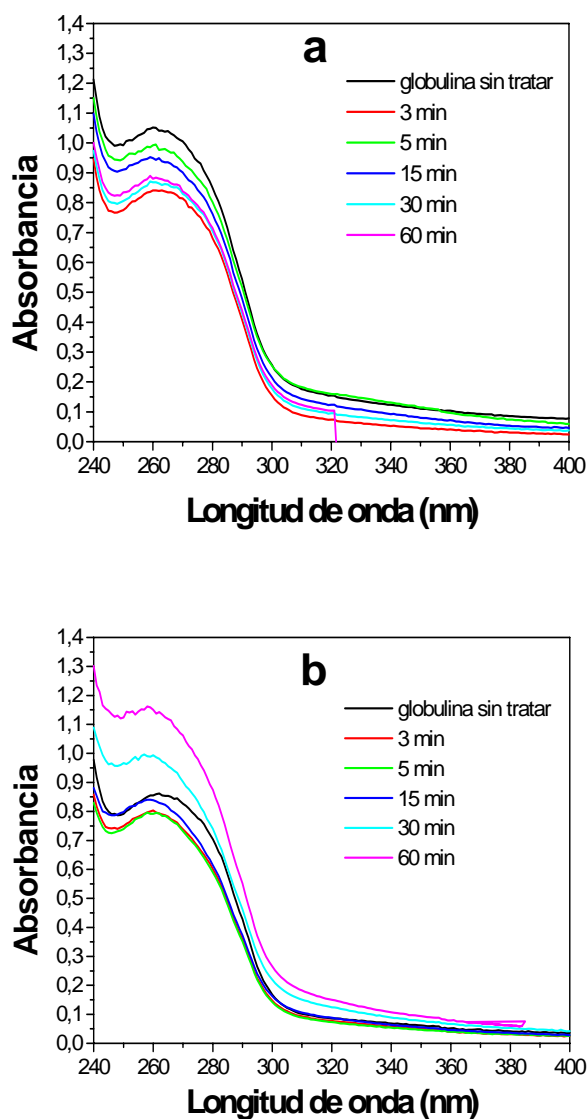


Figura 14. Espectros UV de dispersiones en Buffer B, de la fracción globulina (1 mg/ml), tratadas térmicamente a distintos tiempos de calentamiento, (a) 70 °C y (b) 90 °C.

Si comparamos los espectros de absorción de las fracciones albúminas y globulinas con los obtenidos para los aislados A9 y A11 tratados térmicamente en iguales condiciones de tratamiento, podríamos decir que la fracción globulínica sería la que más influye en los cambios conformacionales observados en los aislados proteicos. Esto estaría de acuerdo con el mayor contenido de la fracción globulina en ambos aislados proteicos (A9 y A11), respecto a la fracción albúminas, la cual se extrae en mayor proporción a pH 8 (Martínez, 1997).

La figura 15 muestra la absorbancia a 260 nm y 280 nm, en función del tiempo de tratamiento a 70 y 90 °C para los aislados A9 y A11. El comportamiento de ambos aislados a las dos longitudes de ondas (260 y 280 nm), es el mismo tanto a 70 °C como a 90 °C. Solamente difieren en que las absorbancias medidas a 260 nm son mayores a las de 280 nm en todas las muestras ensayadas. Esta diferencia se debería a un alto contenido en fenilalanina de las proteínas y/o a que los ácidos nucleicos, que absorben a 260 nm, contribuyen a la medida. Gorinstein y col., (1996c), informaron que el contenido de fenilalanina ($4,5 \pm 0,2$) en las globulinas de amaranto es mayor al de tirosina ($2,9 \pm 0,2$) y triptofano ($0,6 \pm 0,3$). A su vez las globulinas 11S y 7S de soja contienen todos los tipos de residuos de aminoácidos aromáticos, donde el contenido de fenilalanina es mayor al de tirosina y triptofano.

En condiciones de calentamiento más suave (70 °C), el aislado A9 experimentó un corrimiento progresivo de absorción con el tiempo de calentamiento, mientras que en el caso del aislado A11 se evidenció un aumento hasta los 15 minutos de calentamiento, manteniéndose constante a tiempos mayores (figura 15 a y c). A 90 °C, el aislado A9 mostró la misma tendencia que a 70 °C y el aislado A11 exhibió solo un incremento de la absorbancia a tiempos cortos de calentamiento (hasta los 5 minutos) (figura 15 b y d). Tanto en el aislado A9 como en aislado A11 las absorbancias a 90 °C fueron menores que las correspondientes a 70 °C en todos los tiempos de calentamiento. Esto estaría indicando la participación de los aminoácidos aromáticos en la formación de agregados a altas temperaturas.

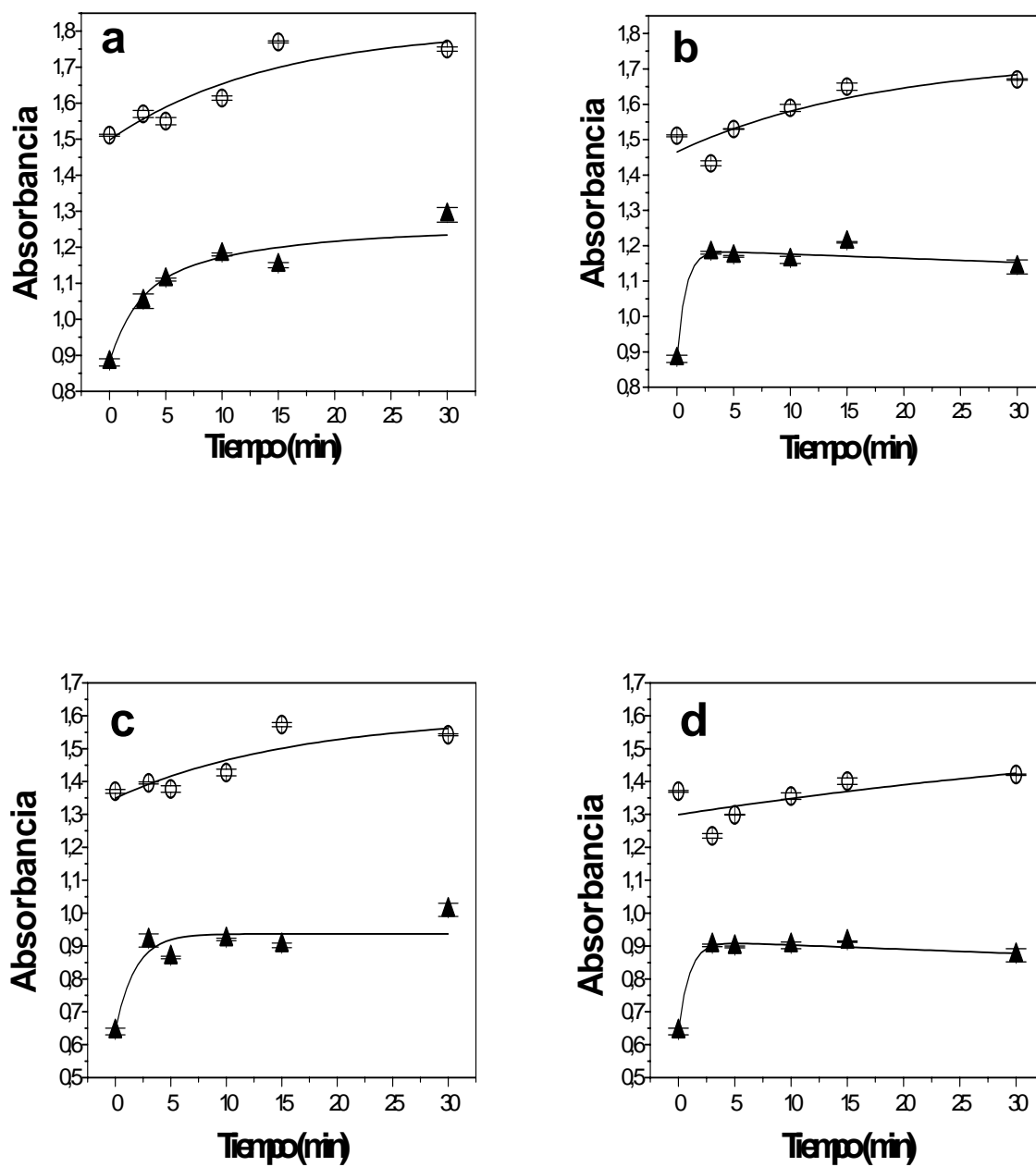


Figura 15. Medidas de absorbancia a 260 y 280 nm, de dispersiones acuosas (1 mg/ml), de los aislados (○) A9 y (▲) A11 en función del tiempo de tratamiento térmico, (a) 70 °C a 260 nm, (b) 90 °C a 260 nm, (c) 70 °C a 280 nm y (d) 90 °C a 280 nm.

El incremento de la absorbancia detectado como consecuencia del tratamiento térmico puede ser atribuido a la exposición de residuos aromáticos que absorben fuertemente en el UV. La diferencia de intensidad entre los picos de absorción, es una medida del grado de exposición y ocultamiento de los residuos aromáticos en las moléculas proteicas (Ma y Ventktesh, 1988).

La globulina-P que se encuentra en mayor proporción en el aislado A9, tiene un coeficiente de absorción ($\epsilon_{280}^{0,1\%} = 1,06 \pm 0,06$) (Castellani, 2000), mayor al de globulina 11S ($\epsilon_{280}^{0,1\%} = 0,562 \pm 0,005$) (Marcone y Yada, 1992). Esta diferencia estaría indicando una diferente proporción de triptofano y/o un diferente grado de exposición de las tirosinas.

De lo expuesto anteriormente podemos decir que el contenido de residuos aromáticos, al igual que el grado de exposición de los mismos, es mayor en las distintas fracciones proteicas que constituyen el aislado A9 como consecuencia del tratamiento térmico. Este comportamiento es congruente con la estabilidad térmica de las especies proteicas presentes en el aislado A9, tal como fuera mostrado por calorimetría diferencial de barrido (figura 10 b).

A tiempos de calentamiento prolongados tanto para A9 como en A11, especialmente a 90 °C (figura 15 b y d), la constancia observada en la absorción a 260 y 280 nm, podría deberse a la existencia de reacciones de agregación que llevan al ocultamiento de los grupos aromáticos expuestos inicialmente; reacciones evidenciadas tanto en los ensayos electroforéticos, de calorimetría diferencial de barrido e hidrofobicidad superficial.

Al igual que los aislados proteicos, las fracciones albúminas y globulinas tratadas térmicamente presentaron el máximo de absorbancia a 260 nm. Así mismo el comportamiento de las medidas de absorbancia frente al tratamiento térmico, de ambas fracciones, fue el mismo a las dos longitudes de ondas ensayadas (260 y 280 nm).

Las absorbancias de las albúminas fueron mayores a las globulinas en todas las condiciones ensayadas, esto se debe a que el coeficiente de extinción para la albúmina pura es de $\epsilon_{280}^{0,1\%} = 0,75 \pm 0,05$, en cambio el de globulinas es de $\epsilon_{280}^{0,1\%} = 0,562 \pm 0,005$, (Marcone y Yada, 1992), lo cual está mostrando un menor contenido de aminoácidos aromáticos en la fracción globulina, mientras que en la fracción albúmina dichos aminoácidos son altamente móviles.

En las dispersiones acuosas de albúminas (1 mg/ml), a 70 °C se observó un incremento de la absorbancia hasta los 15 minutos de tratamiento, seguida de una disminución a tiempos prolongados. En cambio a 90 °C hubo un incremento de la absorbancia hasta los 15 minutos de tratamiento y luego la misma permaneció constante a tiempo mayores. (figuras 16 a y c). La disminución de la absorbancia a baja temperatura, 70 °C, y la constancia a alta temperatura, 90 °C, observada a tiempos prolongados de calentamiento podría deberse a la formación de agregados. A todos los tiempos de tratamiento las absorbancias medidas a 90 °C fueron mayores que las correspondientes a 70 °C. Es decir que el tratamiento térmico a altas temperaturas provocó un mayor grado de exposición de aminoácidos aromáticos en las albúminas.

Las dispersiones en buffer B ($\mu = 0,08$) (ver ítem 6 de Materiales y Métodos), de globulinas preparadas a 1 mg/ml con tratamientos térmicos suaves (70 °C), no presentaron variaciones de la absorbancia con el tiempo de calentamiento; mientras que en condiciones más drásticas (90 °C), se detectó un incremento de la absorbancia a tiempos prolongados de calentamientos (30 y 60 minutos), (figura 16 b y d). En este caso a diferencia de las albúminas el comportamiento frente al tratamiento térmico depende de la fuerza iónica. Las sales favorecen la interacción proteína-proteína, lo cual induce un aumento de la agregación pero disminuye la desnaturalización (Yamauchi y col., 1991). El efecto de una sal sobre la estabilidad de las estructuras proteicas depende de la concentración de la sal y/o de la fuerza iónica. A baja fuerza iónica ($\mu < 0,5$), el efecto de estabilización ha sido atribuido a interacciones de naturaleza electrostática. Por lo tanto la estabilidad de proteínas en este rango de fuerza iónica deberá ser independiente del tipo de sal (Von Hippel y Schleich, 1969).

El comportamiento observado de las fracciones albúminas y globulinas frente al tratamiento térmico está de acuerdo con la baja y alta estabilidad térmica que presentan las mismas, respectivamente (Martínez, 1997). Las globulinas tienen una estructura más estable que las albúminas, lo cual se evidencia por la mayor temperatura de desnaturalización que presentan (Ma y Harwalkar, 1988).

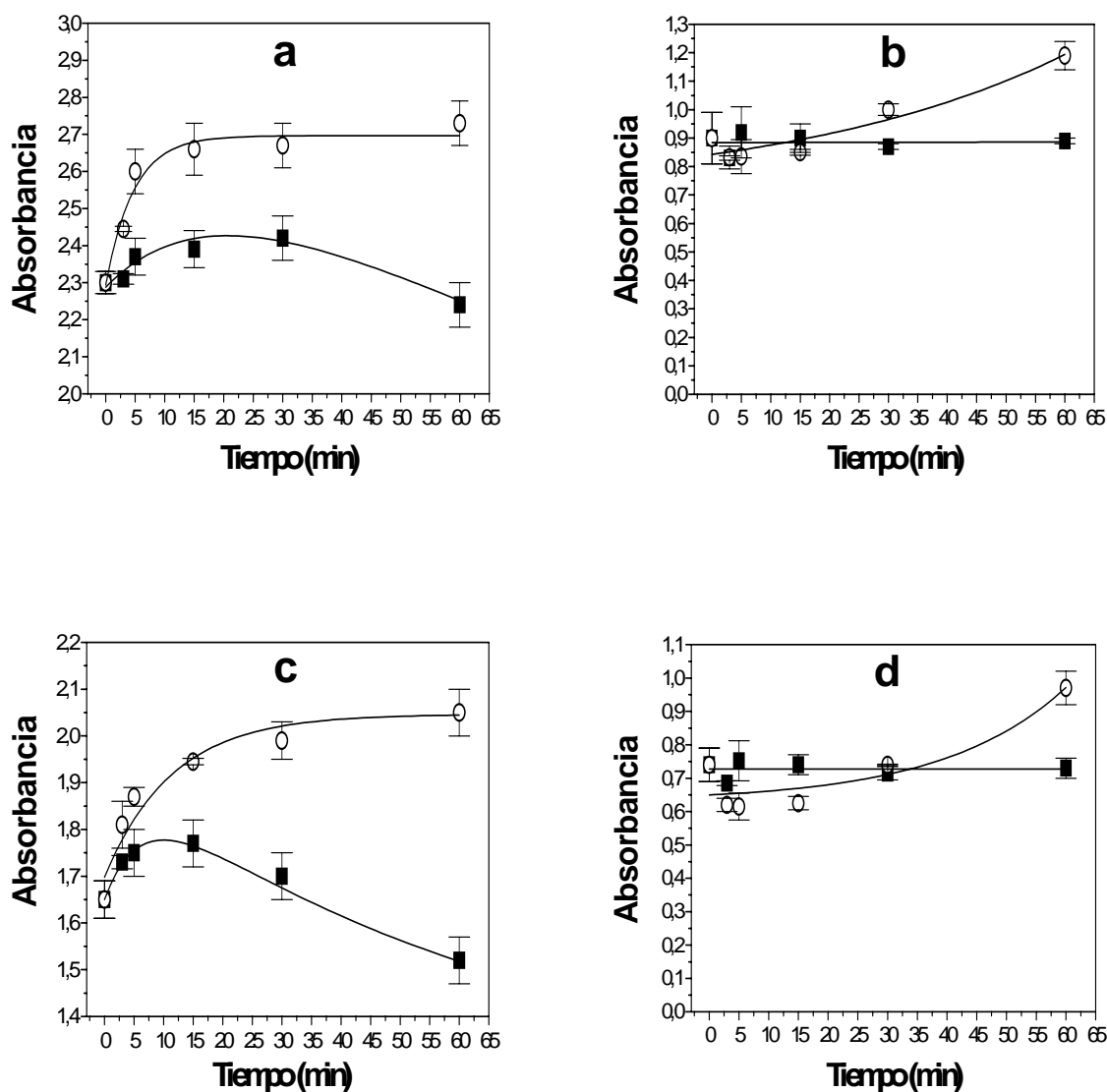


Figura 16. Medidas de absorbancia a 260 y 280 nm, en función del tiempo de tratamiento térmico a 70 °C (■) y 90 °C (○), de dispersiones de albúminas en agua y de globulinas en buffer B, preparadas a una concentración de 1mg/ml. (a) albúminas a 260 nm, (b) globulinas a 260 nm, (c) albúminas a 280 nm, (d) globulinas a 280 nm.

Debido a que el calentamiento provoca una ligera turbidez en las muestras, lo cual enmascara los cambios en la absorbancia debido a la exposición de los aminoácidos aromáticos, se encontró que analizando las diferencias en la segunda derivada se superan los inconvenientes. La derivada segunda ha sido usada para obtener información acerca del estado y la cantidad de los residuos de aminoácidos aromáticos, y de los cambios conformacionales en las proteínas frente a factores desnaturizantes (Yamagishi y col.,

1981a, 1983). Los picos y valles en las segundas derivadas que se encuentran entre 250 y 270 nm son atribuidos a la fenilalanina, mientras que los que aparecen entre 270 y 300 nm se corresponde con tirosina y triptofano. El pico de 291-292 nm en la derivada segunda de la proteína, indica la exposición del triptofano desde el interior de la proteína al medio acuoso (Demchenko y col., 1979).

En el caso de los aislados A9 y A11 tratados térmicamente a 90 °C se observaron cambios en las intensidades de las bandas entre 250 y 270 nm, sin modificación de la posición de dichos picos. Los picos entre 270 y 300 nm no presentaron grandes cambios en su intensidad, sin embargo se detectó un leve desplazamiento de los mismos hacia el azul a medida que progresó el calentamiento. Los resultados obtenidos sugieren una mayor exposición de los residuos de fenilalanina y tirosina como consecuencia del tratamiento térmico. La contribución de los residuos de triptofano podría verse impedida por la exposición de los residuos de tirosina (datos no mostrados). Según Yamagishi y col., (1981a) en el espectro de la derivada segunda de la glicinina de soja tratada térmicamente no se detectaron diferencias en el pico del triptofano a 292 nm, pero si se observaron diferencias cuando las proteínas fueron tratadas con urea.

3.1.5 Espectroscopia de fluorescencia.

La fluorescencia intrínseca de los aminoácidos aromáticos en las proteínas ha sido usada durante mucho tiempo para registrar los cambios conformacionales (estructura terciaria) de las proteínas inducidos por agentes químicos, temperatura, cambios de pH y presión. Los cambios conformacionales de una proteína se reflejan en modificaciones de la absorbancia y/o fluorescencia de los grupos cromóforos de las proteínas (Donovan, 1969).

El espectro de fluorescencia está determinado principalmente, por la polaridad del medio que rodea a los residuos de triptofano y tirosina y por sus interacciones específicas. La fluorescencia de los residuos de triptofano es sensible a las perturbaciones de la estructura proteica, mientras que los residuos de tirosina y fenilalanina son menos sensibles. Khan y col., (1980), observaron que la tirosina tiene un menor coeficiente de excitación que el triptofano. Para la caracterización estructural de proteínas se analiza la contribución del triptófano en el espectro de emisión, y el hecho que su máximo de emisión es muy dependiente de la polaridad del medio que rodea al fluoróforo (Barceló, 2003). Por consiguiente la aplicación de técnicas de fluorescencia para el estudio del plegamiento de proteínas estará limitada a la fluorescencia intrínseca del triptófano (Royer,

1995). La posición del máximo de emisión en el espectro de fluorescencia de los residuos de triptofano, varía entre 307 y 353 nm. Si el espectro de emisión de dichos residuos se encuentra a baja longitud de onda (307nm) corresponde a la proteína en su estado nativo; mientras que, si aparece a mayores longitudes de onda (353nm), indica que la misma se encuentra totalmente desnaturalizada, (Permyakov, 1993). La máxima emisión de triptofano, tirosina y fenilalanina en agua, se produce a 348, 303 y 282 nm, respectivamente (Lackowicz, 1983).

La ventaja de esta técnica, es la alta sensibilidad y la utilización de poca muestra. La presencia de pequeñas trazas de impurezas fluorescentes en el solvente o en la celda, puede llevar a una interpretación equivocada del espectro.

Para realizar los espectros de fluorescencia se utilizó una longitud de onda de excitación de 280 nm, ya que la misma corresponde al pico de máxima absorción en el espectro UV del triptofano en agua, y además no hay contribución de la fluorescencia de tirosina. En los aislados A9 y A11 en su estado nativo, el triptófano está situado en su entorno apolar y muestra un máximo de emisión a 345 y 343 nm respectivamente. Estos máximos de emisión corresponden a la suspensión total de dichos aislados (0,1 % p/v), (figura 17 a y b). En cambio las fracciones solubles de los mismos presentaron un máximo de emisión a 351 nm (figura 17 c y d). Esto estaría indicando que en las proteínas de la fracción soluble, de ambos aislados, los residuos de triptófano están localizados cerca de la superficie de las proteínas, en contacto con el agua que los rodea; mientras que en el aislado se distinguen diferentes proteínas cuyos residuos se hayan más o menos protegidos de la fase acuosa por la matriz proteica (Permyakov, 1993).

La falta de estructuración de los residuos de triptófano en las proteínas de la fracción soluble estaría relacionada con una estructura menos compacta y más hidrofóbica de las proteínas que conforman dicha fracción.

Las proteínas desnaturalizadas térmicamente sufren un cambio conformacional que ocasiona una alteración en el grado de exposición de los residuos de triptófano pasando de un entorno apolar en la estructura nativa a uno polar en las moléculas desnaturalizadas (Barceló, 2003). Como consecuencia de ello las propiedades de emisión de fluorescencia de dicho aminoácido se ven afectadas, lo cual se manifiesta por un desplazamiento del pico de emisión del triptofano hacia mayores longitudes de onda en el espectro electromagnético (Kronman y Holmes, 1971). Esto se debe al gasto de energía que implica reordenar las moléculas de solvente en el entorno de los residuos de triptofano en su estado excitado; lo cual trae como consecuencia una disminución de la energía en el máximo de

emisión, y de la intensidad fluorescente emitida por los residuos de triptofano (Khan y col., 1980).

La suspensión total (0,1 % p/v), del aislado A9, al cabo de 15 minutos de calentamiento a 70 °C, mostró un corrimiento de la longitud de onda de máxima emisión (λ), del orden de 3 nm, (348 nm), respecto al aislado sin calentar (345 nm). En cambio a los 15 minutos de calentamiento a 90 °C, dicho corrimiento fue del orden de 6 nm, (351 nm), a tiempos mayores (30 minutos), se produjo un corrimiento de la longitud de onda hacia el azul (347 nm), lo cual no se observó a 70 °C (figura 17 a).

En la suspensión total (0,1 % p/v), del aislado A11, se observó a los 15 minutos de calentamiento a 70 y 90 °C un corrimiento de la longitud de onda de máxima emisión (λ), del orden de los 3 y 8 nm, (346 y 351 nm), respectivamente, con referencia al aislado sin calentar, (343 nm). Después de los 15 minutos de calentamiento a ambas temperaturas, al igual que en el aislado A9 a 90 °C, se observó un corrimiento de la longitud de onda (λ) máxima de emisión hacia el azul, principalmente a 90 °C (figura 17 b).

En ambos aislados hay un aumento en la extensión de la desnaturalización de las proteínas hasta los 15 minutos de tratamiento, principalmente a 90 °C. En cambio a tiempos prolongados (30 minutos) de calentamiento y principalmente a la mayor temperatura (90 °C), los residuos de triptofano de ambos aislados se encontrarían en un entorno más hidrofóbico, lo cual se evidenció por el corrimiento de la longitud de onda máxima de emisión hacia el azul. Es decir que las proteínas estarían formando agregados estabilizados, en parte, por interacciones hidrofóbicas.

Estos datos espectrales y las medidas de hidrofobicidad superficial mostrados en la figura 12 b, correspondientes a los aislados A9 y A11, sugieren que la cantidad de agregados formados se incrementa cuando mayor es el grado de desnaturalización de las proteínas. Esto concuerda con lo generalmente aceptado de que la agregación es precedida por la desnaturalización (Ferry, 1948).

Las fracciones solubles de los aislados A9 y A11, tanto a 70 °C como a 90 °C presentaron máximos de emisión a longitudes de onda mayores respecto a las fracciones totales, inclusive en los aislados sin tratar (figura 17 c y d). Esto estaría reflejando una mayor pérdida de la estructura nativa con el incremento de la temperatura y tiempo de calentamiento en las especies proteicas que permanecen en la fracción soluble luego de una centrifugación a 1200 x g durante 30 minutos a 25 °C. Es decir que la fracción soluble es

más sensible al tratamiento térmico respecto a la fracción total. Esta última representa el promedio del soluble y el insoluble.

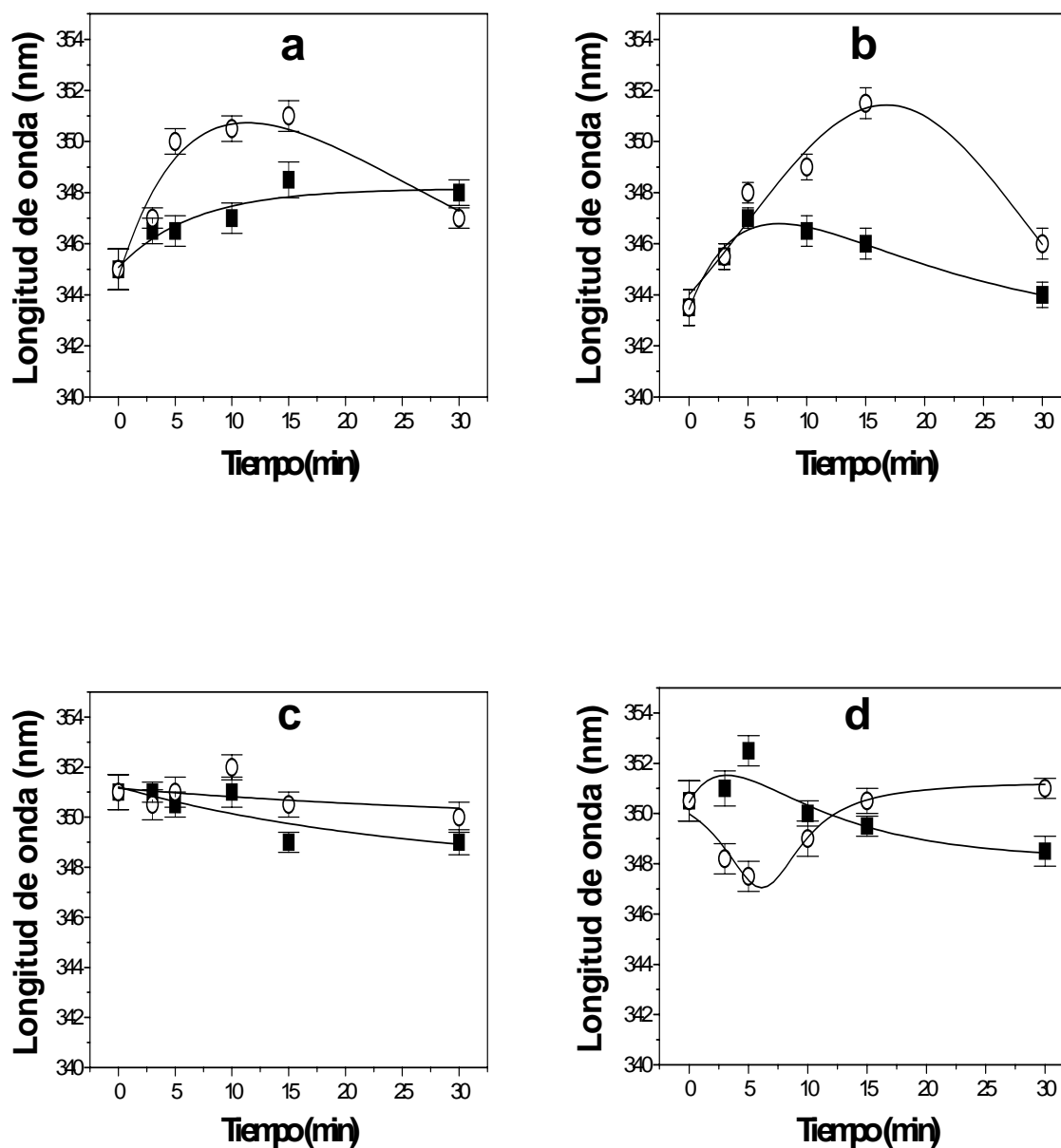


Figura 17. Variación del λ_{\max} en función del tiempo de tratamiento a 70 °C (■) y 90 °C (○), de dispersiones acuosas de los aislados (1mg/ml); (a) fracción total de A9, (b) fracción total de A11, (c) fracción soluble de A9 y (d) fracción soluble de A11.

La disminución progresiva de la intensidad de fluorescencia (quenching), de las proteínas tratadas térmicamente, está vinculada a la desnaturalización de las mismas, debido a la mayor interacción del triptofano con el agua a medida que las proteínas se van desplegando. De esta manera se ve impedida la fluorescencia del triptofano (Permyakov, 1993). A su vez la ligera turbidez que desarrollan las muestras tratadas térmicamente puede producir una disminución de la intensidad de fluorescencia (Lackowicz, 1983). La disminución de la intensidad de fluorescencia de proteínas es una medida del grado en que los residuos de triptofano están ocultos en la estructura de la proteína o expuestos al solvente.

Tanto en la suspensión total como en la fracción soluble de ambos aislados, se observó una disminución de la intensidad de fluorescencia durante el calentamiento, siendo más marcada en la fracción soluble de los aislados tratados a 90 °C (figura 18 c y d).

Durante el tratamiento térmico las proteínas forman agregados estabilizados por puentes disulfuro, como hemos comprobado por electroforesis, los cuales como es sabido interfieren en la fluorescencia del triptofano. Las uniones disulfuro absorben la emisión de fluorescencia de los residuos de triptofano (quenchers), es por ello que la intensidad de fluorescencia de los mismos disminuye en presencia de los puentes disulfuro (Permyakov, 1993).

Ma y Ventktesh (1988), mostraron que la dispersión de globulina de avena no tratada térmicamente, presenta un pico de máxima fluorescencia a 336 nm. Cuando dicha suspensión se calienta también se produce un corrimiento del pico hacia mayores longitudes de onda y una disminución de la intensidad de fluorescencia a medida que aumenta la temperatura (110 °C) y el tiempo de calentamiento (60 minutos).

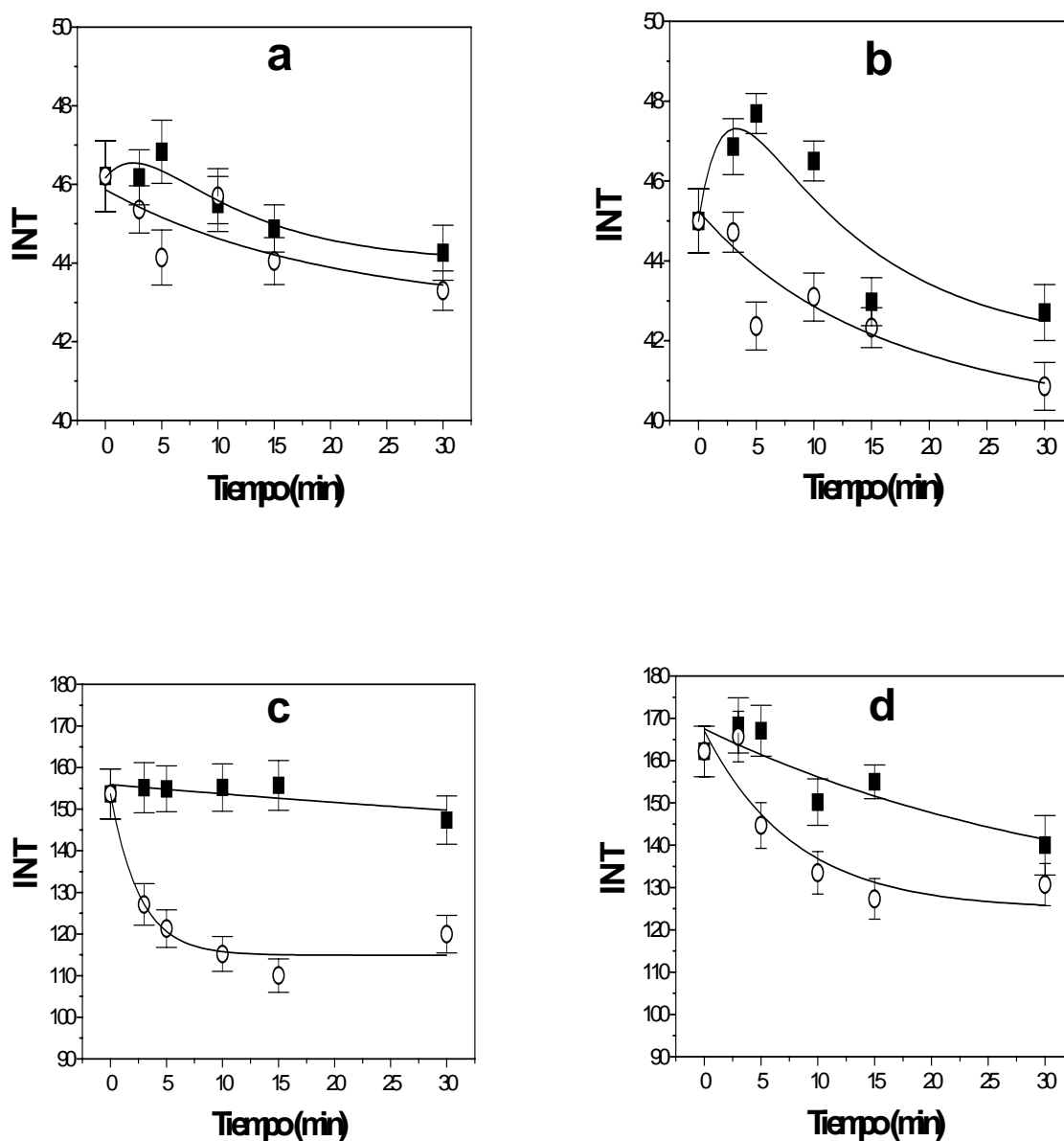


Figura 18. Variación de la intensidad (INT) máxima en función del tiempo de tratamiento a 70 °C (■) y 90 °C (○) de dispersiones acuosas (1mg/ml), de los aislados. (a) fracción total de A9, (b) fracción total de A11, (c) fracción soluble de A9 y (d) fracción soluble de A11.

Los espectros de fluorescencia de las fracciones albúmina en agua y globulina en buffer B (ver ítem 6 de Materiales y Métodos), tratadas térmicamente se realizaron a una longitud de onda de excitación de 280 nm, al igual que los aislados. En el caso de las albúminas sin tratamiento térmico el máximo de fluorescencia se detectó a 347 nm. Con el

tratamiento térmico a 70 °C el máximo de fluorescencia se corrió a longitudes de ondas mayores alcanzando un valor de 353 nm al cabo de los 30 minutos de calentamiento. A 90 °C el corrimiento del máximo de fluorescencia respecto a la muestras sin calentar alcanzó su máximo a los 10 minutos de calentamiento (350 nm), permaneciendo constante a tiempos más prolongados (figura 19 a).

Las globulinas no tratadas térmicamente presentaron su máximo de fluorescencia a 339 nm. A 70 °C se produjo un leve corrimiento del máximo de fluorescencia (342 nm) con el tiempo de calentamiento, no significativo estadísticamente ($p>0,05$). A 90 °C se observó un corrimiento más evidente de la longitud de onda de emisión máxima hasta los 10 minutos de calentamiento (350 nm), respecto a la muestra sin tratar; manteniéndose constante a partir de entonces (figura 19 b).

Los espectros de fluorescencia de las fracciones albúmina, globulina y globulina-P de amaranto, presentaron picos de máxima fluorescencia a 346, 338 y 351 nm respectivamente. Esto significa que los residuos de triptofano están situados cerca de la superficie de las moléculas de proteínas en el caso de las albúminas y globulina-P, lo cual está de acuerdo con una estructura menos compacta y más hidrofóbica en comparación con las globulinas, (Gorinstein y col., 2001; Castellani, 2000).

En las albúminas la intensidad de máxima fluorescencia en los primeros minutos de tratamiento térmico a 70 °C no presentó variaciones significativas ($p>0,05$), respecto a la muestra sin calentar; sin embargo a tiempos prolongados se observó un leve incremento de la misma (figura 19 c). A 90 °C desde los primeros minutos de tratamiento se observó una disminución de la intensidad de fluorescencia, que fue incrementándose con el tiempo de calentamiento, (figura 19 c). Este comportamiento estaría indicando la participación de interacciones hidrofóbicas en los agregados formados a tiempos prolongados de tratamiento térmico a 90 °C.

En el caso de las globulinas tanto a 70 como a 90 °C, la intensidad de máxima fluorescencia disminuyó con el tiempo de calentamiento, siendo el efecto más marcado a alta temperatura (figura 19 d). Este hecho, a diferencia de las albúminas, sugiere una mayor participación de las uniones disulfuro en la formación de agregados principalmente a temperaturas drásticas de tratamiento (90°C).

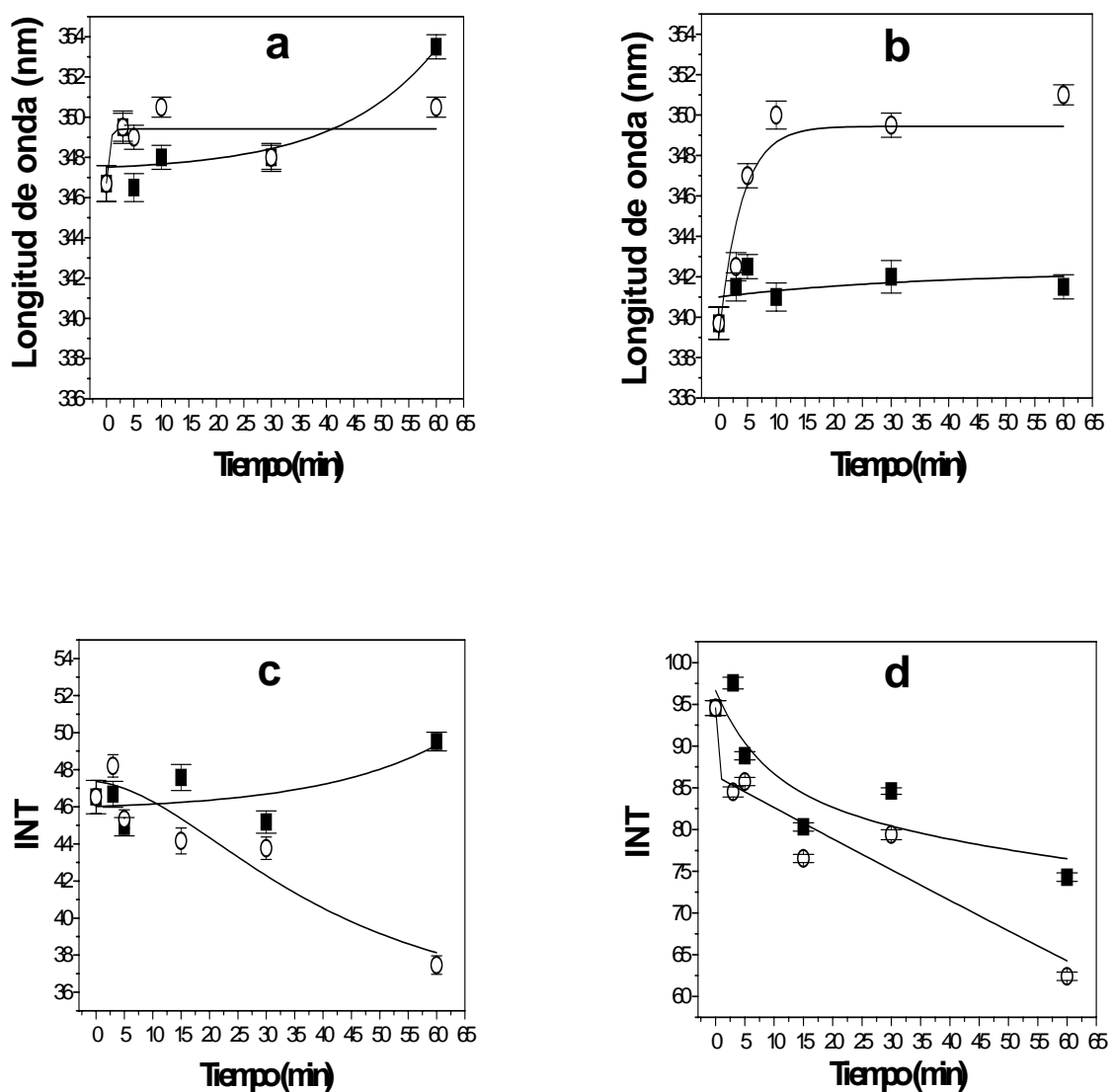


Figura 19. Variación de la longitud de onda (λ) máxima y de la intensidad (INT) máxima de fluorescencia en función del tiempo de tratamiento de dispersiones preparadas a 1 mg/ml, tratadas a 70 (■) y 90 °C (○). (a),(c) fracción soluble albúmina; (b),(d) fracción soluble globulina.

La disminución de la intensidad de fluorescencia y el corrimiento del máximo de emisión observado en albúminas y globulinas, indican que hubo desnaturalización de estas proteínas con el tratamiento térmico. Las globulinas presentaron intensidades de fluorescencia más altas que las albúminas, debido probablemente a diferencias en la estructura y/o composición de los aminoácidos aromáticos entre ambas fracciones. Yada (1984) informó que la intensidad de las bandas de dicroísmo circular para aminoácidos

aromáticos generalmente aparece cuando dichos aminoácidos están próximos unos de otros. En las albúminas no aparecen las bandas correspondientes a los aminoácidos aromáticos, lo cual estaría indicando que dichos aminoácidos se encuentran distantes (Yada y Nakai, 1986), o son altamente móviles. Las globulinas a diferencia de las albúminas presentan bandas intensas de aminoácidos aromáticos en el dicroísmo circular (Marcone y Yada, 1992).

Como hemos visto, las proteínas de los aislados A9 y A11, se van desplegando durante el tratamiento térmico, principalmente a 90 °C y a tiempos prolongados de tratamiento, presentando máximos de fluorescencia (343-351 nm), equivalentes a lo observado en las fracciones albúminas y globulinas tratadas en iguales condiciones.

El comportamiento de la longitud de onda máxima y de la intensidad máxima de fluorescencia, frente al tratamiento térmico, es similar en la fracción soluble del aislado A9 y en las albúminas. Martínez (1997) informó que la fracción soluble del aislado A9 presenta un predominio de albúmina y globulina tipo 7S, y la fracción insoluble globulina-P y globulina 11S.

En base a esto podríamos decir que las albúminas serían las principales responsables de los cambios estructurales en la fracción soluble del aislado A9, mientras que las globulinas lo serían en la fracción total de ambos aislados (A9 y A11).

La magnitud de los cambios observados en los espectros de fluorescencia de los aislados y fracciones proteicas dependen de las condiciones de tiempo y temperatura empleados en los tratamientos térmicos. Esto concuerda con lo demostrado por espectroscopia UV, electroforesis, hidrofobicidad, solubilidad y calorimetría diferencial de barrido de los aislados y fracciones proteicas tratados térmicamente.

3.1.6 Espectroscopia (FT-Raman).

La aplicabilidad de la espectroscopia Raman tanto para muestras sólidas como líquidas, se ha convertido en una herramienta muy útil para estudiar los cambios estructurales de proteínas durante la desnaturalización, agregación y gelificación (Li-Chan y col., 1994; Li-Chan, 1996a). Sin embargo la fluorescencia continúa siendo el mayor problema en el análisis espectroscópico de Raman en materiales vegetales, incluyendo proteínas, cuando se utiliza como fuente de luz un láser en el rango visible. Esto se debe principalmente a los compuestos fenólicos que son extraídos junto con la sustancias de las plantas. La espectroscopia Raman con transformada de Fourier (FT), ha sido un avance

significativo para solucionar el problema de fluorescencia (Schrader, 1991, Li-Chan, 1994, Ma y col., 2000).

Las ventajas de la espectroscopia FT-Raman sobre la espectroscopia Raman convencional que utiliza un láser visible han sido demostradas en el estudio de proteínas de soja, incluyendo los efectos de tratamientos térmicos, gelificación y presión; y en el estudio de interacciones entre proteínas de soja y fosfolípidos (Li-Chan y col., 1994). La espectroscopia FT-Raman también ha sido utilizada en el estudio de biopolímeros (Davies y col., 1990), análisis de alimentos (Ozaki y col., 1992), incluyendo análisis cuantitativos de aceites y grasas (Sadeghi-Jorbachi y col., 1991), y en la determinación del nivel de acetilación de almidones modificados (Phillips y col., 1999a). Sin embargo a pesar de las ventajas de la espectroscopia FT-Raman, hay pocos trabajos relacionados con el estudio de proteínas de origen animal y vegetal (Ma y col., 2000).

Previamente hemos utilizado métodos analíticos como la espectrofotometría UV y espectroscopia de fluorescencia, para el estudio conformacional de las proteínas de amaranto. Sin embargo estas técnicas no permiten determinar cambios en la estructura secundaria de las proteínas por lo que decidimos utilizar la espectroscopia Raman con transformada de Fourier (FT-Raman). Durante la desnaturalización térmica de los aislados proteicos de amaranto los cambios en la estructura cuaternaria y terciaria de las proteínas pueden tener lugar antes que los correspondientes cambios en la estructura secundaria de las mismas. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) y las espectroscopias de UV y de fluorescencia, presentan resultados más rápidos de la desnaturalización de proteínas que los expuestos por FT-Raman. Esto se debe a que la espectroscopia FT-Raman es más sensible a los cambios de la estructura secundaria, mientras que las otras técnicas evidencian los cambios de la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas (Ma y col., 2000).

En el estudio conformacional de proteínas por FT-Raman se obtiene información de la estructura y disposición espacial del esqueleto peptídico (estructura α hélice, hoja plegada β , β -turn, γ -turn, w-turn, y random coil). El enlace peptídico $-\text{CONH}-$ es planar debido a la resonancia de estabilización (figura 20); y da lugar a 9 modos vibracionales: Amida A, B, y Amidas I a VII. La banda Amida I aparece cercana a 1650 cm^{-1} (80 % estiramiento C=O), Amida II en 1540 cm^{-1} (60 % balanceo N-H y 40 % estiramiento C-N), y la banda Amida III en 1250 cm^{-1} (estiramientos 40% C-N y 30 % N-H). Dichas bandas provienen de las vibraciones en el plano del enlace amida (figura 21). Las bandas

más intensas, Amida I y III, permiten diferenciar, por el corrimiento de las frecuencias, los cambios conformacionales en las proteínas sometidas a distintas perturbaciones (tabla 4).

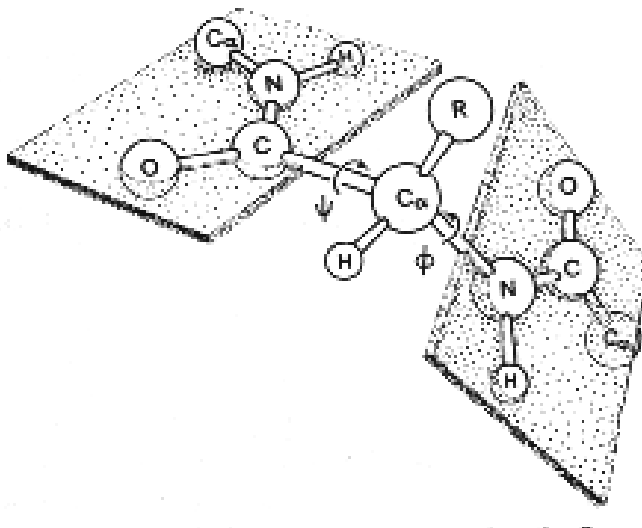
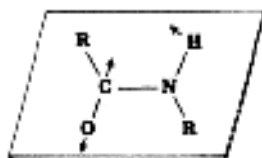
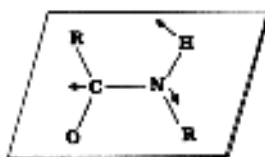


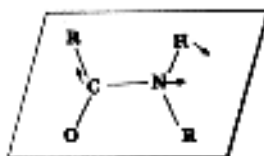
Figura 20. Enlace peptídico de las proteínas que da lugar a 9 modos vibracionales: Amida A, B, y Amidas I a VII.



Amida I



Amida II



Amida III

Figura 21. Bandas Amida I, II y II provenientes de las vibraciones en el plano del enlace amida.

Tabla 4. Frecuencias de las bandas Amida I y III y de las distintas formas de la estructura secundaria de las proteínas.

| Número de onda cm^{-1} | Asignación |
|---------------------------------|---------------------------|
| 1650-1680 | Amida I |
| 1670 ± 3 | Hoja β antiparalela |
| 1665 ± 3 | Estructura desordenada |
| 1655 ± 5 | α - hélice |
| 1295 – 1230 | Amida III |
| > 1275 | α - hélice |
| 1245 ± 4 | Estructura desordenada |
| 1235 ± 5 | Hoja β antiparalela |

La espectroscopia Raman brinda también información sobre la distribución espacial de los residuos de cadenas laterales: tirosina, triptofano, grupos sulfhidrilos (SH), y geometría del enlace S-S (Tu, 1982). Los dobletes de tirosina, permiten diferenciar los entornos de los residuos de tirosina (figura 22). Cuando los mismos se encuentran ocultos en la estructura proteica, aparece la banda intensa en 830 cm^{-1} , y cuando se encuentran expuestos en la superficie, se incrementa la intensidad de la banda en 850 cm^{-1} . El grado de desenrollamiento de una proteína durante un calentamiento, así como la formación de agregados, que modifican la exposición de los residuos de tirosina, puede ser evaluado por medio de las intensidades relativas de ambas bandas: $I = 850/830$. La disminución de la intensidad relativa (I) sugiere un incremento del ocultamiento o la participación de los residuos de tirosina en la formación de los puentes de hidrógeno intermoleculares (Tu, 1986; Yu y col., 1973; Tu, 1982).

El triptofano oculto en la estructura proteica presenta bandas características a 1582, 1553 y 760 cm^{-1} (figura 23). La exposición de residuos de triptofano ocultos como consecuencia de la desnaturalización, es evaluada por la disminución de la intensidad de dichos picos (Kitagawa y col., 1979; Yu y col., 1974; Tu, 1982). El enlace disulfuro colabora en la estabilidad de las proteínas, pudiéndose evaluar la formación o ruptura de dichos enlaces a través de la intensidad de las bandas vibracionales de estiramiento S-S en la región $500\text{-}540 \text{ cm}^{-1}$ (tabla 5).

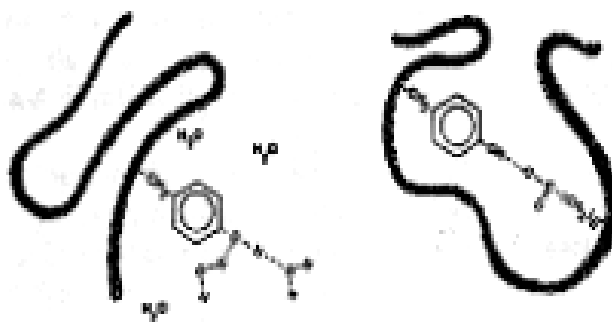


Figura 22. Entornos de los residuos de tirosina. Banda a 830 cm^{-1} , residuos de tirosina ocultos, y 850 cm^{-1} , residuos de tirosina expuestos.

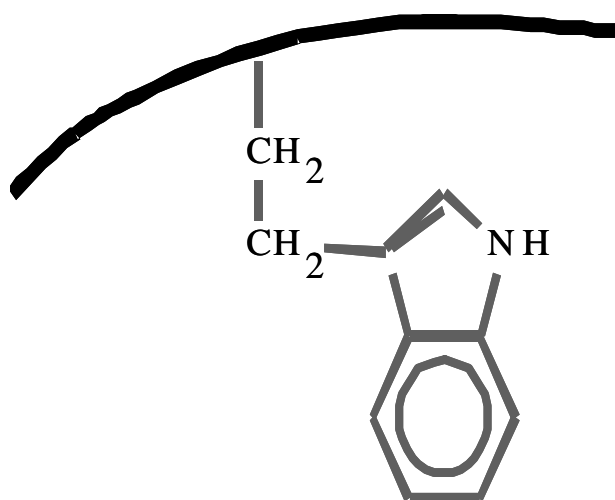


Figura 23. Estructura del triptofano oculto en la estructura proteica, cuyas bandas características aparecen a: 1582 , 1553 y 760 cm^{-1} .

Tabla 5. Frecuencias de las bandas vibracionales para el estiramiento S-S en la región 500-540 cm^{-1} .

| Número de onda cm^{-1} | Asignación |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| 500 – 540 | S-S estiramiento |
| 507 - 512 | S-S estiramiento gauche-gauche-gauche |
| 525 | S-S estiramiento gauche-gauche-trans |
| 540 | S-S estiramiento trans-gauche-trans |

3.1.6.1 Efecto del tratamiento térmico

Mediante la espectroscopia FT-Raman hemos estudiado los cambios estructurales en los aislados proteicos A9 y A11, tratados a distintos tiempos (3, 5, 10, 15 y 30 minutos) y temperaturas (70 y 90 °C) de calentamiento. En la figura 24 se muestran los espectros Raman correspondientes a los aislados A9 y A11 nativos. Ambos aislados presentan una banda Amida III bien resuelta entre 1300 y 1200 cm^{-1} . El aislado A9 posee un importante hombro a 1234 cm^{-1} correspondiente a una conformación β , típica de globulinas, en contraste con el aislado A11 que muestran un máximo centrado en 1246 cm^{-1} , correspondiente a una estructura desordenada (figura 24 región B). El aislado A11 muestra una mayor exposición de grupos hidrofóbicos (tirosina) y una disminución de las intensidades correspondientes a las bandas de triptofano oculto (figura 24 región A y D). El doblete de tirosina muestra un incremento de la proporción del residuo expuesto en el aislado A11 ($I_{850/830} = 1.35$) frente al obtenido para el aislado A9 ($I_{850/830} = 1.10$), (figura 24 región C).

Las globulinas de avena y de *Phaseolus angularis* (RBG) presentan bajo contenido de α hélice y alto contenido de estructuras hoja plegada β y desordenada (Ma y col., 2000; Meng y col., 2003).

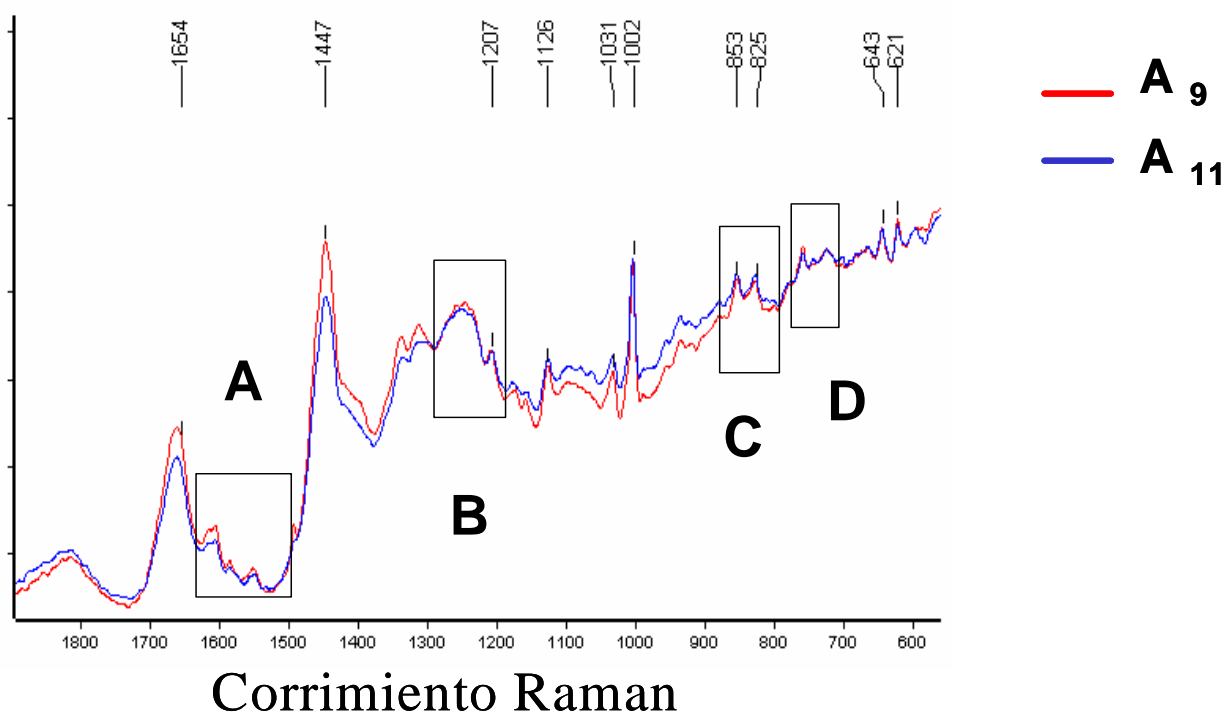


Figura 24. Espectros FT-Raman de aislados proteicos de semillas de amaranto, obtenidos a pH 9 (A9) y pH 11 (A11) sin tratamiento térmico.

La banda de Amida III es más sensible a cambios estructurales que la banda Amida I (Tu, 1982). En la región Amida III se observaron diferencias entre los espectros a distintos tiempos de calentamiento, respecto a la muestra sin tratamiento térmico del aislado A11 y A9. El aislado A11 sufrió un cambio conformacional a una estructura más desordenada (3-5 minutos) y luego hacia una conformación β , a medida que aumentaba la temperatura y el tiempo de calentamiento (datos no mostrados). En el caso del aislado A9 los cambios de conformación fueron similares a los de A11 pero más evidentes, inclusive a la menor temperatura, debido al menor grado de desplegamiento inicial de las proteínas presentes en el aislado A9 sin calentar (datos no mostrados).

Estos resultados indicarían que la conformación tipo hoja plegada β es la predominante en los agregados formados en ambos aislado como consecuencia del calentamiento. Resultados similares se han informado para globulinas (RBG) de *Phaseolus angularis* tratadas térmicamente a 70 y 90 °C durante distintos periodos de tiempo, donde se observó un corrimiento en las bandas de la región Amida III, de 1248 y 1274 a 1244 cm^{-1} , indicando una transición a una estructura desordenada. A su vez los agregados solubles e

insolubles de dicha globulina mostraron un desplazamiento de las bandas 1248 y 1270 cm^{-1} , de la región Amida III, a 1240 cm^{-1} . Esto indica que la estructura hoja plegada β predomina en dichos agregados (Meng y col., 2003).

En el aislado A11 tratado a 70 °C, el estiramiento del enlace C-H disminuye en los primeros 3-5 minutos de calentamiento, seguido de un marcado aumento; lo cual sugiere algún tipo de desplegamiento de la molécula por desnaturalización. En cambio a 90 °C, se observó una disminución del enlace de estiramiento C-H a medida que aumenta el tiempo de calentamiento desde los primeros minutos; probablemente debido a un ocultamiento por la formación de agregados (figura 25 a). Estos resultados son concordantes con los datos obtenidos por DSC del aislado A11 tratado térmicamente, los cuales muestran que la temperatura (T_d), y entalpía (ΔH) de desnaturalización fueron afectadas parcialmente por el tratamiento térmico, ya que dichas proteínas se encuentran inicialmente desnaturalizadas en el aislado sin tratar térmicamente.

Ma y col., 2002, observaron en dispersiones de globulina de avena (10 %), en agua destilada, tratadas a 110 °C por diferentes periodos de tiempo, cambios en las intensidades de las bandas del espectro Raman en distintas regiones del mismo. La banda de Amida III disminuyó en los primeros 30 minutos, seguida por un marcado aumento de la intensidad del pico a los 60 minutos, lo cual sugiere desnaturalización de las proteínas. Resultados similares mostraron las intensidades de las bandas de deformación C-H y estiramiento C-H, indicando nuevamente desnaturalización cuando las globulinas fueron calentadas a tiempos prolongados.

En el caso de las globulinas (RBG) de *Phaseolus angularis* se observó un incremento de la banda de estiramiento C-H (2934 cm^{-1}) cuando las proteínas fueron tratadas térmicamente durante 20 minutos a 90 °C (Meng y col., 2003).

Los residuos hidrofóbicos (tirosina y triptofano) en el aislado A11, muestran una mayor exposición hasta los 10 y 15 minutos de calentamiento a 70 °C; mientras que a 90 °C permanecen ocultos (figura 25 b y c).

La exposición de grupos hidrofóbicos en el aislado A11 llevaría, principalmente a 90 °C, a generar un entorno que conduciría a la formación de agregados mediante interacciones intermoleculares hidrofóbicas. Estos estarían además estabilizados por uniones puente hidrógeno, en los que intervendría el fenol de los residuos de tirosina y por enlaces disulfuro tal como lo sugiere el aumento de la intensidad de las bandas 500-537 cm^{-1} a 90 °C (figura 25 d).

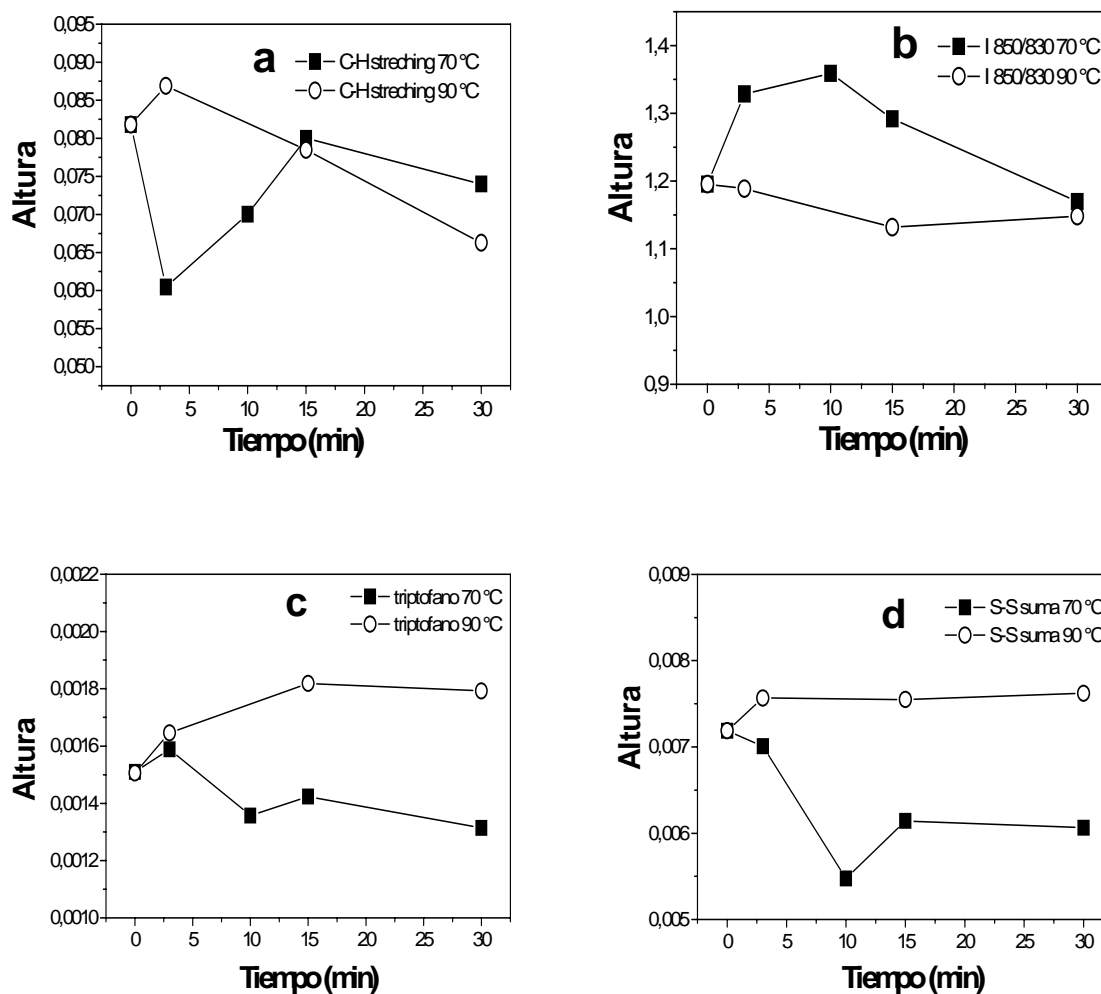


Figura 25. Variaciones de la intensidad de bandas en distintas regiones espectrales, a medida que el aislado A11 se calienta a distintos tiempos a 70 (■) y 90 °C (○). (a) C-H stretching; (b) intensidad relativa doblete de tirosina; (c) triptofano oculto; (d) uniones disulfuro.

En el aislado A9 tratado a 70 °C se observó un incremento del enlace de estiramiento C-H, con el aumento del tiempo de calentamiento, lo cual indica que hubo desplegamiento de las moléculas proteicas, (figura 26 a). En cambio a 90 °C se observó un aumento de la intensidad del enlace C-H hasta los 5 minutos de calentamiento, y luego una disminución a tiempos prolongados (figura 26 a). Es decir que en los primeros minutos de tratamiento a 90 °C las moléculas proteicas se siguen desplegando y a tiempos mayores se reordenan y forman agregados, razón por la cual los enlaces de estiramiento C-H se encuentran ocultos. Se observó mayor exposición de los residuos de tirosina y de triptofano oculto a 90 °C, a tiempos prolongados de tratamiento (15 y 30 minutos) (figura 26 b y c). Las bandas

correspondientes al enlace disulfuro aumentaron de intensidad hasta los 10 minutos para luego disminuir a tiempos prolongados de calentamiento, principalmente a 90 °C, (figura 26 d), sugiriendo la participación de este tipo de enlace en la formación y estabilización de los agregados proteicos.

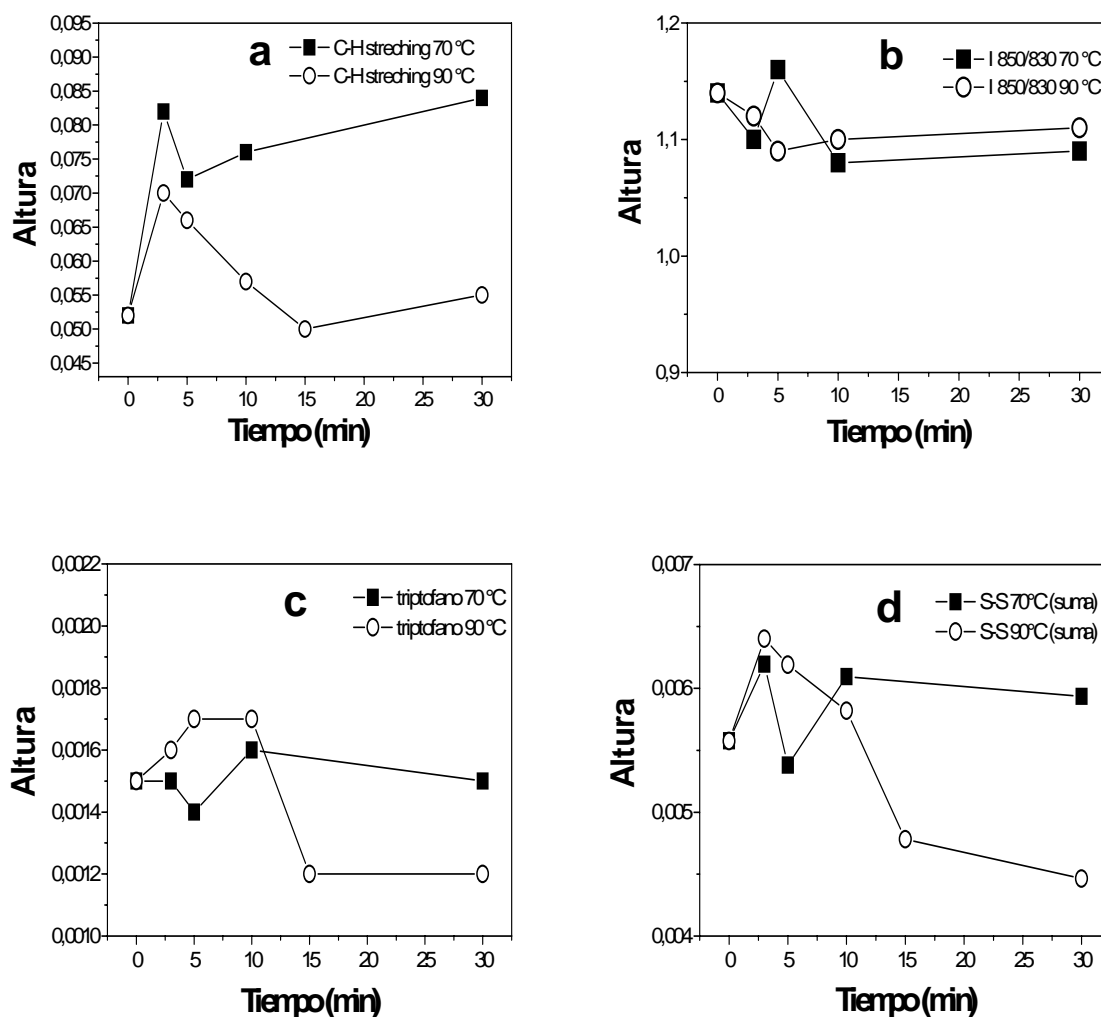


Figura 26. Cambios en la intensidad de bandas en distintas regiones espectrales, a medida que el aislado A9 se calienta a distintos tiempos a 70 (■) y 90 °C (○). (a) C-H stretching; (b) intensidad relativa doblete de tirosina; (c) triptofano oculto; (d) uniones disulfuro.

Los corrimientos progresivos de los picos máximos hacia el azul en los espectros de absorción en el UV; y hacia el rojo en los espectros de emisión de fluorescencia, detectados en las dispersiones de los aislados A9 y A11 tratados térmicamente, indican que

hubo desnaturalización de proteínas, principalmente en el aislado A9 a 90 °C. Los resultados obtenidos por espectroscopia FT-Raman concuerdan con esos resultados.

3.2 Propiedades funcionales de aislados y fracciones proteicas tratados térmicamente.

3.2.1 Solubilidad.

La solubilidad de las proteínas nativas depende de la estructura molecular, especialmente del contenido de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos y del estado físico-químico de sus moléculas que puede ser alterado por distintos factores, (temperatura, pH, fuerza iónica, presencia de solventes orgánicos). La pérdida de solubilidad en general es atribuida a un almacenamiento inapropiado de los alimentos y/o un tratamiento térmico abusivo durante el procesamiento, dando como resultado la desnaturalización y subsecuentemente agregación proteica, (Zdzislaw, 2001). El conocimiento de las características de solubilidad de las proteínas provee información útil para la optimización de las condiciones de procesamiento; además revela el efecto del tratamiento térmico que, podría afectar sus aplicaciones potenciales (Pilosof, 2000). La solubilidad además afecta otras propiedades funcionales de las proteínas, tales como la capacidad de emulsificación, espumado y formación de geles, (Halling, 1981; Cheftel y col., 1993).

En la figura 27, se puede observar que la solubilidad del aislado A9 decreció con el aumento del tiempo de tratamiento térmico, a las dos temperaturas ensayadas, siendo este efecto más importante a 90 °C. Al cabo de 30 minutos de calentamiento a 70 °C la solubilidad del aislado A9 disminuyó un 30 % respecto al valor correspondiente a la muestra sin calentar, mientras que a 90 °C la disminución fue de aproximadamente un 40 % (figura 27 a y b). Como regla general la solubilidad de las proteínas aumenta con la temperatura. Por encima de 40-50 °C, los movimientos moleculares son suficientes para romper los enlaces implicados en la estabilización de las estructuras secundaria y terciaria. Este desplegamiento molecular va frecuentemente seguido de agregación, en cuyo caso la solubilidad de la proteína se hace menor que la nativa.

La solubilidad del aislado A11 se vió ligeramente afectada por ambos tratamientos térmicos, la misma decreció sólo un 10 % respecto a la muestra no tratada (figura 27 a y b). Esto se debe a que el aislado A11 se encuentra parcialmente desnaturalizado debido al pH de extracción, lo cual favorecería la formación de agregados insolubles previo al tratamiento térmico. Estos resultados concuerdan con los respectivos perfiles

electroforéticos (figura 4 c y d), y las restantes propiedades estructurales analizadas (tabla 3).

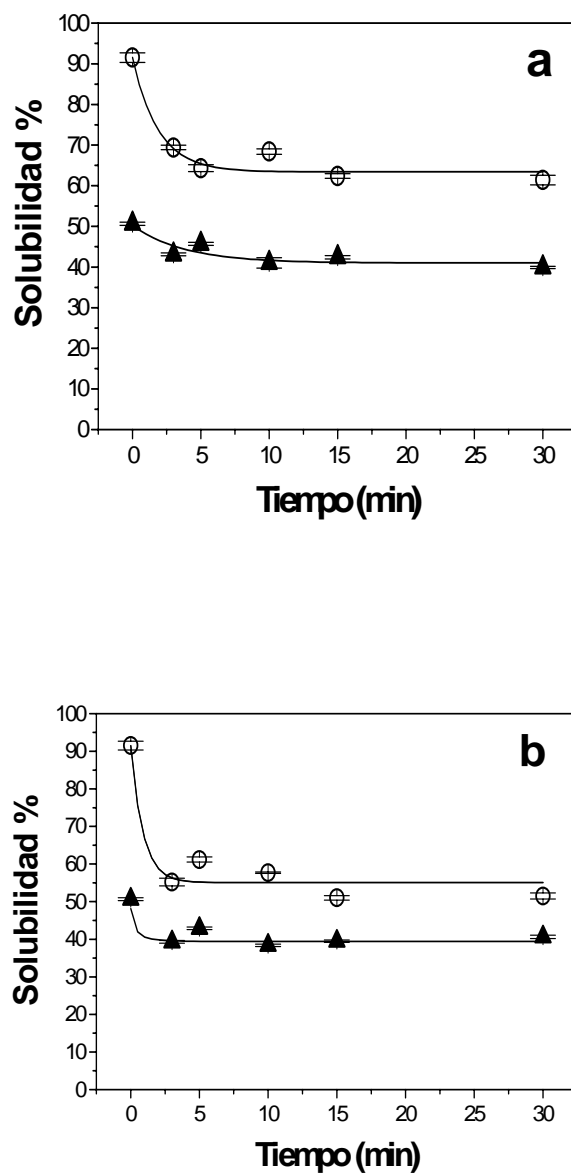


Figura 27. (a) Solubilidad de las proteínas (%) en función del tratamiento térmico a 70 °C y (b) 90 °C de los aislados (O) A9 y (▲) A11.

Las diferencias de hidrofobicidad superficial detectadas en los aislados A9 y A11 a lo largo del calentamiento (figura 12) podrían ser atribuidas al efecto diferencial de la temperatura sobre las diferentes proteínas que permanecen solubles en cada condición.

Estudios previos han demostrado la importancia de la superficie hidrofóbica en las propiedades hidrodinámicas, como la solubilidad, en proteínas de soja, leche y carne (Li-Chan y col., 1984; Hayakawa y Nakai, 1985; Nakai y col., 1986). En la figura 28 se muestra la relación existente entre la hidrofobicidad superficial y la solubilidad de los aislados A9 y A11 tratados a 70 y 90 °C, a distintos tiempo de calentamiento. A 70 °C el aislado A9 muestra mayor solubilidad e hidrofobicidad expuesta respecto al aislado A11. A 90 °C el aislado A9 sigue presentando mayor solubilidad, pero la hidrofobicidad de ambos aislados es semejante. Por consiguiente, como consecuencia de tratamientos térmicos suaves (70 °C) las proteínas del aislado A11 presentarían un mayor grado de agregación mediada por grupos hidrofóbicos que las correspondientes al aislado A9, mientras que las proteínas del aislado A9 se despliegan por efecto del tratamiento térmico. En condiciones de tratamiento más drásticas (90 °C), las proteínas de ambos aislados sufren un mayor desplegamiento molecular, sin embargo la formación de agregados, estabilizados por interacciones hidrofóbicas, continúa siendo más evidente en el aislado A11.

Es de esperar que las proteínas que muestran alta hidrofobicidad presenten baja solubilidad en agua, debido a la tendencia natural de las mismas a agregarse mediante interacciones hidrofóbicas. Este comportamiento fue observado en ambos aislados (A9 y A11) solo a tiempos de calentamiento prolongados y a la mayor temperatura (90 °C), siendo más pronunciado en el aislado A9. En los primeros minutos de calentamiento a 70 °C las proteínas presentes en los dos aislados presentaron baja solubilidad e hidrofobicidad expuesta en comparación con las muestras sin calentar (figura 28). Esto hecho se podría explicar considerando que la hidrofobicidad expuesta se determina en la fracción soluble, por lo tanto las proteínas que intervienen en la agregación serían las más hidrofóbicas y en la fracción soluble permanecerían las más hidrofílicas. A su vez también podría ocurrir que las proteínas que forman los agregados escondan las zonas hidrofóbicas, permaneciendo algunos agregados solubles con poca superficie hidrofóbica.

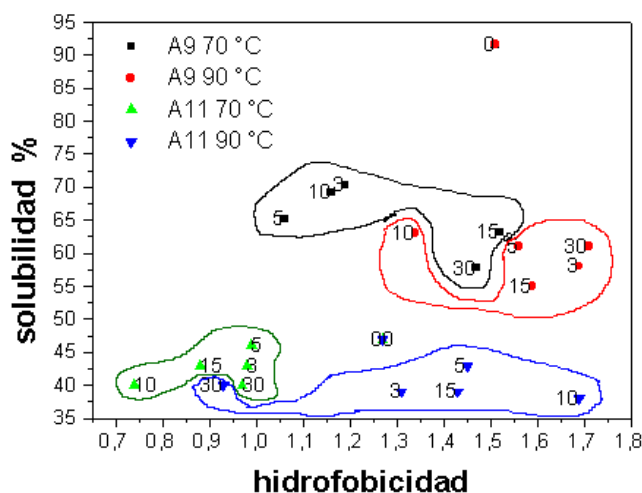


Figura 28. Relación entre solubilidad (%) e hidrofobicidad superficial (H_0) de A9 y A11 a 70 y 90 °C a distintos tiempos de tratamiento térmico. Tiempos de tratamiento: 0, 3, 5, 10, 15 y 30 minutos.

En el caso de las albúminas en agua tratadas durante 60 minutos a 70 y 90 °C, se observó una disminución de la solubilidad respecto a las muestras sin tratar del orden del 10 y 20 %, respectivamente (figura 29 a). A 70 °C no se observaron cambios significativos de la solubilidad proteica con el aumento del tiempo de calentamiento; mientras que a 90 °C se detectó una reducción leve de la solubilidad.

La solubilidad en buffer B ($\mu = 0,08$) (ver ítem 6 de Materiales y Métodos) de las globulinas con el tiempo de tratamiento térmico a 70 °C, no sufrió modificaciones significativas, ($p > 0,05$). En cambio a 90 °C, se observó una disminución de la solubilidad del 30 % a los 30 minutos de calentamiento, seguido de un ligero incremento a tiempos prolongados (60 minutos) (figura 29 b). La disminución de la solubilidad a 90 °C en los primeros minutos de tratamiento se debería a la formación de agregados insolubles, mientras que a tiempos prolongados habría un incremento de agregados solubles.

A bajas fuerza iónica la unión de los iones a la proteína puede aproximar la carga neta a cero induciendo un “salting out” o insolubilización por salado (Petruccelli, 1993; Utsumi y Kinsella, 1985 a y b). Esto podría explicar la menor solubilidad de la fracción globulina respecto a las albúminas.

El comportamiento de la solubilidad de las globulinas frente al tratamiento térmico es similar a lo observado en los aislados proteicos (A9 y A11), en las mismas condiciones de

tratamiento térmico, lo cual está de acuerdo con la alta proporción de ésta fracción en dichos aislados.

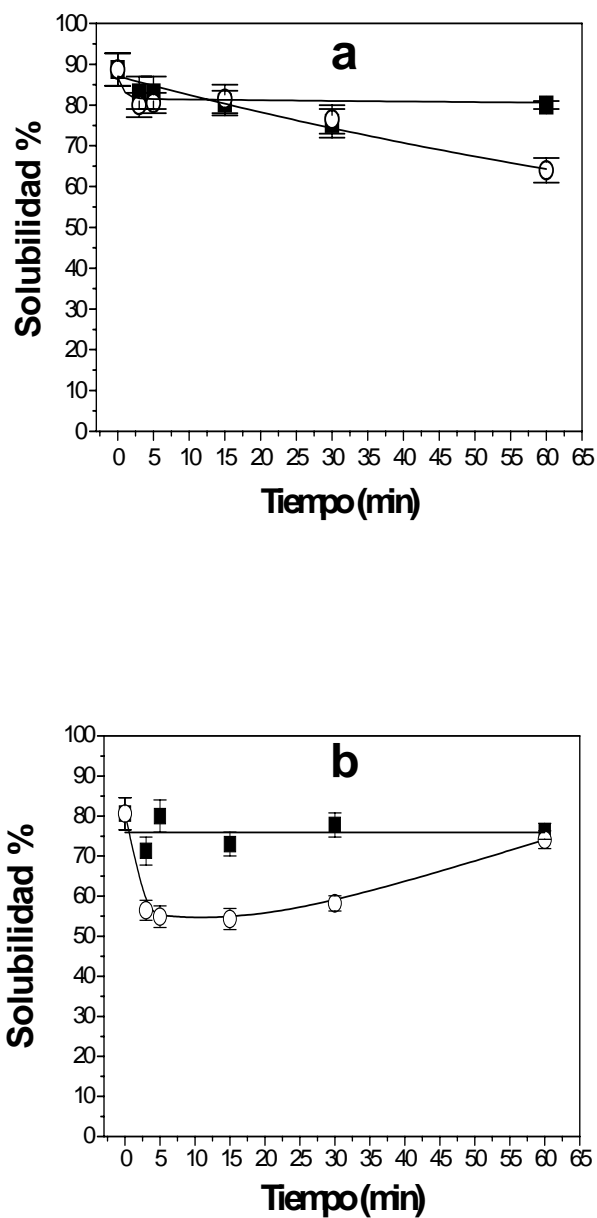


Figura 29. Solubilidad de dispersiones (1mg/ml) de albúminas en agua y globulinas en buffer B, en función del tiempo de tratamiento térmico a 70 °C (■), y 90 °C (○). (a) fracción soluble albúminas, (b) fracción soluble globulinas.

CAPITULO II

GELES PROTEICOS DE AMARANTO

La gelificación de proteínas globulares inducida por tratamiento térmico fue ampliamente descrita en varios estudios (Grinberg y col., 1992; Clark y col., 2001). Teniendo en cuenta que el valor nutritivo del grano de amaranto se incrementa con el procesamiento térmico, (Mendoza y Bressani, 1987); y la falta de información sobre las propiedades de gelificación de proteínas de amaranto decidimos estudiar la capacidad gelificante de estas proteínas. Un gran desafío es incorporar amaranto en la formulación de alimentos gelificados y de ésta manera modificar la calidad funcional y nutricional de los mismos.

Algunos parámetros como temperatura, tiempo de tratamiento y concentración proteica de las dispersiones iniciales, influyen en el proceso de gelificación por tratamiento térmico, y en las características de la matriz formada; y consecuentemente en las propiedades del gel (Clark y Lee-Tuffnell, 1986).

En base a lo expuesto el objetivo de esta sección fue estudiar la capacidad de gelificación de aislados nativos de proteínas de amaranto (A9), las propiedades estructurales y la capacidad de retención de agua de matrices proteicas formadas bajo diferentes condiciones de tratamiento (tiempo de calentamiento 10-30 minutos; temperatura, 70-95 °C y concentración proteica 10-20 % p/v). Los geles formados presentarán además características viscoelásticas y propiedades reológicas dependientes de las condiciones de tratamiento térmico empleadas.

1. Condiciones de gelificación.

El proceso de gelificación de suspensiones proteicas implica el calentamiento de las mismas con un enfriamiento posterior. La concentración de proteínas, la temperatura y el tiempo de tratamiento térmico para lograr la formación de un gel, son valores propios de cada proteína. Estas variables críticas para el proceso de gelificación, son las que se han tenido en cuenta para el estudio de las características estructurales de los geles de proteínas de amaranto.

El proceso y las condiciones óptimas de gelificación pueden seguirse por medidas de los parámetros reológicos G' (módulo elástico) y G'' (módulo viscoso). Bikbov y col., (1981), informó la obtención de geles a partir de aislados de soja basándose en dichos parámetros, llegando a la conclusión de que pueden obtenerse geles estables a una concentración de 6,6 % de proteínas sometidas durante 42 minutos a 88 °C.

En este trabajo se realizaron ensayos de calentamiento a distintas temperaturas (70, 80, 90 y 95 °C) y tiempos de tratamiento (10, 20 y 30 minutos), de suspensiones proteicas de los aislado A9 y A11, de concentración conocida (5, 7, 10 y 15 % p/v), con una posterior etapa de enfriamiento. Luego del tratamiento térmico, se observó el aspecto, color, consistencia y textura del producto obtenido. A partir de estos primeros ensayos de gelificación se observó que las suspensiones de aislado A9 formaban geles de mayor consistencia y mejor aspecto que las del aislado A11. Este comportamiento puede, en principio, ser atribuido a la diferencia en composición y por ende a las características fisicoquímicas de las proteínas presentes en ambos aislados. Mientras que el aislado A9 está enriquecido en globulinas (11S y P), con alta capacidad de formación de puentes disulfuro intercatenarios, el aislado A11 posee también glutelinas y todas sus proteínas se encuentran altamente desplegadas. A su vez según los resultados de la espectroscopia FT-Raman (ver ítem 3.1.6 Resultados y Discusión de Aislados y Fracciones Proteicas), el aislado más alcalino (A11) presenta una estructura más desordenada y desnaturalizada que el aislado A9.

La desnaturalización de proteínas y la ruptura de enlaces peptídicos podrían tener lugar a pH alcalinos elevados, usados en la extracción de proteínas; a su vez algunas propiedades funcionales podrían afectarse por este tratamiento, (Paredes-López y col., 1988). Cheftel y col., (1993), señala que las proteínas que se presentan inicialmente en un estado desnaturalizado, suelen ser poco eficaces en los procesos de gelificación, emulsificación o formación de espumas.

Basándose en todo lo mencionado anteriormente decidimos estudiar la capacidad de gelificación en el aislado A9, ya que la del aislado A11 sería menos eficaz para la formulación de alimentos gelificados.

La concentración de proteínas es uno de los factores que más incide en las características finales de los geles. Las proteínas exhiben una concentración mínima por debajo de la cual no gelifican. En el caso de la mayoría de las proteínas vegetales, ésta concentración se encuentra alrededor del 7 % (Catsimpoolas y col., 1970). En el caso del aislado proteico de amaranto A9, al 7 % p/v se formó un gel débil, mientras que por encima del 10 % p/v se formaron geles autosustentables. Es sabido que para que se formen geles autosustentables inducidos por calor se necesita aplicar un tratamiento térmico que asegure la desnaturalización de las proteínas.

Los geles del aislado A9 formados, en las distintas condiciones ensayadas, fueron opacos y estaban constituidos por una matriz proteica de gránulos finos.

Para analizar con detalle las características y propiedades de los geles formados se realizaron una serie de estudios adicionales los cuales se describen a continuación.

1.1 Determinación de concentración y temperatura críticas de gelificación.

Las condiciones de concentración crítica (C_{crit}) y temperatura crítica (T_{crit}) de gelificación del aislado A9 de amaranto se presentan en la figura 30. Esta figura muestra la variación de los parámetros dinámicos G' (módulo elástico) y G'' (módulo viscoso), (medidos a 1 Hz de frecuencia) con la concentración del aislado y la temperatura. C_{crit} y T_{crit} se pueden interpretar como la concentración y temperatura, respectivamente, a las cuales G' comienza a diferenciarse de G'' . Por debajo de 7 % p/v se forman estructuras con bajo G' , tanto durante el calentamiento como después de la etapa de enfriamiento, (figura 30 a y b). El aumento de la concentración proteica por encima de este nivel, provoca un incremento de ambos módulos, especialmente del elástico (G'), siendo este efecto mucho más pronunciado después del enfriamiento (geles), a 25 °C (figura 30 b). En consecuencia la dispersión se vuelve más elástica ($G' > G''$) a concentraciones mayores a 7 % p/v.

A efectos de determinar la temperatura crítica de gelificación se analizó la variación del modulo elástico entre 50 y 95 °C. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 30, paneles c y d. En el caso de las dispersiones calentadas a 50 y 60 °C el módulo elástico (G') y el viscoso (G'') presentaron valores muy bajos y similares (figura 30 c). El módulo elástico (G'), superó el módulo viscoso (G'') a partir de 70 °C, valor que coincide con la primera temperatura de desnaturalización del aislado A9 (69,9 °C). Es decir que a 70°C se encuentra un punto de inflexión, por encima del cual G' fue superior a G'' , especialmente a 90 y 95°C, (figura 30 c), ya que a estas temperaturas se alcanza la temperatura de desnaturalización de la globulina 11S y globulina-P, que son las fracciones mayoritarias en el aislado A9 (Martínez y Añón, 1996). Con respecto a los valores del módulo viscoso (G'') estos resultaron prácticamente constantes a todas las temperaturas ensayadas, indicando que el mismo no experimenta cambios considerables con el aumento de la temperatura (figura 30 c).

Igual comportamiento de los parámetros reológicos se observó para las dispersiones procesadas a las distintas temperaturas y posteriormente enfriadas (geles) a 25°C (figura 30 d), obteniéndose en este caso valores mayores para ambos módulos (G' , G''). Este comportamiento podría ser atribuido a la formación de uniones hidrógeno durante el período de enfriamiento, las cuales participarían en la estabilización de la matriz proteica, junto con interacciones hidrofóbicas y uniones disulfuro.

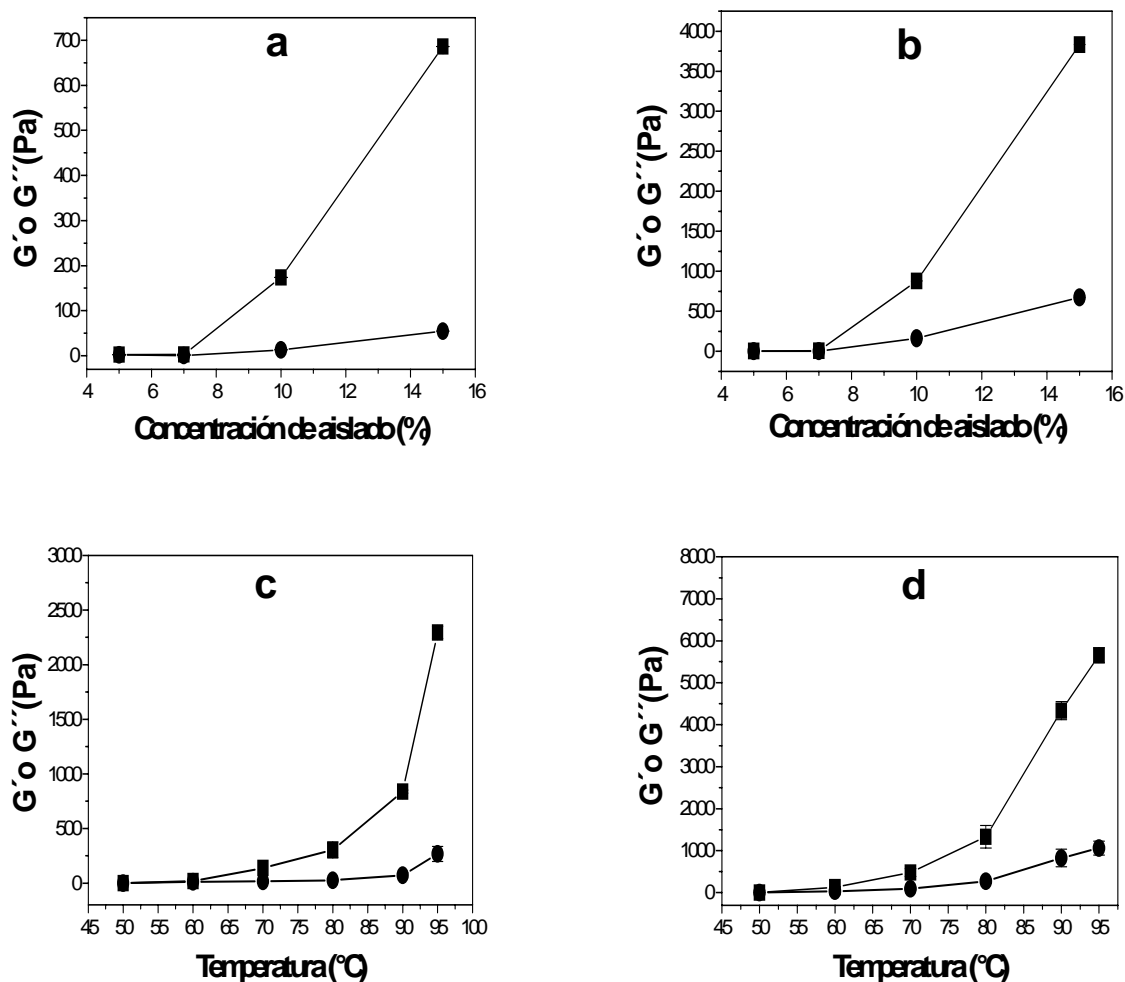


Figura 30. Efecto de la concentración del aislado A9 (dispersiones calentadas a 90 °C durante 20 minutos) (a,b), y de la temperatura de calentamiento (geles 15 % calentados durante 20 minutos) (c,d) en los módulos elástico (G'), (■) y viscoso (G''), (●) de geles de proteína de amaranto. Medidas realizadas: (a,c) después del calentamiento; (b,d) después del enfriamiento a 25 °C.

La concentración dependiente del módulo elástico, da información de la eficiencia de la gelificación y de la estructura de partícula de la matriz proteica (Renkena y van Vliet, 2004), lo cual se puede aproximar por una función exponencial $G \propto C^n$ (Clark y col., 1990). Una relación de éste tipo fue obtenida para dispersiones del aislado A9 durante el tratamiento térmico (90 °C durante 20 minutos), y después del proceso de enfriamiento:

$$G' = a C^b \quad (\text{ec. 7})$$

donde **a** es la ordenada al origen y **b** es un índice que refleja la naturaleza de las asociaciones y la estructura de la matriz.

Para dispersiones donde el parámetro G' fue medido durante la etapa de calentamiento, los valores de **a** y **b** fueron $1,47 \times 10^{-4}$ y 5,7 ($r^2=0,909$), respectivamente, mientras que los valores correspondientes a los geles después del enfriamiento fueron $1,94 \times 10^{-5}$ y 7,1 ($r^2=0,859$). Los valores altos de **b** para geles de proteínas de amaranto, especialmente los obtenidos durante la etapa de enfriamiento, podrían atribuirse a la alta proporción de uniones disulfuro presentes en la matriz de los geles del aislado A9. En muchos casos de geles de biopolímeros, el módulo elástico es aproximadamente proporcional a C^2 a altas concentraciones (10-20 % p/v), (Matsumura y Mori, 1996). También han sido informados valores de **b** de 3,4 para geles de glicinina de soja (2-7 % p/v), (Kohyama y col., 1992) y de 10,3 para aislados de proteína de soja a pH 7 (Renkena y van Vliet, 2004). Valores semejantes del exponente **b** indican un comportamiento similar de las asociaciones y de la estructura de la matriz, aunque diferentes fuerzas químicas podrían predominar en cada tipo de gel.

De acuerdo con Grinberg y col., (1992), para asegurar una adecuada gelificación se requiere una concentración de proteínas y una temperatura mínimas. En el caso de las proteínas de amaranto los resultados obtenidos para el aislado A9 fueron 7 % p/v y 70 °C, respectivamente.

2. Comportamiento reológico de las dispersiones proteicas.

El análisis y cuantificación del comportamiento reológico de los alimentos y el estudio de las causas químicas y estructurales que lo determinan, es un asunto de gran interés en la Ciencia de los Alimentos. Su importancia además de tecnológica, es económica y comercial, ya que los efectos del transporte y de la manipulación en la integridad física de los alimentos, su comportamiento durante los procesos de elaboración y la calidad de la textura del producto acabado, dependen en gran parte de su respuesta frente a la aplicación de fuerzas externas (Costell y col., 2002).

La reología es la Ciencia que estudia los fenómenos de deformación y flujo de sólidos y fluidos bajo la influencia de fuerzas mecánicas los cuales determinan las propiedades funcionales de los alimentos durante los tratamientos, almacenamiento e incluso al momento del consumo (Cheftel, 1976). Desde el punto de vista reológico se presentan dos situaciones extremas; el sólido ideal que sigue la ley de Hooke y el fluido

ideal que sigue la ley de Newton. A la región intermedia pertenecen los materiales viscoelásticos (Cheftel, 1976). Los geles proteicos de amaranto se comportan como materiales viscoelásticos.

Para caracterizar materiales viscoelásticos se pueden usar tres tipos de métodos: transientes, dinámicos y de esfuerzos normales (Mitchell, 1984). Para el seguimiento del proceso de gelificación se utiliza la reología dinámica oscilatoria de pequeña amplitud, ya que las pequeñas deformaciones no afectan la estructura del material (Ross-Murphy, 1995a).

2.1 Determinación del punto gel.

A medida que el gel se va formando los parámetros reológicos (G' , módulo elástico; G'' , módulo viscoso; $\tan \delta$, tangente del ángulo de deformación; η^* , viscosidad dinámica) cambian en función del tiempo. En el estado fluido el módulo viscoso (G'') es mayor que el módulo elástico (G'), luego de un cierto tiempo ambos empiezan a aumentar, siendo más rápido el incremento en G' . A un cierto tiempo G' y G'' se cruzan y G' se hace mayor que G'' , este punto de cruce se considera como el tiempo en el cual ocurre la gelificación (punto gel) (Pilosof, 2000). El tiempo de gelificación se puede estimar de la curva G' y G'' vs. tiempo, cuando G' se hace medible (Ross-Murphy, 1995a).

Sobre la base de lo expuesto se analizó la variación del módulo elástico (G') y del módulo viscoso (G'') con el tiempo al cual se sometieron las dispersiones proteicas del aislado A9 (15 % p/v) a distintas temperaturas, a una frecuencia de 1 Hz y una deformación de 0,01 %. Se eligió ésta concentración proteica debido a que ensayos preliminares (ver ítem 1), demostraron que en dichas condiciones las proteínas de amaranto gelifican.

En el caso de las dispersiones calentadas a 50 y 60 °C no se detectó intersección de los módulos elástico (G') y viscoso (G''), y los valores fueron bajos y constantes durante todo el tratamiento, (datos no mostrados). Esto indica que dichas temperaturas no son suficientes para alcanzar el punto de gelificación. El “punto de gel” para las muestras de aislado A9 (15 % p/v) calentadas a 70 °C fue de aproximadamente 5 minutos, valor que disminuyó un 25–30 % a temperaturas igual o superiores a 80 °C (tabla 6). El punto de cruce se produjo a tiempos cortos de calentamiento, especialmente cuando se logra la desnaturalización, al menos parcial, de las principales fracciones proteicas de amaranto ($T \geq 80^\circ\text{C}$).

Tabla 6. Tiempos de gelificación de los geles del aislado A9 de amaranto preparados al 15 % p/v a distintas temperaturas durante 20 minutos de calentamiento.

| T(°C) | Tiempo de gelificación (minutos) | G' = G'' (Pa) |
|-------|----------------------------------|---------------|
| 70 | 5,33 ± 0,23 | 2,08 ± 0,19 |
| 80 | 3,99 ± 0,19 | 1,03 ± 0,20 |
| 90 | 3,58 ± 0,00 | 0,75 ± 0,01 |
| 95 | 3,67 ± 0,24 | 0,53 ± 0,30 |

2.2 Cinética de gelificación.

La figura 31 muestra la variación de G' y la $\tan \delta$ en función del tiempo de calentamiento para dispersiones al 15 % p/v, tratadas a 50, 60, 70, 80, 90 y 95 °C, durante 20 minutos. En estas figuras se puede observar un incremento del módulo elástico (figura 31 a), y una disminución de la $\tan \delta$ (figura 31 b), con la temperatura y el tiempo de calentamiento. Temperaturas de tratamiento térmico superiores a 90 °C no afectan los valores de los módulos de pérdida (G'') y almacenamiento (G'). A temperaturas iguales o superiores a 80 °C se formó una matriz elástica ($\tan \delta < 0,1$). A temperaturas inferiores (50 y 60 °C) a las de desnaturalización (T_d), la componente viscosa (G'') de la dispersiones fue alta, obteniéndose valores de $\tan \delta$ mayores a 0,25 (figura 31 b).

El mayor aumento de G' para las temperaturas ensayadas, con excepción de 50 y 60 °C, se produjo dentro de los 20 minutos de tratamiento térmico, lo que justifica la elección de dicho período de tiempo, para la preparación de los geles del aislado A9 (figura 31 a). El módulo elástico de saturación o de equilibrio (G'_{sat}), para los geles preparados a 70, 80, 90 y 95 °C, fue alcanzado dentro de dicho intervalo de tiempo (figura 31 a).

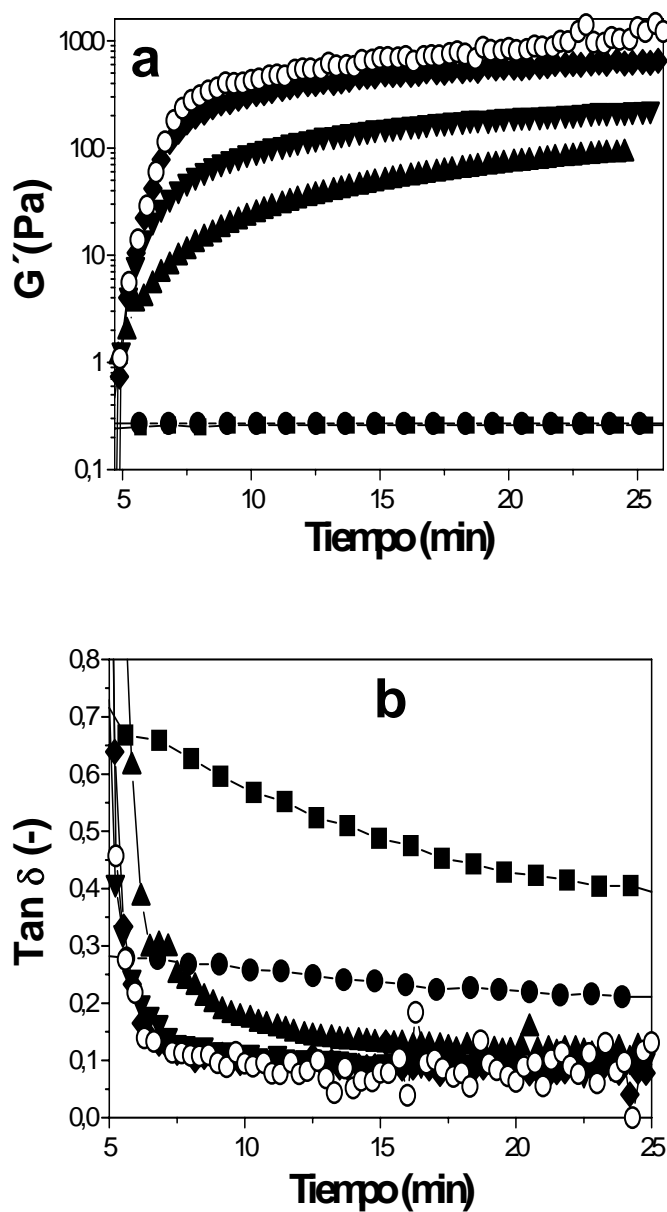


Figura 31. Influencia del tratamiento térmico (50 °C, ■; 60 °C, ●; 70 °C, ▲; 80 °C, ▼; 90 °C, ◆; 95 °C, ○) en la cinética de gelificación (módulos vs. tiempo) de dispersiones proteicas de amaranto (15 % p/v). (a) G' , (b) $\tan \delta$ (G''/G').

Con el fin de correlacionar las velocidades de gelificación a cada temperatura, los datos experimentales de las curvas de G' vs. tiempo de dispersiones proteicas al 15 % p/v (figura 32 a), se ajustaron a un modelo representado por la ecuación:

$G'(t) = G'_{sat} [1 - \exp(-kt)]$ (Nishinari y col., 1991; Yoshida y col., 1992; Puppo y col., 1998a, 1999b). Los valores de la constante de velocidad de gelificación (K) y del módulo elástico de saturación (G'_{sat}) para cada temperatura, se muestran en la tabla 7. Los mismos se obtuvieron por regresión no lineal de los datos experimentales aplicando la ecuación vista precedentemente, utilizando el software Microcal Origin 5.0.

Con el aumento de la temperatura de gelificación se detectó un aumento de la constante específica de velocidad de reacción (K), (tabla 7). Este aumento fue más pronunciado a temperaturas superiores a 70 °C. No se observaron diferencias significativas entre las constantes de gelificación de las dispersiones calentadas a 80, 90 y 95 °C. Un comportamiento similar fue observado para globulinas 7S y 11S en leche de soja después del tratamiento térmico a 80 °C (Nishinari y col., 1991; Yoshida y col., 1992; Nagano y col., 1994b).

Las constantes cinéticas de gelificación de los geles del aislado A9 de amaranto tratados a 90 y 95 °C fueron similares a los geles de aislados de soja a pH 8, tratados a 90 °C durante 30 minutos y enfriados a 4 °C por 48 h ($K \cong 0,043 \text{ min}^{-1}$); en cambio los valores de G'_{sat} de los geles de soja fueron más bajos ($\cong 640 \text{ Pa}$) (Puppo y Añón, 1998a).

Tabla 7. Constantes de velocidad de gelificación (K) y módulos elásticos de saturación (G'_{sat}), de geles del aislado A9 de amaranto al 15 % p/v tratados durante 20 minutos a distintas temperaturas.

| T °C | K (min ⁻¹) ^a | G' sat. (Pa) ^a |
|------|-------------------------------------|---------------------------|
| 70 | 0,03671 ± 0,0002 | 116,02 ± 16,94 |
| 80 | 0,04034 ± 0,0010 | 405,14 ± 104,24 |
| 90 | 0,04254 ± 0,0027 | 1054,79 ± 127,18 |
| 95 | 0,04400 ± 0,0040 | 1214,47 ± 145,07 |

^a $r^2 > 0,984$

La velocidad específica de gelificación (K), responde a un modelo tipo Arrhenius: $K = K_0 * e^{-E_a/R*T}$, resultando $K_0 = 0,7034$ y $E_a = 1,761 \text{ KJ/mol*K}$ (figura 32 a). Este comportamiento indicaría que la cinética de gelificación de las proteínas de amaranto

estaría gobernada principalmente por la desnaturalización de las especies de menor estabilidad térmica.

El módulo elástico de saturación (G'_{sat}) incrementa en forma constante con la temperatura al menos 10 veces cada 15 °C de variación. Las dispersiones de aislado proteico de amaranto al 15 % p/v, por encima de 70 °C, gelificaron entonces a velocidad constante, pero con valores del módulo elástico dependientes de la temperatura de tratamiento térmico hasta 90 °C. A partir de estos datos se verifica que el G'_{sat} es una función lineal de la temperatura según la siguiente expresión: $G'_{sat} = K \cdot T$, siendo $K = 46,48 \text{ Pa/K}$ con un ajuste de 0,986 (figura 32 b).

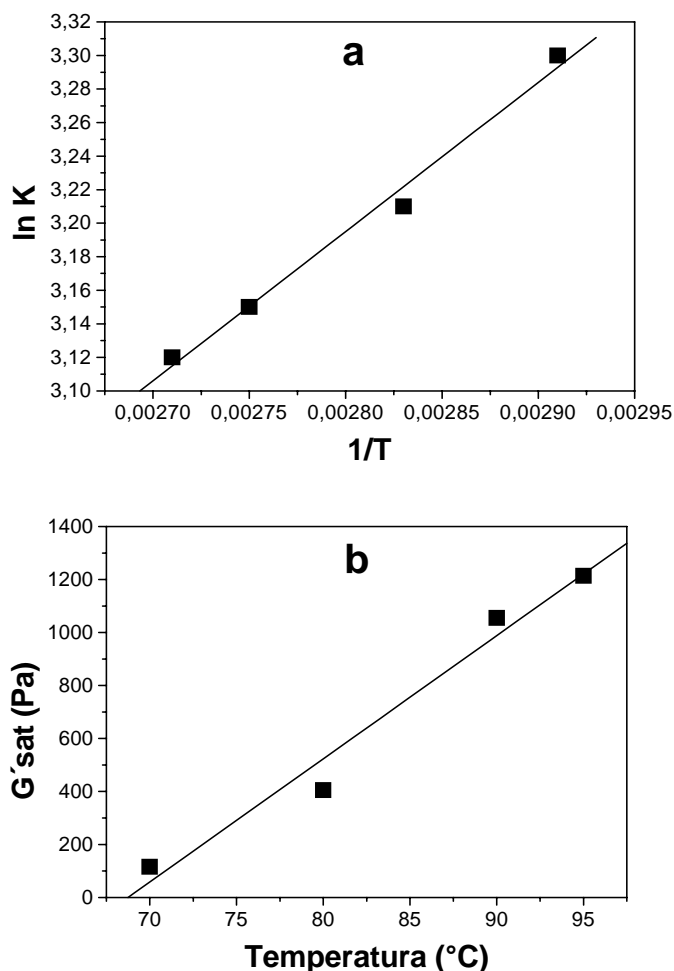


Figura 32. a) La velocidad específica de gelificación de suspensiones del aislado A9 de amaranto al 15 % p/v calentadas durante 20 minutos, responden a un modelo tipo Arrhenius. b) Variación del módulo elástico de saturación (G'_{sat}) de dichas suspensiones en función de la temperatura de tratamiento.

Por otra parte los altos valores de G'_{sat} , sugieren una matriz más estructurada de los geles de amaranto, debido probablemente a la formación, durante la etapa de calentamiento, de una alta proporción de uniones disulfuro entre globulinas (11S y globulina-P) y otras fracciones proteicas en el aislado. En el caso de las proteínas de soja ha pH ácido las interacciones no covalentes juegan un rol esencial tanto en la formación como en la estabilización de la matriz de los geles obtenidos por tratamiento (Van Kleef, 1986; Puppo y col., 1995); en tanto que a pH 7 las uniones disulfuro son las principales responsables del proceso de agregación, formación y rigidez de la matriz proteica de los geles (Renkena, 2001).

Según Chronakis (1996), el tratamiento térmico a altas temperaturas favorece dos fenómenos opuestos: a) ruptura de los puentes hidrógeno y disminución de las fuerzas electrostáticas, b) estabilización de las interacciones hidrofóbicas, lo cual facilita la asociación molecular en la estructura tridimensional. El valor del módulo elástico (G') es el resultado de este balance, si predomina el primer fenómeno G' es bajo, mientras que si predomina el segundo G' alcanza valores más altos. Considerando los valores de G' y G'_{sat} obtenidos para las dispersiones proteicas del aislado A9 de amaranto y su fuerte dependencia con la temperatura, se pudo inferir que en este caso prevalece la interacción de las cadenas polipeptídicas mediante interacción hidrofóbica.

Los cambios en el módulo elástico (G'), reflejan directamente las modificaciones estructurales que sufren las proteínas durante el proceso de gelificación. Evidencias basadas en el análisis de espectroscopia FT-IR y FT-Raman, de geles de diferentes proteínas globulares, sugieren que la estructura hoja plegada β , es esencial en las interacciones proteína-proteína y formación de la matriz. Las uniones puente hidrógeno intermolecular entre estructuras hoja plegada β paralelas o antiparalelas puede actuar como zonas de empalme y así estabilizar la matriz del gel (Wang y Damodaran, 1991).

La exposición de grupos hidrofóbicos durante la desnaturalización térmica crea un ambiente favorable para la formación de agregados debido a las uniones puente hidrógeno intermoleculares y a las interacciones disulfuro. Los agregados del aislado A9 formados por tratamiento térmico poseen un predominio de estructura hoja plegada β . La formación de este tipo de estructura secundaria tuvo probablemente una influencia directa en el incremento del módulo elástico (G'), con la temperatura. La formación de una estructura hoja plegada β , observada por FT-IR en las subunidades de β -conglucina y glicina de soja, fue acompañada por un incremento en el módulo elástico (G'). Estos resultados

concuerdan con la idea que los geles de proteínas globulares, inducidos por calor, presentan una matriz formada por entrecruzamiento de estructuras hoja plegada β intermolecular (Nagano y col., 1994a).

En la figura 33 se muestra la capacidad de gelificación, representada por la viscosidad dinámica (η^*), en función del tiempo. La viscosidad dinámica, en iguales condiciones experimentales, presentó un comportamiento análogo al módulo elástico (G'), (figura 31 a). Esto sugiere la formación de una estructura más viscoelástica con el aumento de la temperatura de gelificación.

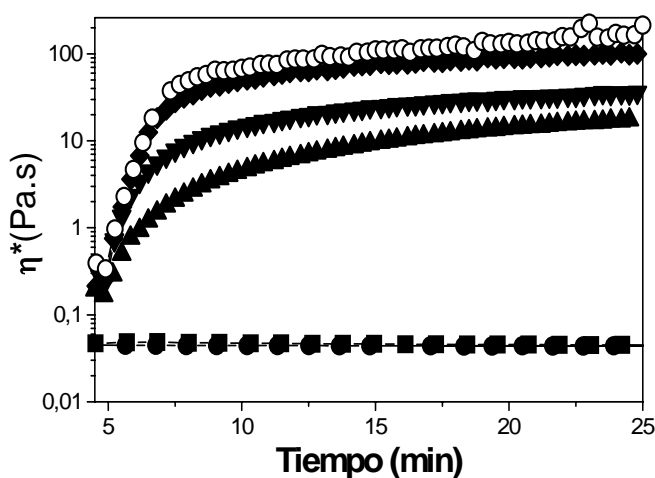


Figura 33. Variación de la viscosidad dinámica (η^*) en función del tiempo de calentamiento de dispersiones al 15 % p/v del aislado A9 de amaranto tratadas a distintas temperaturas: 50 °C, (■); 60 °C, (●); 70 °C, (▲); 80 °C, (▼); 90 °C, (◆); 95 °C, (○).

3. Caracterización reológica de geles.

3.1 Comportamiento viscoelástico.

Para caracterizar al material viscoelástico por medio de medidas oscilatorias dinámicas, primero se somete al material a un barrido de deformación con el fin de determinar los límites del comportamiento viscoelástico lineal. En la región lineal las propiedades reológicas no son dependientes de la deformación (Steffe, 1996).

El rango de viscoelasticidad lineal para los geles del aislado A9 de amaranto se determinó a partir del gel preparado al 15 % p/v de proteínas, tratado a 95 °C durante 20 minutos; ya que el rango de linealidad disminuye al aumentar la temperatura de

tratamiento térmico (Puppo, 1997). Las muestras presentaron una deformación límite de 10 %. Basándose en estos resultados los barridos de frecuencia, a diferentes temperaturas, se realizaron a una deformación del 1 %.

3.1.1 Efecto del tratamiento térmico.

El barrido de frecuencia muestra la manera en que el módulo elástico (G') y el viscoso (G''), del material, cambian con la velocidad de aplicación de la deformación (Pilosof, 2000).

En las figuras 34 a y b, se muestra el efecto del tratamiento térmico en las características viscoelásticas de los geles, mediante los espectros mecánico de geles al 15 % p/v del aislado A9, realizados después de calentar durante 20 minutos a distintas temperaturas (50, 60, 70, 80, 90 y 95 °C), y luego de enfriar dichos geles durante 10 minutos a 25 °C.

La caracterización reológica de un gel debe responder al siguiente patrón; el módulo G' considerablemente mayor que G'' , y ambos independientes de la frecuencia en un rango amplio de frecuencias (Almdal y col., 1993; Giboreau y col., 1994; Ross-Murphy, 1995b).

En la dispersión del aislado A9 al 15 % p/v, a 50 °C, G' se hace mayor que G'' a medida que aumenta la frecuencia de oscilación, lo cual corresponde a un comportamiento tipo solución entrelazada (Giboreau y col., 1994; Ross-Murphy, 1995b), mientras que a 70 y 95 °C, tanto G' como G'' no son dependientes de la frecuencia, siendo en todos los casos G' mayor que G'' (figura 34 a), respondiendo a un comportamiento de tipo-gel fuerte (Ross-Murphy, 1995a). Los mayores valores de G' y G'' se observaron en la dispersión calentada a la mayor temperatura (figura 34 a).

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos decir, que por encima de 70 °C, las dispersiones son más elásticas que viscosas, y 95 °C es la temperatura óptima para la preparación de geles, dado que asegura una completa desnaturalización de las proteínas, necesaria para la gelificación. Las propiedades del gel dependen de la temperatura de desnaturalización de las proteínas (Matsumura y Mori, 1996).

El proceso completo de gelificación consta, como se dijo previamente, de dos etapas la primera de calentamiento, en donde la proteína se desnaturaliza, seguida de un entrecruzamiento progresivo de las moléculas a través de interacciones físicas y/o químicas, generando de esta manera una matriz primaria que tiene las propiedades de un sólido viscoelástico; y la segunda etapa, de enfriamiento en donde se forma la estructura final del gel (Pilosof, 2000).

Los espectros mecánicos que presentan estos geles después de enfriar a 25 °C durante 10 minutos, son semejantes a los obtenidos en la etapa de calentamiento, pero con valores de G' y G'' mayores (figura 34 b).

El enfriamiento de los geles del aislado A9 de amaranto al 15 % p/v, luego del tratamiento térmico, intensificó las uniones puente hidrógeno entre las moléculas de proteínas, provocando un aumento del módulo elástico (G') mayor al observado en la etapa de calentamiento. Los valores del módulo elástico (G') luego del enfriamiento para las dispersiones calentadas a 50 y 60 °C no difirieron a los correspondientes a la etapa de calentamiento (figura 34 b). Chronakis (1996), también observó un aumento del módulo elástico (G') durante el enfriamiento de dispersiones proteicas de soja al 14 y 20 % p/p (pH 7), con tratamiento térmico previo.

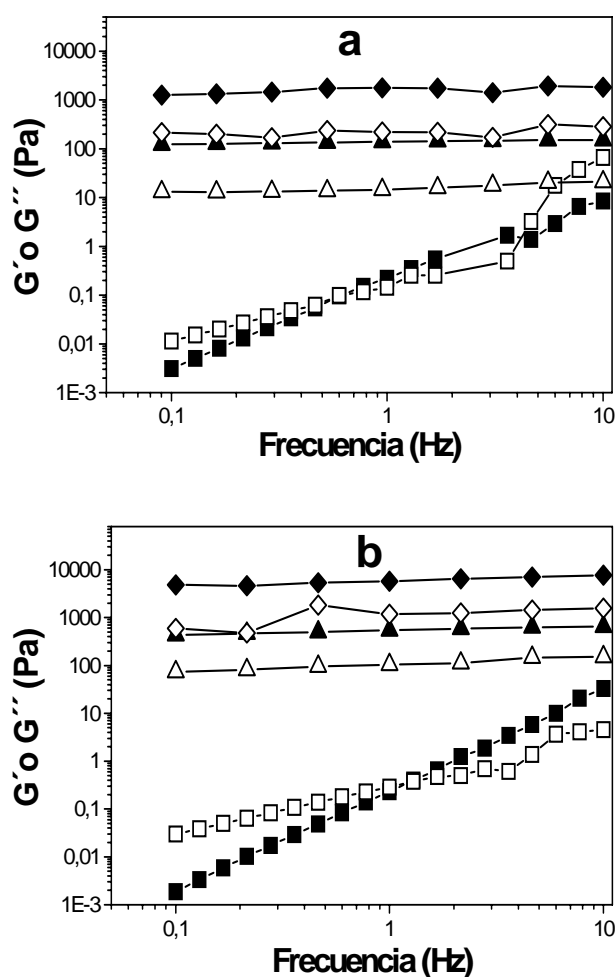


Figura 34. Barrido de frecuencia del módulo elástico G' (■▲◆) y viscoso G'' , (□△◇) a distintas temperaturas de gelificación 50 °C (■□); 70 °C (▲△); 95 °C (◆◇), de dispersiones al 15 % p/v del aislado A9. (a) en caliente y (b) en frío.

Otra función que se usa comúnmente para describir la viscoelasticidad de geles es la tangente del ángulo de deformación ($\tan \delta = G''/G'$) (Cooney y col., 1993). En la figura 35 se muestra la variación de la tangente del ángulo de defasaje (medidos a 1 Hz de frecuencia) en función de la temperatura de gelificación, tanto en la etapa de calentamiento como de enfriamiento. En las dispersiones del aislado A9 al 15 % p/v se observó en la primer etapa a 60 °C un comportamiento netamente viscoso, con valores de $\tan \delta$ superiores a 0,6; en todo el rango de frecuencia. A temperaturas superiores a 70 °C el comportamiento predominante fue de tipo elástico con $\tan \delta < 0,15$. La mayor elasticidad la presentaron las dispersiones calentadas a 90 °C, ($\tan \delta < 0,1$) (figura 35). Esta disminución de la $\tan \delta$, podría deberse a una mayor participación de las interacciones hidrofóbicas y uniones disulfuro durante la gelificación. Las interacciones hidrofóbicas entre grupos no polares asociadas a la estructura de la red del gel, se ven favorecidas por un aumento en la temperatura (Catsimpoolas y col., 1970). La gran proporción de sulfhidrilos libres y uniones disulfuro de la globulina 11S y especialmente de la globulina-P en las proteínas de amaranto darían lugar a la formación de estructuras más elásticas de baja solubilidad aún en presencia de agentes desnaturizantes. Las uniones disulfuro intramoleculares brindan rigidez y estabilidad a la estructura proteica, propiedades que contribuyen durante el procesamiento de alimentos, tanto en la formación como en la estabilización del gel (Castellani y col., 1999). Por lo tanto la elasticidad de los geles estaría influenciada principalmente por la desnaturización de la globulina 11S y globulina-P, cuyas Td están en el orden de las temperaturas más altas de calentamiento (90 y 95 °C).

Luego del enfriamiento los valores de la $\tan \delta$ fueron más altos, a los correspondientes a la etapa de calentamiento, alcanzando valores de $\cong 0,2$, excepto para 95 °C donde no hubo variación de la tangente en ambas etapas (figura 35). Esto sugiere la formación de geles menos estructurados después del tratamiento con frío, donde los puentes hidrógeno contribuyen muy poco a la elasticidad de la matriz. La formación de geles durante el tratamiento con frío depende de las interacciones puente hidrógeno y electrostáticas, ya que estos dos tipos de uniones están fortalecidas a bajas temperaturas (Catsimpoolas y col., 1970).

Los geles del aislado A9 de amaranto al 15 % p/v, tanto en la etapa de calentamiento como en la de enfriamiento presentaron valores de $\tan \delta$, a partir de 70 °C, inferiores a 0,5, lo cual estaría indicando que los geles presentan un comportamiento esencialmente elástico

(Cooney y col., 1993). Dicho comportamiento es más evidente en la etapa de calentamiento a casi todas las temperaturas ensayadas, excepto en el caso de la dispersión calentada a 60 °C, en donde el enfriamiento favorecería la formación de una matriz más viscoelástica, estabilizada básicamente por uniones puente hidrógeno (figura 35). A mayores temperaturas se modificaría el balance entre las uniones que estabilizan la matriz.

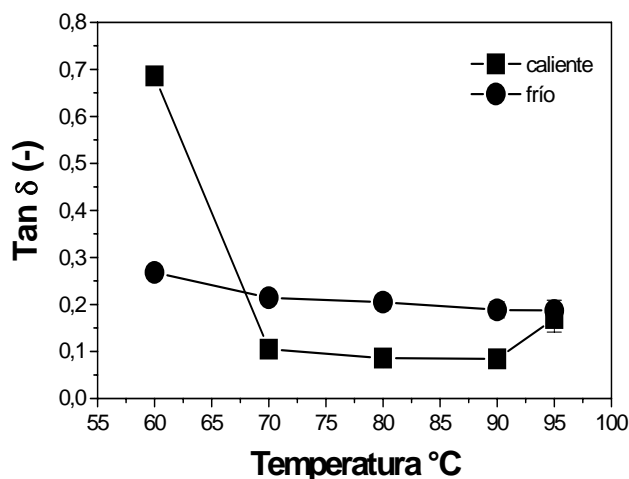


Figura 35. Variación de la tangente del ángulo de deformación ($\text{Tan } \delta$) en función de la temperatura de gelificación, medida a una frecuencia de 1 Hz, en la etapa de calentamiento y enfriamiento de geles del aislado A9 al 15 % p/v.

En la figura 36 a, se puede observar que la viscosidad dinámica disminuyó en forma lineal con el aumento de la frecuencia en las dispersiones del aislado A9 15 % p/v calentadas a 70, 80, 90 y 95 °C, lo cual estaría indicando un comportamiento tipo gel. En cambio, las dispersiones tratadas a bajas temperaturas (<60°C) presentaron un comportamiento de solución entrelazada. Después de tratar ambas dispersiones a 25 °C durante 10 minutos, los valores de viscosidad dinámica fueron más altos a todas las temperaturas ensayadas. En el caso de las dispersiones a 60 °C la viscosidad disminuyó en forma lineal con la frecuencia comportándose como gel débil (figura 36 b). La disminución de la temperatura (25 °C), favoreció la formación de uniones puente de hidrógeno aumentando la rigidez de la matriz, en concordancia con lo observado en el comportamiento de la tangente δ con la temperatura (figura 35).

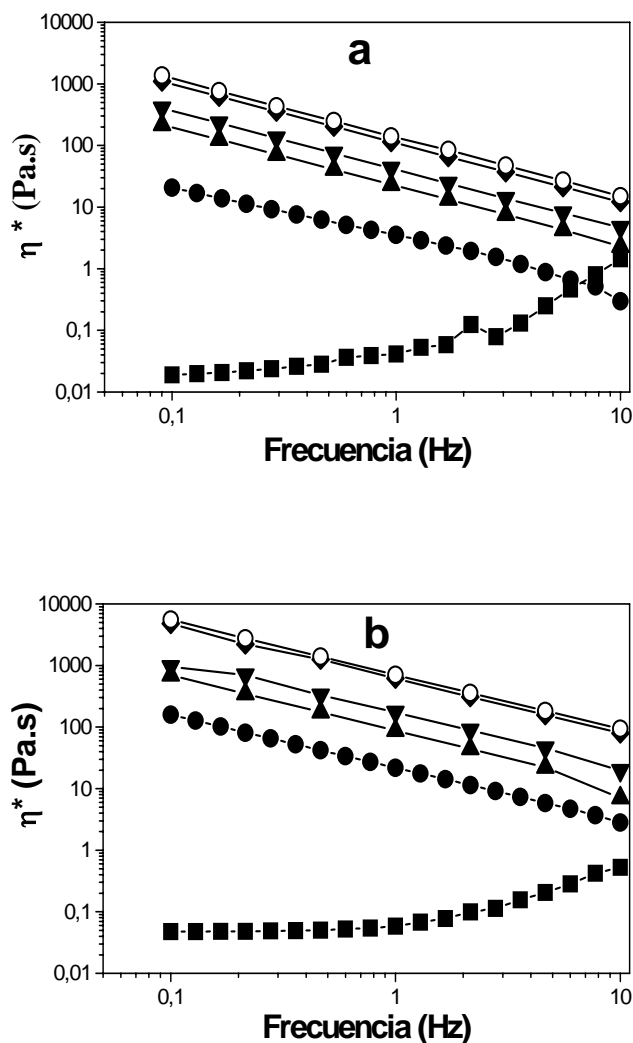


Figura 36. Variación de la viscosidad dinámica (η^*) en función de la frecuencia a las distintas temperaturas de gelificación (■) 50 °C, (●) 60 °C, (▲) 70 °C, (▼) 80 °C, (◆) 90 °C, (○) 95 °C, de dispersiones del aislado A9 al 15 % p/v (a) en caliente y (b) en frío.

3.1.2 Efecto de la concentración de aislado.

Como se mencionara anteriormente la concentración de proteínas es uno de los factores críticos que determinan las características de los geles. La figura 37 muestra la influencia de la concentración del aislado A9 en las propiedades viscoelásticas de los geles, durante la etapa de calentamiento y enfriamiento. La naturaleza del gel formado bajo diferentes condiciones de tratamiento térmico se puede determinar, en forma empírica, analizando el barrido de frecuencia.

La dispersión del aislado A9 al 5 % p/v calentada a 90 °C durante 20 minutos, presentó un aumento gradual de G' con la frecuencia de deformación durante el calentamiento (datos no mostrados), indicando un comportamiento de solución semidiluida altamente entrelazada (Ross-Murphy, 1995b). A una concentración del 7 % p/v, G' presentó un valor mayor ($f < 1$ Hz), similar a los de la dispersión al 5 % p/v a $f > 1$ Hz (figura 37 a). Clark y Ross-Murphy (1987), clasificaron a este tipo de muestras como sistemas de red estructurada (pseudo-geles) con un espectro dinámico en el que G' y G'' aumentan con el incremento de la frecuencia.

A concentraciones de 10 y 15 % p/v, el módulo elástico (G') fue mayor que el viscoso (G'') permaneciendo constantes en todo el rango de frecuencias, con valores de aproximadamente 150 y 700 Pa, respectivamente, (figura 37 a). Estas dispersiones exhiben un comportamiento "tipo gel fuerte" (Ross-Murphy, 1995b), cuya estabilidad estaría relacionada con la formación de puentes disulfuro debido a un mayor acercamiento de las moléculas proteicas.

El enfriamiento provocó un aumento de la componente elástica (G'), de las dispersiones a todas las concentraciones estudiadas (figura 37 b). El reograma de la dispersión al 5 % p/v (datos no mostrados) presentó valores muy bajos de G' que se incrementaron con la frecuencia, respondiendo a un comportamiento de solución macromolecular entrelazada. Las dispersiones al 7 % p/v también presentaron valores bajos de G' , aunque superiores a los correspondientes G'' en todo el rango de frecuencia, respondiendo a un comportamiento tipo gel débil (figura 37 b). Los geles más concentrados presentaron un aumento considerable de los módulos elástico y viscoso (G' y G'') con respecto de las dispersiones calentadas, mostrando reogramas característicos de geles fuertes (figura 37 b).

Es decir que las dispersiones al 10 y 15 % p/v durante el calentamiento como después de la etapa de enfriamiento, exhiben un comportamiento "tipo gel" (Ross-Murphy, 1995b), cuya estabilidad estaría relacionada con la formación de puentes disulfuro por acercamiento de moléculas proteicas (Giboreau y col., 1994). Este comportamiento tipo gel indica que en la matriz formada se produjeron reordenamientos intra e intermoleculares permanentes, de uniones efectivamente elásticas entre moléculas de proteínas (Chronakis, 1996).

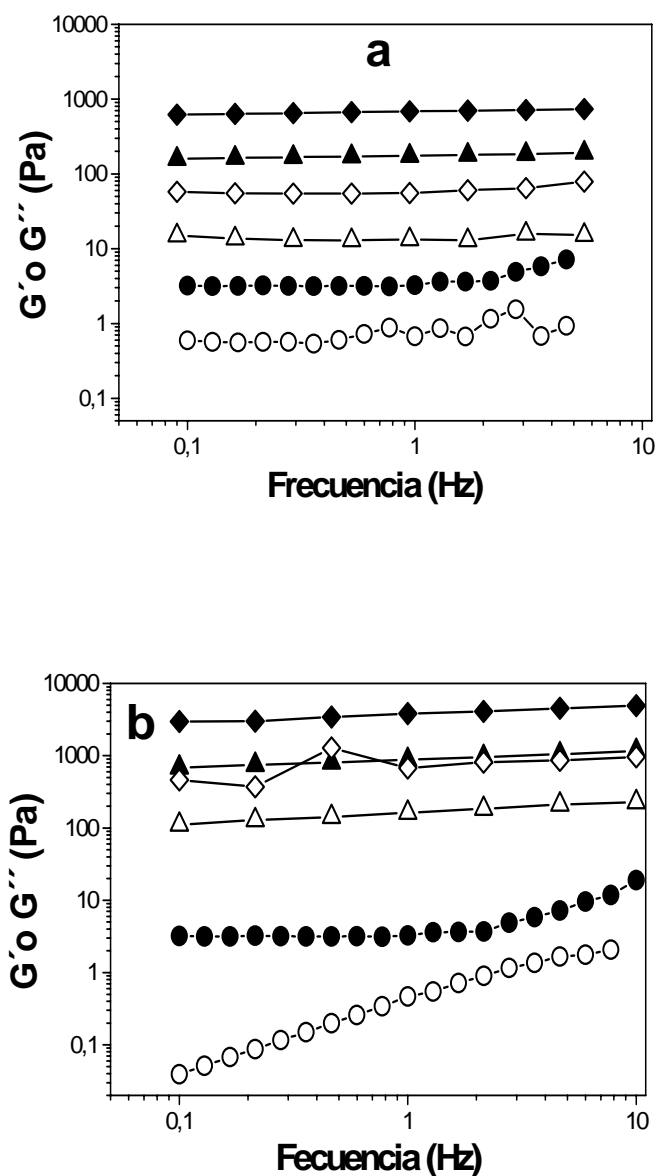


Figura 37. Barrido de frecuencia del módulo elástico G' (●▲◆) y viscoso G'' , (○△◇) a distintas concentraciones: 7 % (●○), 10 % (▲△), 15 % (◆◇) del aislado A9, tratadas a 90 °C durante 20 minutos (a) en caliente, (b) en frío.

La disminución de la tangente del ángulo de desfasaje con el aumento de la concentración proteica (figura 38), nos está indicando que la elasticidad aumenta durante el calentamiento con el número de moléculas presentes, observándose valores de $\tan \delta < 0,1$ para dispersiones del aislado A9 al 10 y 15 % p/v (figura 38). Esto podría ser consecuencia

de la formación de un gran número de puntos de contacto entre las moléculas de proteínas y/o a la formación de una estructura más compacta al aumentar la concentración proteica (Cooney y col., 1993).

La elasticidad de los geles al 5 % p/v aumentó con el enfriamiento, mientras que los geles más concentrados (7, 10 y 15 % p/v) presentaron valores de $\tan \delta$ mayores que los observados durante la etapa de calentamiento. La reducción de la temperatura no favoreció un incremento de la elasticidad de la matriz en los geles de mayor concentración de aislado. Un comportamiento similar se observó cuando se analizó la variable temperatura, durante la etapa de calentamiento y enfriamiento, en el proceso de gelificación (figura 35).

Por lo tanto a bajas concentraciones (5 % p/v) y temperaturas ($<60^{\circ}\text{C}$) prevalecen las uniones puente hidrógeno frente a las uniones disulfuro, lo cual favorece la elasticidad de la matriz en éstas condiciones. Es decir, que el balance de las interacciones que estabilizan la matriz proteica varía con la temperatura y concentración.

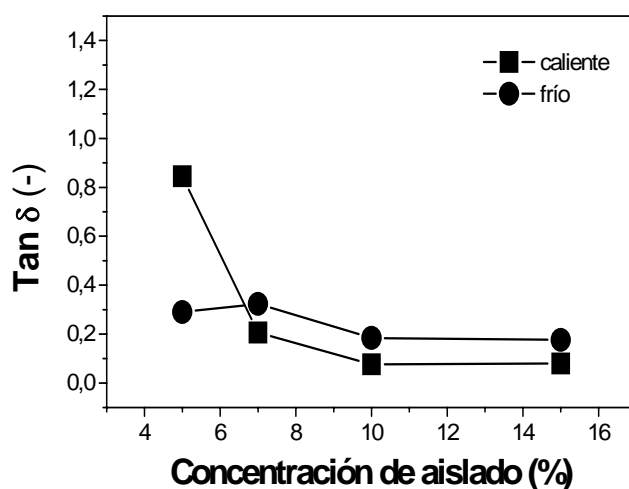


Figura 38. Variación de la tangente del ángulo de deformación ($\tan \delta$) en función de la concentración de proteínas del aislado A9, medida a una frecuencia de 1 Hz, durante la etapa de calentamiento y enfriamiento.

Tanto los pseudogeles como los geles verdaderos presentan una disminución lineal de la viscosidad dinámica con el aumento de la frecuencia (Ross-Murphy, 1995b). En el sistema por nosotros analizado dicha tendencia fue observada principalmente para altas concentraciones de proteínas (10 y 15 % p/v), tanto en la etapa de calentamiento como en la de enfriamiento (figura 39 a y b). Resultados similares fueron observados en

dispersiones proteicas de soja al 14 y 20 % p/p (Chronakis, 1996). En tanto que las dispersiones proteicas al 5 y 7 % p/v en caliente (figura 39 a), se comportaron como soluciones entrelazadas y geles débiles respectivamente (Ross-Murphy, 1995b). La viscosidad de dichas dispersiones no se vio favorecida por el enfriamiento presentando un comportamiento similar a lo observado en las dispersiones calentadas. (figura 39 b).

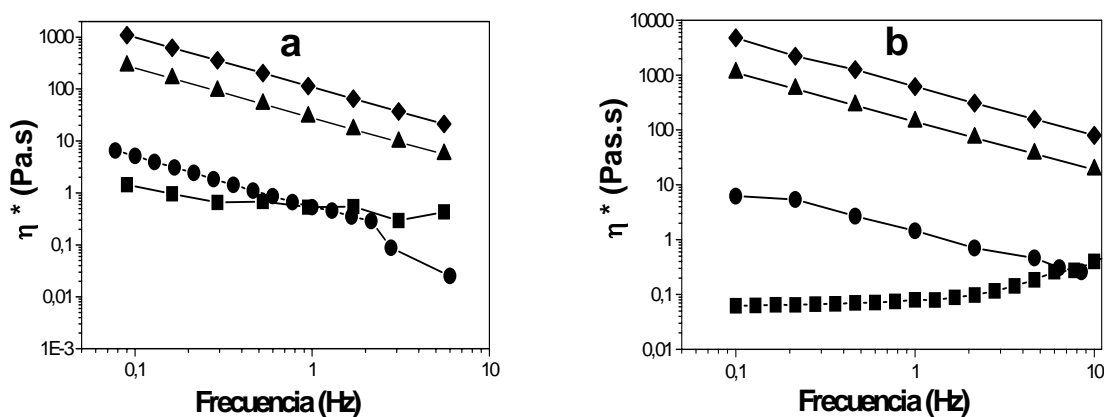


Figura 39. Variación de la viscosidad dinámica (η^*) en función de la frecuencia, de dispersiones proteicas del aislado A9 a distintas concentraciones: 5 % (■), 7 % (●); 10 % (▲); 15 % (◆), tratadas a 90 °C durante 20 minutos (a) en caliente y (b) en frío.

4. Propiedades de color de geles.

La importancia del color en el ámbito de la Tecnología de los Alimentos radica en su condición de factor de calidad. Es una característica del alimento que influye en la aceptación del mismo por el consumidor y le permite a este hacer diferencias entre distintos productos que se presenten a su consideración. El color frente a la textura o al sabor del alimento, tiene una peculiaridad importante, su apreciación siempre se realiza en primer lugar. Es de importancia tecnológica la relación que existe entre el color y otros factores de calidad o entre aquél y la composición química o el grado de desarrollo o alteración, es por ello que el color puede usarse como índice de transformaciones naturales de los alimentos frescos o de cambios ocurridos en el proceso industrial (Calvo y Duran, 2002).

Las propiedades de color de los geles del aislado A9 de amaranto preparados en distintas condiciones de concentración proteica, tiempo y temperatura de calentamiento; se

detallan en la tabla 8. Visualmente, todos los geles presentaron tonalidades cercanas a un color beige que puede estar relacionado al alto contenido de la fracción globulina en dicho aislado. Los aislados de globulina de amaranto son de color beige y significativamente más oscuros (bajos valores de L^*) que los aislados de globulina de soja. Esto puede deberse a la presencia de taninos en las semilla de amaranto, el cual pudo haber coprecipitado con las globulinas durante la extracción y precipitación de los aislados (Marcone y Kakuda, 1999).

Mediante la medida colorimétrica se encontró que el color predominante, relacionado con el parámetro H^* , fue cercano al amarillo en todos los casos. Se observó que H^* decrece significativamente ($p < 0,05$) a concentraciones de aislado mayor al 10 % p/v mientras que la intensidad de color (C^*) aumentó y la luminosidad (L^*) disminuyó con el aumento de la concentración proteica ($p < 0,05$). Estas variaciones en las propiedades de color podrían atribuirse al incremento de las interacciones proteína-proteína.

Las propiedades del color mostraron un comportamiento diferente con la variación de la temperatura de tratamiento térmico. El aumento de temperatura a partir de 80 °C produjo una disminución del color (H^*), sin variaciones en la intensidad del color (C^*), pero con un aumento marcado de la luminosidad (L^*), ($p < 0,05$). Con el incremento de la temperatura de tratamiento una proporción importante de proteínas se desnaturalizan, debido a esto se incrementa el número de grupos hidrofóbicos y/o hidrofílicos expuestos, lo cual favorece las interacciones entre proteínas.

El aumento del tiempo de calentamiento, no produjo prácticamente cambios en el color (H^*), pero si una disminución significativa en la luminosidad (L^*) e intensidad del color (C^*), ($p < 0,05$), debido probablemente a la formación de una microestructura de agregados resistente a la penetración de la luz, producto de un tratamiento prolongado a altas temperaturas.

El comportamiento diferente de los parámetros C^* y L^* con la temperatura y la concentración de proteínas, indican que las interacciones proteína-proteína favorecidas por diferentes calentamientos, son diferentes de aquellas favorecidas por el alto contenido proteico.

Las propiedades de color de los geles son de gran importancia, debido a la adición de este tipo de productos a diferentes formulaciones de alimentos. La utilización de diferentes aislados proteicos en productos tipo gel podrían verse limitados por propiedades de color inadecuadas.

Tabla 8. Efecto de la concentración del aislado A9 de amaranto (95 °C-20 minutos), temperatura de calentamiento (15 % p/v-20 minutos), y tiempo de calentamiento (95°C-15 % p/v), en las propiedades de color de los geles proteicos de amaranto.

| Parámetros de color | Concentración de aislados (p/v %) | | |
|---------------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | 10 | 15 | 20 |
| H* | 89° 7' ± 1,34 ^a | 87° 1' ± 0,42 ^b | 85° 53' ± 1,06 ^b |
| L* | 74,66 ± 0,81 ^a | 73,59 ± 0,26 ^b | 71,67 ± 0,93 ^c |
| C* | 7,86 ± 0,42 ^a | 8,50 ± 0,16 ^b | 10,27 ± 0,53 ^c |
| | Temperatura de calentamiento (°C) | | |
| | 70 | 80 | 95 |
| H* | 94 ° 53' ± 1,64 ^a | 82 ° 20' ± 0,48 ^b | 87° 1' ± 0,42 ^c |
| L* | 58,02 ± 0,61 ^a | 64,82 ± 0,52 ^b | 73,59 ± 0,26 ^c |
| C* | 8,02 ± 0,27 ^a | 10,82 ± 0,90 ^b | 8,50 ± 0,16 ^a |
| | Tiempo de calentamiento (minutos) | | |
| | 10 | 20 | 30 |
| H* | 87 ° 32' ± 0,31 ^a | 87° 1' ± 0,42 ^a | 86 ° 10' ± 0,77 ^a |
| L* | 74,14 ± 0,24 ^a | 73,59 ± 0,26 ^b | 72,66 ± 0,32 ^c |
| C* | 9,44 ± 0,10 ^a | 8,50 ± 0,16 ^b | 7,72 ± 0,10 ^c |

Diferentes letras en la misma línea indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

5. Aspectos estructurales de los geles.

5.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM).

Para comprender el comportamiento de un alimento es necesario conocer el ordenamiento de sus elementos estructurales (aire, gotas de agua, gránulos, cristales, hebras, micelas e interfases) y sus interacciones; así como el tipo de fuerzas de interacción que determinan la consistencia y la estabilidad física de los productos alimenticios (Heertje, 1993).

Los geles proteicos están constituidos por una matriz de cadenas de proteínas donde se encuentra ocluida la fase acuosa (Stading y col., 1993). Debido a la variedad de interacciones proteicas asociadas a la formación de la matriz, los cambios en la estructura secundaria de las proteínas no son indicativos del tipo de estructura de la matriz, ni de las propiedades reológicas de un gel. El tipo de gel formado depende de la distribución del tamaño de partícula y del mecanismo de agregación que haya tenido lugar durante la gelificación (Foegeding y col., 1995).

Los geles de proteínas globulares se han dividido en tres categorías: finos cuyo diámetro de poro es del orden de los nm (nanómetros), particulados o agregados donde el

tamaño de poro es del orden de los μm (micrómetros), y mixtos con una estructura intermedia entre los dos primeros. (Stading y col., 1993; Foegeding y col., 1995).

La microscopia electrónica de barrido (SEM), es una herramienta complementaria para el análisis de la estructura de los geles proteicos (Heertje, 1993). Mediante esta técnica se puede conocer la forma y grosor de los filamentos proteicos, el tamaño de poro de la matriz y distinguir los agregados y espacios vacíos (Pilosof, 2000).

En las microfotografías electrónicas de los geles del aislado A9 de amaranto, se pueden observar claramente las diferencias en la estructura de la matriz proteica, en función de la concentración de aislado, temperatura y tiempo de tratamiento (figuras 40, 41 y 42). En el caso del tratamiento térmico a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos, el aumento de la concentración proteica (10, 15 y 20 % p/v), produjo una disminución del tamaño de poro. Esto sugiere la formación de una matriz más compacta como consecuencia de una mayor interacción proteína-proteína. A concentraciones del 10 % p/v se observó una estructura inhomogénea y abierta, mientras que al 15 y 20 % p/v la matriz proteica se presentó más homogénea y particulada (figura 40, 1, 2, 3). En cambio los geles preparados a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos de calentamiento, a las concentraciones antes mencionadas, mostraron una matriz más agregada y abierta que la correspondiente a los geles obtenidos a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ (figura 40, 4, 5, 6). Este hecho fue más evidente al 20 % p/v de concentración proteica, en donde también se pudo observar burbujas de aire (figura 40, 6 ba), formadas como consecuencia de una matriz muy concentrada que al agitar la dispersión le entró aire. Es la condición más extrema de concentración, temperatura y tiempo, y aunque el gel perezca homogéneo se ven burbujas de aire dentro de la matriz.

La mayor agregación proteica observada en los geles preparados a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, no solo se ve favorecida por el aumento en la concentración sino también por la temperatura a la cual se lleva a cabo el calentamiento, la cual corresponde a la temperatura de desnaturalización de las principales fracciones proteicas (globulina 11S y globulina-P), del aislado A9.

El incremento en la concentración de proteínas implica un incremento en las interacciones proteína-proteína, debido al alto número de moléculas en la muestra. Mientras que el número total de polipéptidos se conserva, el número de moléculas disponibles se incrementa cuando se supera la T_d ; porque aumenta el desplegamiento de las moléculas y como consecuencia, la posibilidad de interacciones. En ambos casos, el incremento de los puntos de unión entre moléculas produce una matriz más estructurada, lo cual se manifiesta en una disminución del color (H^*), la luminosidad (L^*) y un aumento de la intensidad del color (C^*) (tabla 8).

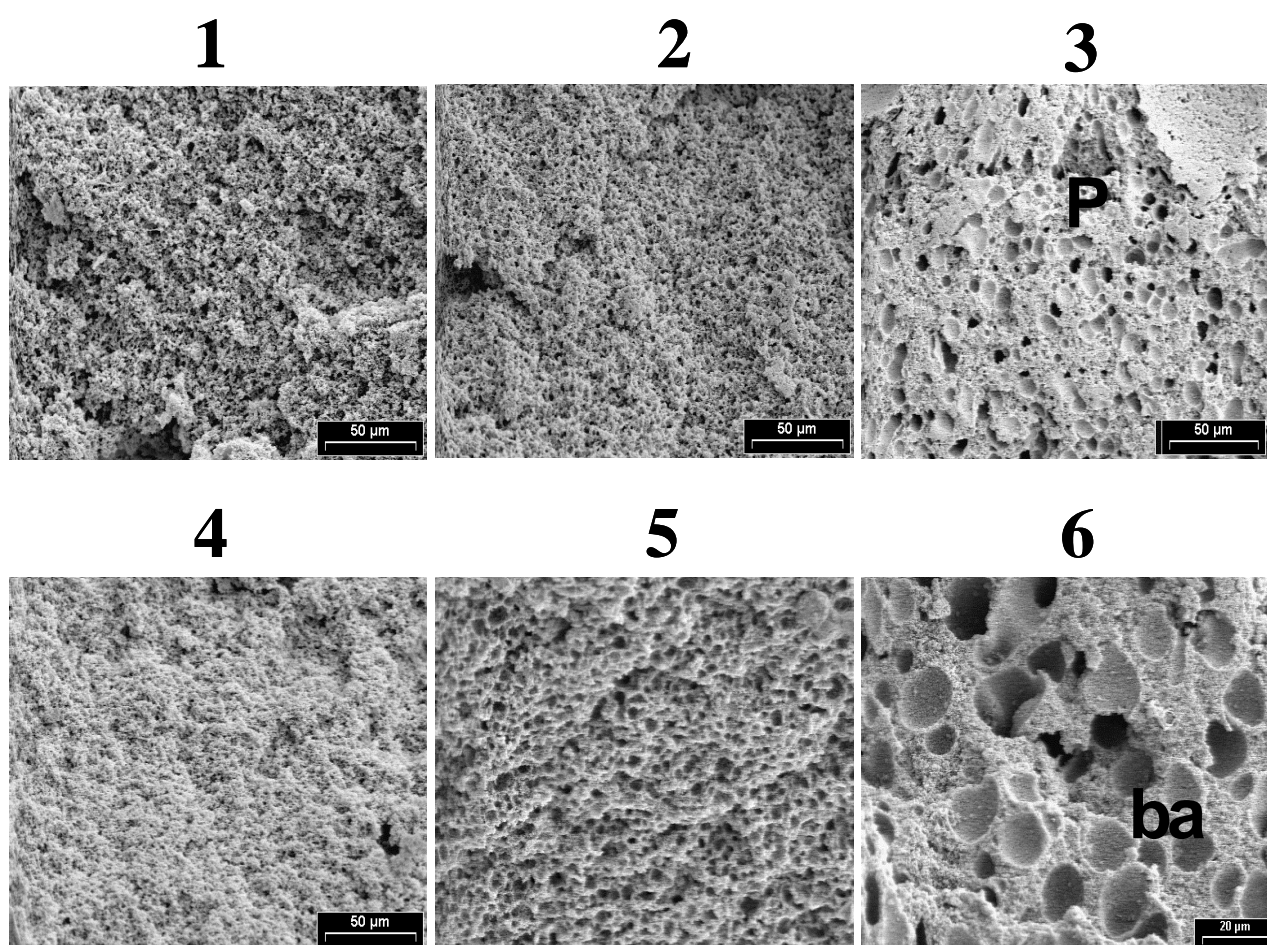


Figura 40. Microscopia electrónica de barrido (SEM), de geles proteicos del aislado A9 de amaranto preparados a distinta concentración proteica y a dos temperaturas (90 y 95 °C). (1) 10 % p/v 90 °C 20 minutos, (50 µm), 540x; (2) 15 % p/v 90 °C 20 minutos, (50 µm), 540x; (3) 20 % p/v 90 °C 20 minutos, (50 µm), 540x; (4) 10 % p/v 95 °C 20 minutos, (50 µm), 540x; (5) 15 % p/v 95 °C 20 minutos, (50 µm), 540x; (6) 20 % p/v 95 °C 20 minutos, (20 µm), 540x. P: matriz proteica; ba: burbuja de aire.

En geles del aislado A9 preparados a distintas temperaturas manteniendo constante la concentración proteica (15 % p/v) y el tiempo de tratamiento (20 minutos), se observó que a 70 °C se forma una matriz desordenada, la cual aumenta su grado de estructuración con el incremento de la temperatura de gelificación (80 y 95 °C) (figura 41 1,2,3). El gel preparado a 70 °C presentó una estructura más fina y blanda (figura 41, 1). El tratamiento a temperaturas cercanas o superiores a la temperatura de desnaturalización (69.9 y 98.8 °C), de aislados de proteína de amaranto, produce el desplegamiento de las moléculas de proteínas, y la interacción entre cadenas conduce a la formación de un gel con una matriz más estructurada.

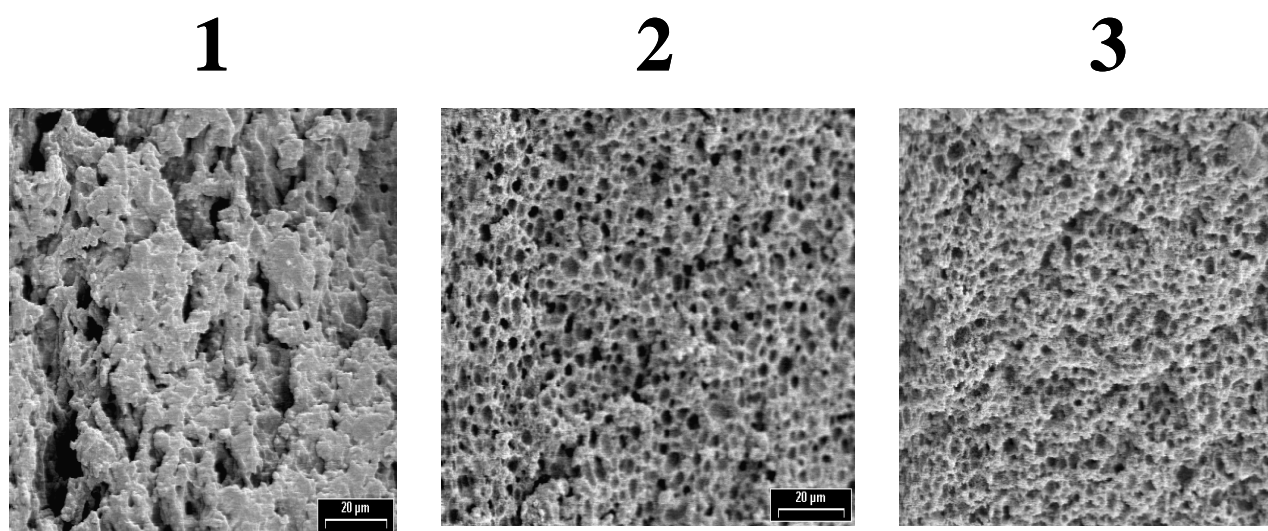


Figura 41. Microscopía electrónica de barrido (SEM), de geles proteicos del aislado A9 de amaranto al 15 % p/v, tratados durante 20 minutos a distintas temperaturas (1) 15 % p/v 70 °C 20 minutos, (20 μm), 540x; (2) 15 % p/v 80 °C 20 minutos (20 μm), 540x; (3) 15 % p/v 95 °C 20 minutos, (20 μm), 540x.

Con respecto a los geles del aislado A9 (15 % p/v), preparados a 95 °C a diferentes tiempos de calentamiento, se observó a cortos tiempos de tratamiento (10 minutos), una distribución inhomogénea de las cadenas proteicas. A los 20 minutos de calentamiento la matriz es más homogénea y cerrada, pasando a formar una estructura más desordenada y abierta luego de 30 minutos de tratamiento (figura 42 1, 2, 3). Esto último podría atribuirse a la formación de agregados, a elevadas temperaturas y tiempos de tratamiento térmico

prolongados o a una mayor velocidad de la reacción de agregación respecto a la de desnaturalización proteica.

Es decir que se requieren tratamientos mayores a 10 minutos para obtener una matriz proteica ordenada con poros pequeños (figura 42 1, 2, 3). Una tendencia similar fue observada cuando se incrementó la temperatura de tratamiento térmico mientras la concentración de aislado (15 % p/v) y el tiempo (20 minutos) permanecían constantes (figura 41).

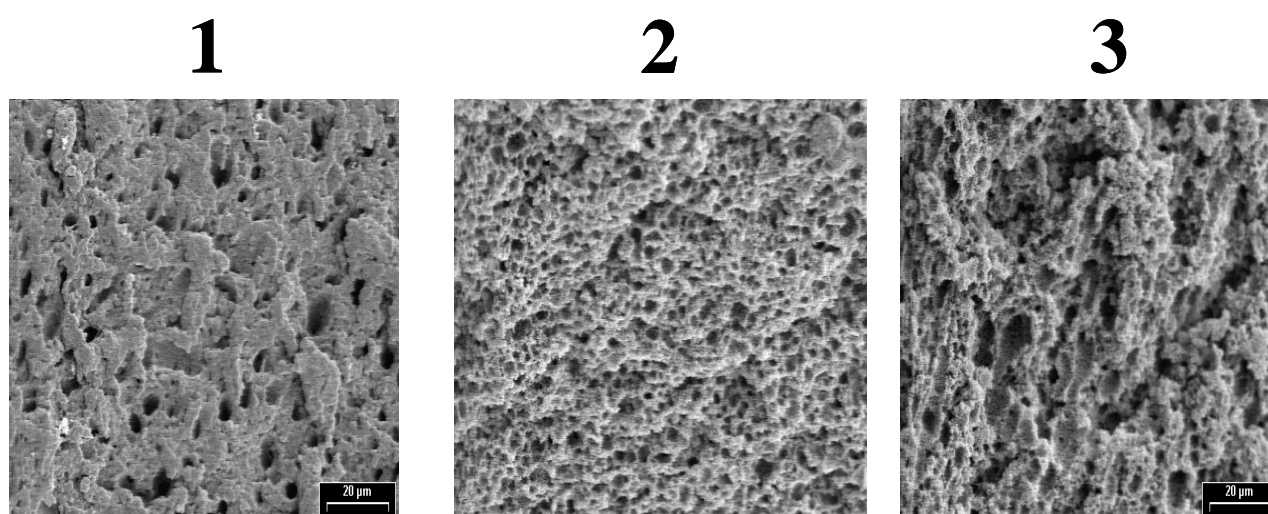


Figura 42. Microscopía electrónica de barrido (SEM), de geles proteicos del aislado A9 de amaranto al 15 % p/v preparados a 95 °C con distintos tiempos de calentamiento; (1) 15 % p/v 95 °C 10 minutos, (20 µm), 540x; (2) 15 % p/v 95 °C 20 minutos, (20 µm), 540x; (3) 15 % p/v 95 °C 30 minutos, (20 µm), 540x.

A concentraciones (15 % p/v) y temperaturas (95 °C), por encima de las condiciones críticas de gelificación, al incrementar el tiempo de calentamiento se produce una gran exposición y agregación de las moléculas proteicas, favoreciendo de este modo la formación de una matriz más estructurada, sin cambios de color (H^*), pero de baja luminosidad (L^*) e intensidad de color (C^*), (tabla 8).

5.2 Solubilidad de proteínas de geles.

Como se mencionara anteriormente la formación de redes proteicas es consecuencia de un balance entre las interacciones proteína-proteína y proteína-agua, y entre las fuerzas atractivas y repulsivas de las cadenas polipeptídicas adyacentes. La contribución de cada tipo de unión depende de la naturaleza de la proteína y de la etapa del proceso de gelificación.

Para predecir la naturaleza de las interacciones involucradas en la estabilización de la matriz de los geles del aislado A9 de amaranto, analizamos la solubilidad de los mismos mediante el uso de agentes desnaturizantes como urea y SDS.

La solubilidad de los geles obtenidos, en los distintos medios de extracción, agua (W), buffer fosfato (P), buffer fosfato + SDS (PS), buffer fosfato + urea (PU), buffer fosfato + SDS + urea (PSU), se muestra en la figura 43. La solubilidad de la matriz disminuyó con el incremento de la concentración proteica en todos los extractos. La solubilidad a distintas concentraciones de aislado, fue menor al 30 % en todos los medios caotrópicos excepto en presencia de agentes reductores, indicando que la matriz estaría estabilizada principalmente por uniones covalentes de tipo puente disulfuro (figura 43 a). En todos los casos los geles se disolvieron completamente en los ensayos de solubilidad en presencia de 2-ME. Esto se debe a que las principales proteínas de reserva, globulina-P y globulina 11S, poseen un alto contenido de SH/SS.

Los geles al 10 % p/v, presentaron baja solubilidad en agua (W), la cual aumentó con el agregado de agentes caotrópicos (urea y SDS) (PS, PU, PSU) ($p < 0,05$). Por el contrario en los geles al 20 % p/v, sólo se observó un ligero incremento de la solubilidad con el agregado de urea en ausencia y presencia de SDS ($p < 0,05$), (figura 43 a). Esta disminución de la solubilidad con el aumento de la concentración proteica estaría indicando una mayor resistencia a la ruptura de las fuerzas intermoleculares como consecuencia de una mayor interacción proteína-proteína favorecida por la proximidad entre cadenas y/o la formación de uniones disulfuro. Este fenómeno fue observado en trabajos anteriores con geles de aislados de soja (Puppo y col., 1995).

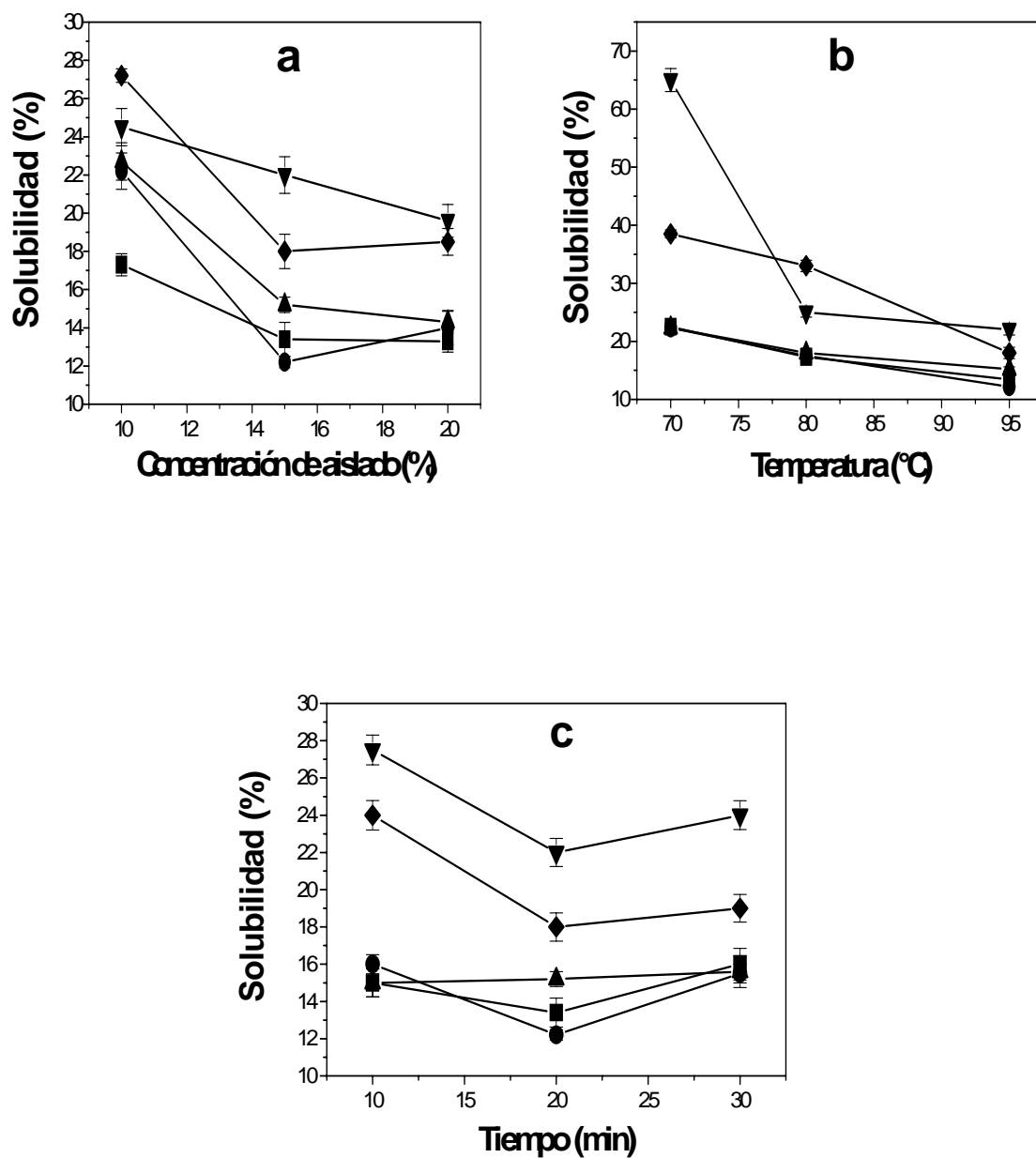


Figura 43. Efecto de la concentración del aislado (a), temperatura (b) y tiempo de tratamiento térmico (c) en la solubilidad (%) de geles del aislado A9 de amaranto en distintos medios de extracción: Agua (W■); buffer fosfato (P●); buffer fosfato + SDS (PS▲); buffer fosfato + urea (PU▼); buffer fosfato + SDS + urea (PSU◆).

La figura 43 b, muestra la variación de la solubilidad de los geles en función de la temperatura de gelificación. En W, P y en PS, la solubilidad prácticamente no varió con la temperatura de tratamiento, permaneciendo en valores inferiores al 20 %. Este hecho indicaría que las fuerzas que mantienen principalmente unidas a las moléculas de proteínas en la matriz del gel no serían de naturaleza electrostática; y tampoco su estabilidad se favorecería con el aumento de temperatura. En presencia de urea y a 70 °C (PU70) se observó un gran aumento de la solubilidad (65 %), pero con el agregado de SDS (PSU) la misma disminuyó (38 %), (figura 43 b). Ambos agentes desnaturizantes (SDS y urea), afectan la conformación proteica, alterando las uniones no covalentes (Gorinstein y col., 1996a). La urea desestabiliza principalmente las interacciones hidrofóbicas dentro de la proteína y las uniones puente hidrógeno en las regiones polares; mientras que el SDS interacciona principalmente con las uniones hidrofóbicas, y debido a su carga negativa, podría interaccionar con grupos proteicos cargados positivamente. El comportamiento observado, indica que a 70 °C se formarían geles de estructura débil estabilizada principalmente por interacciones no-covalentes en particular interacciones hidrofóbicas y puente hidrógeno. A mayores temperaturas (80 y 95 °C), cercanas a las temperaturas de desnaturización de las proteínas presentes en el aislado utilizado (tabla 9), se formó una matriz estabilizada principalmente por uniones disulfuro, como se puede deducir de los valores muy bajos de solubilidad (< 25%) de estos geles en los medios que contenían urea y SDS ($p < 0,05$), (figura 43 b).

Tabla 9. Temperatura de desnaturización (Td) y grado de desnaturización (GD) del aislado proteico de amaranto A9, nativo y tratado térmicamente.

| Aislado Nativo A9 | | | | | | |
|---------------------------------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Td (°C) | 69,9 y 98,8 | | | | | |
| GD (%) | 0 | | | | | |
| Aislados tratados térmicamente | | | | | | |
| | 70 °C | | | 90 °C | | |
| | 10 min | 15 min | 30 min | 10 min | 15 min | 30 min |
| Td (°C) | 101,4 | 101,8 | 101,7 | 103,6 | 105,6 | 108,6 |
| GD (%) | 27,7 | 39,9 | 33,7 | 63,9 | 76,7 | 72,9 |

El efecto del tiempo de calentamiento se muestra en la figura 43 c. En W, P y PS no se observó variación de la solubilidad con el tiempo de tratamiento térmico, permaneciendo en valores entre 12 y 16 %. El agregado de urea (PU) y de urea + SDS (PSU) al buffer provocó un aumento de la solubilidad, especialmente a tiempos cortos de calentamiento (10 minutos).

La leve desestabilización producida por estos agentes desnaturizantes, indicaría que a tiempos cortos de tratamiento se forma una matriz estabilizada en un 30 % por uniones no-covalentes (puente hidrógeno e interacciones hidrofóbicas), mientras que a tiempos mayores de calentamiento (20 y 30 minutos), las uniones disulfuro cumplirían un rol más importante en la estabilización de estos geles.

Por lo tanto a tiempos cortos de calentamiento (10 minutos) y a bajas temperaturas de gelificación (70 °C), se forman geles estabilizados por interacciones no covalente del tipo interacción hidrofóbica y puente hidrógeno. En cambio en los geles preparados a altas concentraciones de aislado (15 % p/v), temperaturas (95 °C) y tiempo de calentamiento (30 minutos), las uniones entre las moléculas de proteínas que estabilizan la estructura del gel son predominantemente puentes disulfuro. La influencia que ejercen este tipo de uniones en la estabilización de los geles de proteínas de amaranto, sería como se indicó previamente debido a la importante cantidad de grupos sulfhidrilos libres y puentes disulfuro que poseen las globulinas 11S y globulina-P (Castellani, 2000).

Estos cambios en la estabilización de la matriz se ven claramente reflejados, tal como se discutió anteriormente, en el comportamiento reológico de los geles y en su color.

5.3 Análisis de las proteínas presentes en las fracciones solubles por Electroforesis.

Los extractos de los diferentes medios (W, P, PS, PU y PSU) de geles preparados a distintas temperaturas (15 % p/v, 20 minutos), presentaron perfiles electroforéticos similares (PAGE-SDS), donde se observó agregados de alta masa molecular que no entran al gel separador, agregados solubles de 143 y 121 kD, polipéptidos de 65, 56, 52, 42, 35, 28, 20 kD, y péptidos de bajo peso molecular (<20 kD), (datos no mostrados). Para analizar los agregados solubles y la naturaleza de las interacciones presentes en dichos geles se hicieron electroforesis bidimensionales bajo condiciones desnaturizantes y disociantes (PAGE-SDS→SDS+2-ME) (figura 44).

El extracto en agua de los geles obtenidos a 70 °C (W70), presenta un perfil electroforético caracterizado por la presencia de agregados solubles de alta masa molecular

(143 y 121 kD), formados por polipéptidos de 56, 32 y 22 kD, dímeros de 32 y 22 kD (polipéptidos 11S A y B respectivamente), una alta proporción del polipéptido 56 kD (flecha roja), (globulina-P), y péptidos de 42 (flecha verde), 20 y 14,4 kD (figura 44). Este perfil concuerda con el obtenido por Martínez y Añón (1996), para aislados proteicos de amaranto extraídos en agua a pH 9. Los agregados solubles de alta masa molecular no se observaron en la fracción soluble en agua de geles obtenidos a 95 °C (W 95). La temperatura de desnaturalización de las proteínas de amaranto presentes en el aislado A9 ha sido superada a 95 °C, lo cual conduce a la formación de una matriz estructurada, y estabilizada principalmente por agregados de alta masa molecular no solubles en agua. En el espacio intersticial de la matriz del gel se encuentran especies monoméricas de 56 (flecha roja) y 42 kD (flecha verde), y de bajo peso molecular (<20 kD) (figura 44). Estos polipéptidos estabilizan la estructura del gel por interacciones no covalentes. A 80 °C en el extracto acuoso (W 80), se observa una situación intermedia; una baja proporción de agregados de alta masa molecular, más los polipéptidos extraídos en agua a 95 °C (W 95) (figura 44). Las intensidades de las bandas concordaron con los datos de solubilidad mostrados en la figura 43 b.

Los extractos solubles en buffer fosfato (P), de los geles a todas las temperaturas, presentaron un patrón electroforético similar al obtenido para el correspondiente extracto acuoso (figura 44). Al adicionar SDS al buffer fosfato (PS), no hubo alteración de la matriz de los geles a las temperaturas empleadas, lo cual se deduce de la presencia de las mismas especies proteicas en los perfiles electroforéticos de los extractos PS y P (figura 44).

El extracto soluble en buffer fosfato con urea (PU), de geles obtenidos a 70 °C (PU70), presentó mayor proporción de polipéptidos de 56 kD (flecha roja) y principalmente polipéptidos de 42 (flecha verde) y 33 kD (flecha negra) (A-11S), respecto al extracto buffer fosfato con y sin SDS (PS70 y P70), (figura 44). Esto concuerda con alta solubilidad observada en este buffer (PU) de los geles obtenidos a 70 °C, (figura 43 b). A 80 °C la urea permite extraer una alta proporción de polipéptidos de 33 kD (A-11S), en comparación con W80, P80 y PS80. No se observan diferencias entre los perfiles electroforéticos de P95 y PU95.

La urea y el SDS juntos no fueron capaces de alterar las fuerzas que mantiene la estructura del gel formado a temperaturas superiores a la de desnaturalización. La adición de urea y SDS al buffer fosfato (PSU), resultó en la extracción de una alta proporción de agregados solubles de alta masa molecular (>100 kD), para las matrices de geles obtenidos a 70 y 80 °C; indicando la presencia de uniones puente hidrógeno e interacciones hidrofóbicas que son alteradas por agentes caotrópicos. Este fenómeno no se observó a 95 °C, (figura 44).

Los resultados obtenidos a 80 °C confirman que la matriz del gel está desplegada y formada por agregados que contiene P-56 (56 kD) y globulina 11S (A-11S, 33 kD y B-11S, 20 kD). Estas subunidades estarían estabilizadas por uniones no covalentes (hidrofóbicas y puente hidrógeno), y uniones disulfuro.

El hecho que no aumente la cantidad de proteína extraída por agentes caotrópicos a 95 °C, podría indicar que un incremento en la temperatura de calentamiento, favorecería la formación de un gran número de uniones disulfuro. Estas uniones disulfuro podrían impedir la total modificación de la matriz del gel. De lo contrario, la extracción parcial de los polipéptidos P-56 y 42 kD demuestran que al menos parte de estas especies estarían débilmente ligadas a la matriz del gel u ocupando el espacio intersticial.

De lo expuesto anteriormente se deduce que la estructura de los geles obtenidos a partir del aislado A9 de amaranto (15 % p/v - 95 °C), estaría estabilizada por uniones disulfuro; en cambio en los geles preparados a 70 y 80 °C las uniones no covalentes (puente hidrógeno e interacciones hidrofóbicas), serían las responsables de mantener la estructura de la matriz. Estos resultados corroboran lo observado en las medidas de solubilidad (figura 43 b). Esta variación en el tipo de uniones que estabilizan la matriz sería una consecuencia de la funcionalidad de las mismas con la temperatura (Montero y col., 2002).

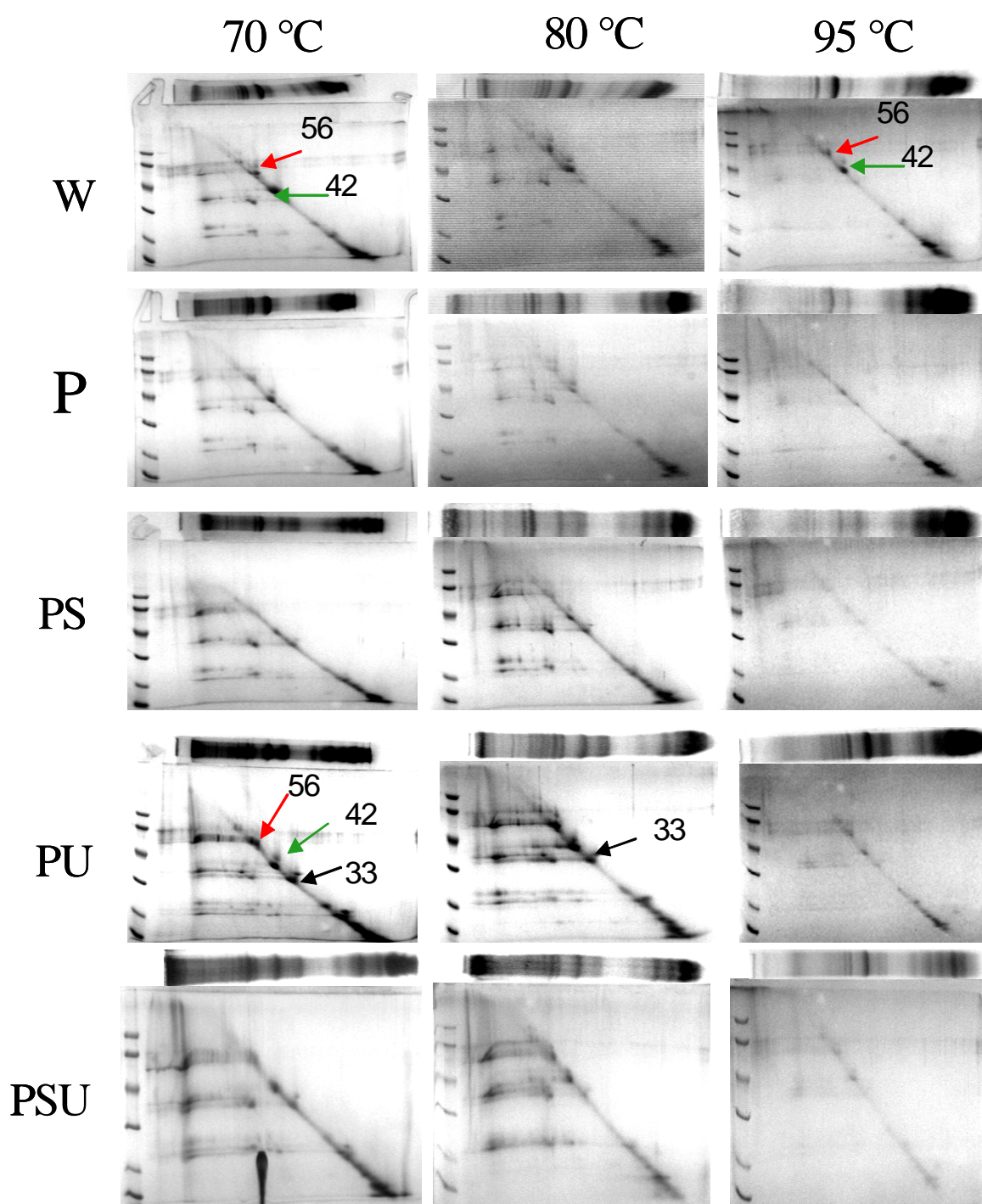


Figura 44. Electroforesis bidimensional (SDS-PAGE→SDS+2-ME) de la fracción soluble de geles del aislado A9 (15 % p/v) preparados a distintas temperaturas (70, 80 y 95 °C) y extraídos con diferentes solventes: agua destilada (W), buffer fosfato pH 7 (P), buffer fosfato + SDS (PS), buffer fosfato + urea (PU) y buffer fosfato + SDS + urea (PSU).

5.4 Capacidad de retención de agua (WHC).

La determinación de la capacidad de retención de agua (WHC) en alimentos a base de proteínas es muy importante para la industria alimenticia, dado que esta capacidad se encuentra relacionada con la aceptabilidad de un producto, (Barbut, 1995).

Las propiedades de hidratación de los geles, tal como WHC, están directamente relacionadas con el tipo de matriz formada. Los geles con una estructura ordenada presentan valores altos de WHC, mientras que los geles con una matriz más desordenada y abierta no son capaces de retener agua, y tienen bajos valores de WHC (Hermansson, 1994; Puppo y col., 1995, 1998b).

Algunos geles proteicos retienen hasta un 95 % de agua (gelatina); la cual está físicamente inmovilizada por la estructura proteica y no puede ser expulsada por presión. Los grupos CO y NH expuestos durante la desnaturalización se convierten en centros polarizados creando a lo largo de la cadena polipeptídica un sistema de multicapas de agua que al enfriarse interaccionarían formando nuevos puentes de hidrógeno, generando de esta manera la estructura necesaria para la inmovilización del agua libre. Otra hipótesis sería que los poros de la red proteica retengan agua por fenómenos de capilaridad (Cheftel y col., 1993).

Los métodos usados para medir WHC se basan en la aplicación de una fuerza externa (presión o centrifugación), y medición de la cantidad de agua liberada por el gel o en la succión capilar en la cual el agua es absorbida por un material poroso (Juaregui y col., 1981). Uno de los métodos más recomendados para la determinación del WHC es el Net test (Wierbicki y col., 1956; Hermansson y Lucisano, 1982; Kocher y col., 1993; Barbut, 1995). La principal ventaja de este método es que permite remover toda el agua sin dañar la estructura del gel. Además es un método simple y con buena reproducibilidad. La pérdida de agua se calcula como: $(\text{peso de líquido perdido}/\text{peso del gel}) \times 100$, o bien se determina el agua inicial que contiene el gel y se calcula el agua retenida como: $(\text{peso de líquido perdido}/\text{peso de agua inicial}) \times 100$.

La figura 45 a, muestra que el aumento de la concentración de aislado de amaranto A9, y consecuentemente de proteína, provocó un incremento en la WHC de los geles ($p < 0,05$), siendo mayor a 90 que a 95 °C. Estos resultados siguen la misma tendencia que los revelados por SEM (figura 40). La formación de una matriz más cerrada, debido a una mayor interacción proteína-proteína mediada por uniones disulfuro, conduce a una mayor retención de agua, en los geles preparados a 90 °C. A 95 °C la formación de mayor cantidad de agregados sería la causa de una menor WHC.

El aumento de la temperatura de tratamiento por encima de 90 °C produce una disminución de la WHC ($p < 0,05$), (figura 45 b), debido probablemente a una total desnaturalización de las proteínas, y consecuentemente mayor agregación. Temperaturas por encima de 75 °C forman geles de soja, cuya matriz es más abierta, lo cual está relacionado con una disminución en la WHC (Puppo y Añón, 1999a).

Un incremento en el tiempo de calentamiento más allá de 20 minutos, no modifica la WHC de los geles ($p > 0,05$) (figura 45 c). Las moléculas de proteína necesitan un tiempo mínimo de tratamiento (20 minutos) para orientarse y comenzar a interaccionar y formar geles con una matriz más estructurada. Este fenómeno también se evidencia en las micrografías electrónicas obtenidas (SEM) (figura 42 1,2,3).

Es importante resaltar que los geles obtenidos a 70 °C forman una matriz desordenada y poco estable, aunque con una notable WHC, donde los agregados fueron fácilmente extraíbles con agua destilada, y en alta proporción con PSU. Los geles preparados a 95 °C presentan una matriz más estructurada con una baja WHC, estabilizada principalmente por agregados de alta masa molecular, no extraídos con ninguno de los medios ensayados. Tales agregados estarían formados por monómeros de 56, 35 y 28 kD, estabilizados principalmente por uniones disulfuro y por uniones no covalentes como ser interacciones hidrofóbicas y puentes hidrógenos.

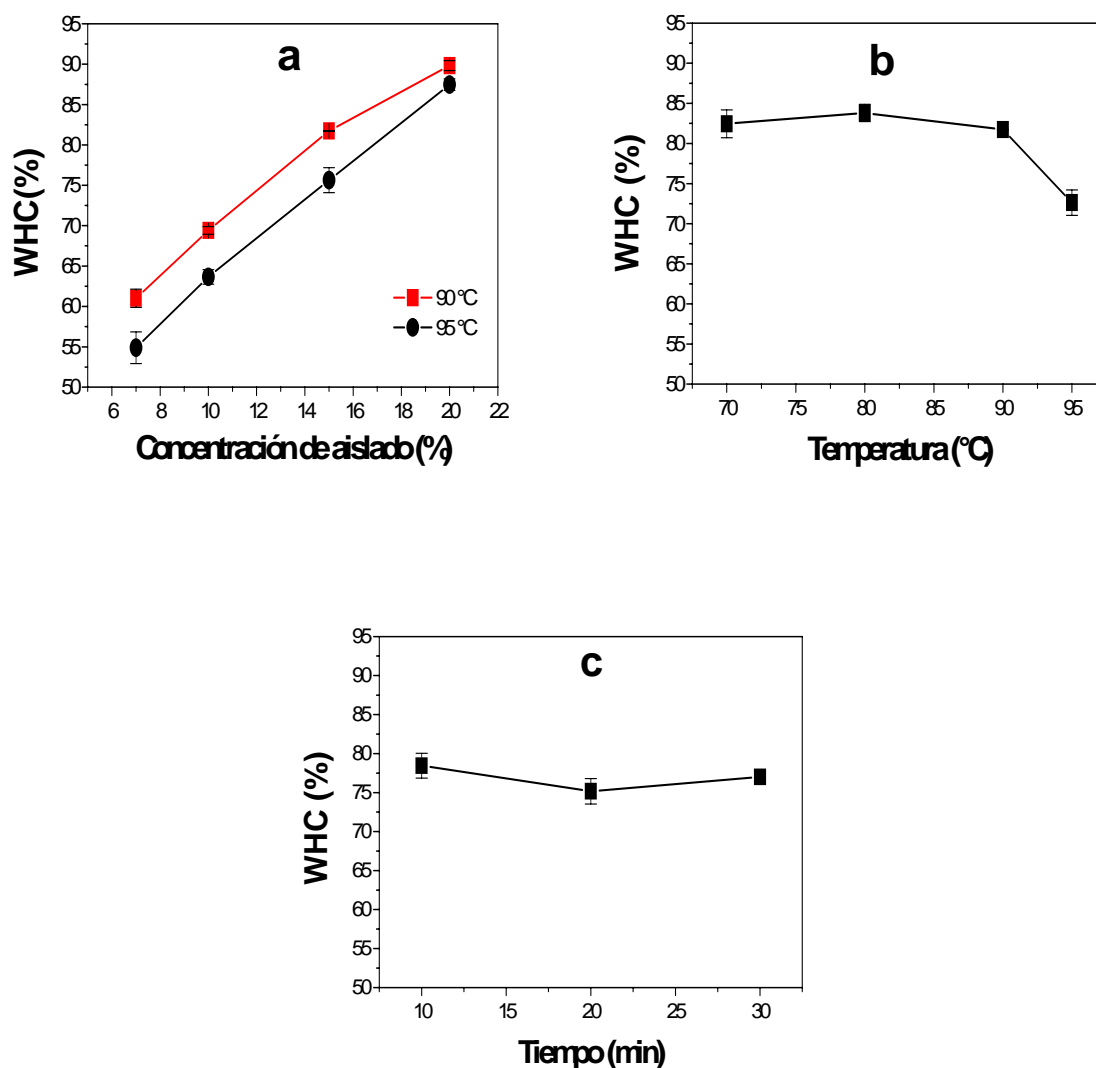


Figura 45. Capacidad de retención de agua (WHC %) de geles del aislado A9 de amaranto en función de: (a) concentración de aislado, (b) de la temperatura y (c) del tiempo de calentamiento.

5.5 Textura de geles (TPA).

La textura es un conjunto de propiedades físicas que derivan de la estructura de un alimento. La medida de la textura de un alimento debe ser considerada como un estudio de la consistencia del mismo. Las propiedades mecánicas son importantes en la determinación de la microestructura, las propiedades funcionales y las características estructurales de un alimento (Chronakis, 1996).

Uno de los métodos instrumentales más usados en las medidas del perfil de textura (TPA), de geles proteicos, es el test de compresión en platos paralelos que involucra dos compresiones sucesivas del material a una velocidad constante, durante las cuales se registra la evolución de la fuerza en función de la distancia o del tiempo (Bourne, 1982a; Furukawa y col., 1982; Kang y col., 1991; Chronakis, 1996).

La figura 46 muestra una curva típica del perfil de textura (TPA), obtenida en los ensayos de dos ciclos de compresión uniaxial. La fracturabilidad (F), fue definida como la fuerza de ruptura que se indica en el primer pico de la curva, y la altura del segundo pico de fuerza del primer ciclo de compresión fue definida como dureza (D). El cociente de las áreas positivas ($A2/A1$), por debajo de la primera y segunda compresión se define como cohesividad. El área de la fuerza negativa (A), del primer ciclo de compresión, representa el trabajo necesario para separar la sonda de la muestra, y fue definida como adhesividad. La distancia que le toma a la muestra recuperar su altura durante el tiempo comprendido entre la finalización del primer ciclo y el comienzo del segundo ciclo fue definido como elasticidad ($D2/D1$) (figura 46), (Szczeniak, 1963). A partir de estas curvas fuerza-tiempo se obtuvieron los parámetros del perfil de textura (dureza, fracturabilidad, cohesividad adhesividad y elasticidad), de los geles del aislado A9 de amaranto preparados en distintas condiciones (concentración de aislado, temperatura, y tiempo de calentamiento).

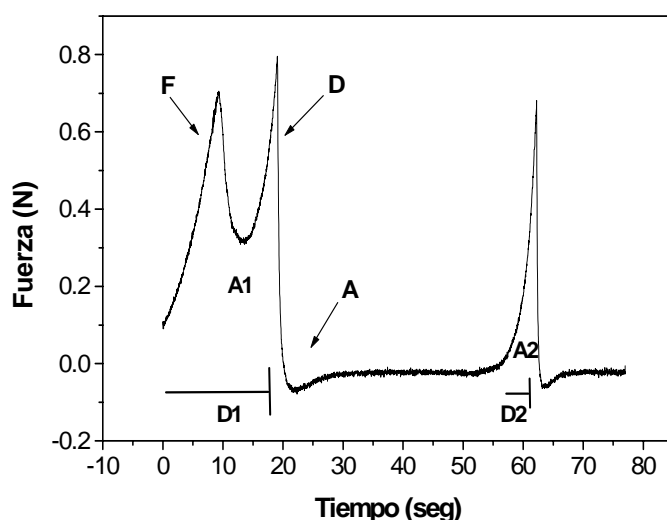


Figura 46. Curva fuerza-tiempo correspondiente a un ensayo de dos ciclos de compresión uniaxial de geles proteicos del aislado A9 de amaranto preparados en distintas condiciones. **F** fracturabilidad, **D** dureza, **A** adhesividad, **A2/A1** cohesividad, **D2/D1** elasticidad.

En la figura 47 se muestran los valores de los parámetros del perfil de textura, de los geles preparados en distintas condiciones. A medida que aumenta la concentración de proteínas (10-20 % p/v), como consecuencia de una mayor interacción proteína-proteína, se incrementó la formación de puentes disulfuro, los cuales contribuyen a la dureza de los geles (Sone y col., 1983; Zheng y col., 1993a). Esto explicaría el incremento de la dureza y fracturabilidad de los geles con el incremento de la concentración proteica (figura 47 a). Este comportamiento fue más evidente a 95 °C, temperatura a la cual se produce la desnaturalización de las principales fracciones proteicas presentes en el aislado en estudio. De acuerdo a Kang y col., (1991), los geles formados a altas temperaturas (90-100 °C) y concentración proteica (18-20 %), son firmes, duros y fracturables. Geles de aislado de soja presentaron similar comportamiento de dureza frente a la concentración proteica (Puppo y Añón, 1998b).

Los geles resultaron más elásticos con el aumento de la concentración, dicho incremento fue mayor para los geles preparados a 90 °C que a 95 °C, debido posiblemente a que la formación de agregados a la temperatura más elevada no favorece la elasticidad (figura 47 c). Esto concuerda con el comportamiento viscoelástico de geles preparados a altas concentraciones de aislado y temperaturas elevadas (figura 38), donde las uniones disulfuro son las responsables de la elasticidad de los mismos. Con respecto a la cohesividad no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$), a las dos temperaturas ensayadas (90 y 95 °C). En cambio la adhesividad disminuyó con el aumento de la concentración proteica, lo cual fue más evidente a 95 °C (figura 47 b).

Tanto a 90 como a 95 °C, al aumentar la concentración proteica se incrementó la dureza, fracturabilidad, elasticidad y disminuyó la adhesividad de los geles. A 95 °C la formación de agregados contribuye a una matriz menos flexible y con menor capacidad de retención de agua que a 90 °C. Los geles de matriz más densa y ordenada poseen mayor dureza y retienen más agua que los geles cuya matriz es más abierta (Sone y col., 1983).

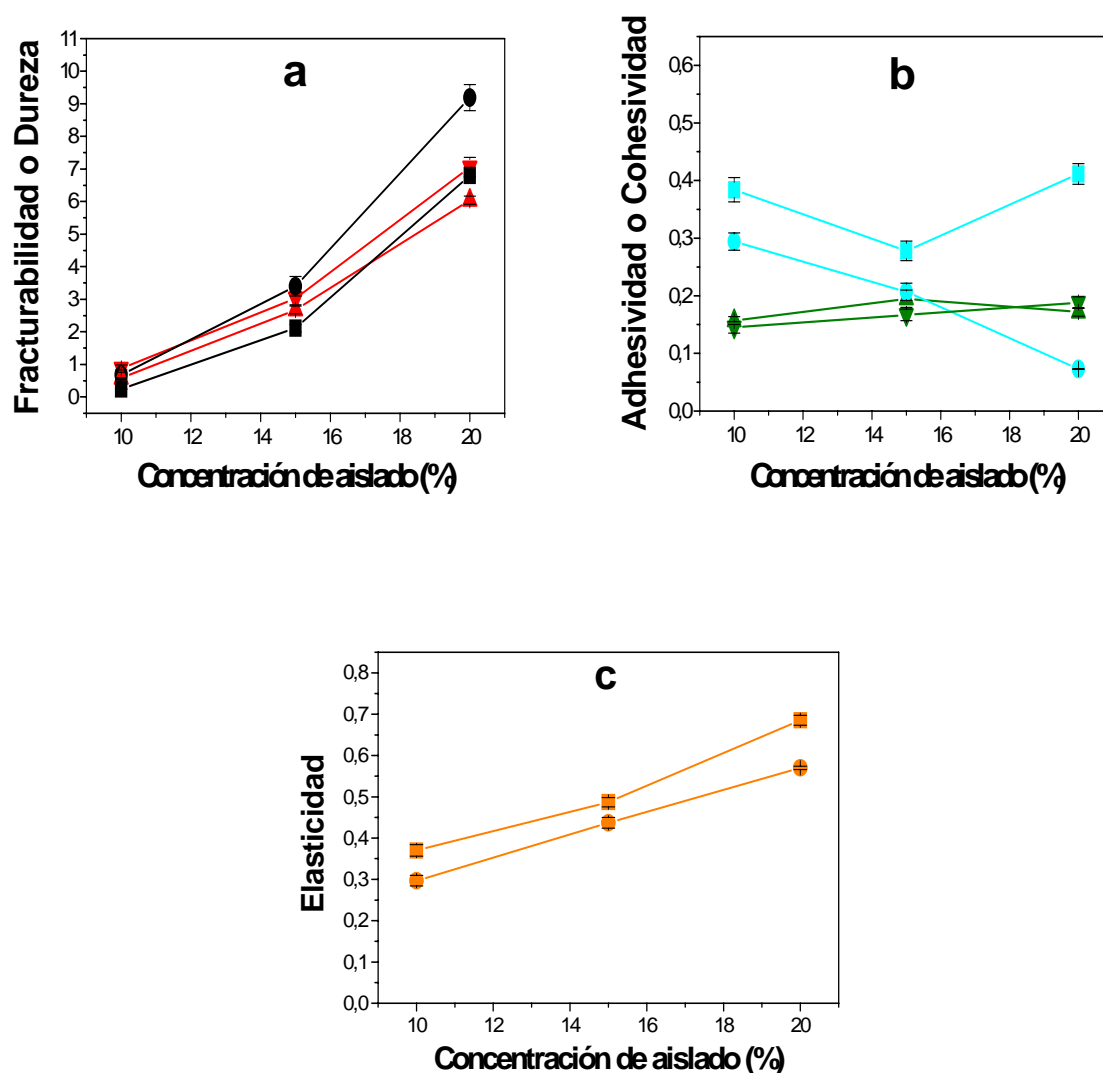


Figura 47. Parámetros del perfil de textura (TPA) de geles del aislado A9 de amaranto preparados a distintas concentraciones de aislado a dos temperaturas de gelificación (90 y 95 °C). (a) Dureza (▲) 90 °C, (■) 95°C; fracturabilidad (■) 90 °C, (●) 95 °C; (b) adhesividad (■) 90°C, (●) 95 °C; cohesividad (▲) 90 °C, (■) 95 °C; (c) elasticidad (■) 90 °C, (●) 95 °C.

El aumento de la temperatura (70–95 °C) en geles del aislado A9 al 15 % p/v, produjo un incremento en la fracturabilidad y dureza de los geles, pero en menor proporción a lo observado con el aumento de la concentración proteica (figura 48 a). Esto podría explicarse, teniendo en cuenta que a 95 °C la fracción globulina, que se encuentra en mayor proporción en el aislado A9, está desnaturalizada, lo cual favorecería la formación de puentes disulfuro que cumplen un rol muy importante en la estabilización y dureza de

los geles. Esto concuerda con los resultados de los ensayos de solubilidad y perfiles electroforéticos de los geles preparados a 95 °C, donde hay un predominio de las uniones disulfuro. Estos geles presentaron una disminución significativa de la adhesividad con la temperatura de tratamiento ($p < 0,05$), mientras que la cohesividad y elasticidad no presentaron grandes variaciones (figura 48 b y c). Este comportamiento se corresponde con la disminución de la WHC detectada a 95 °C, (figura 45 b).

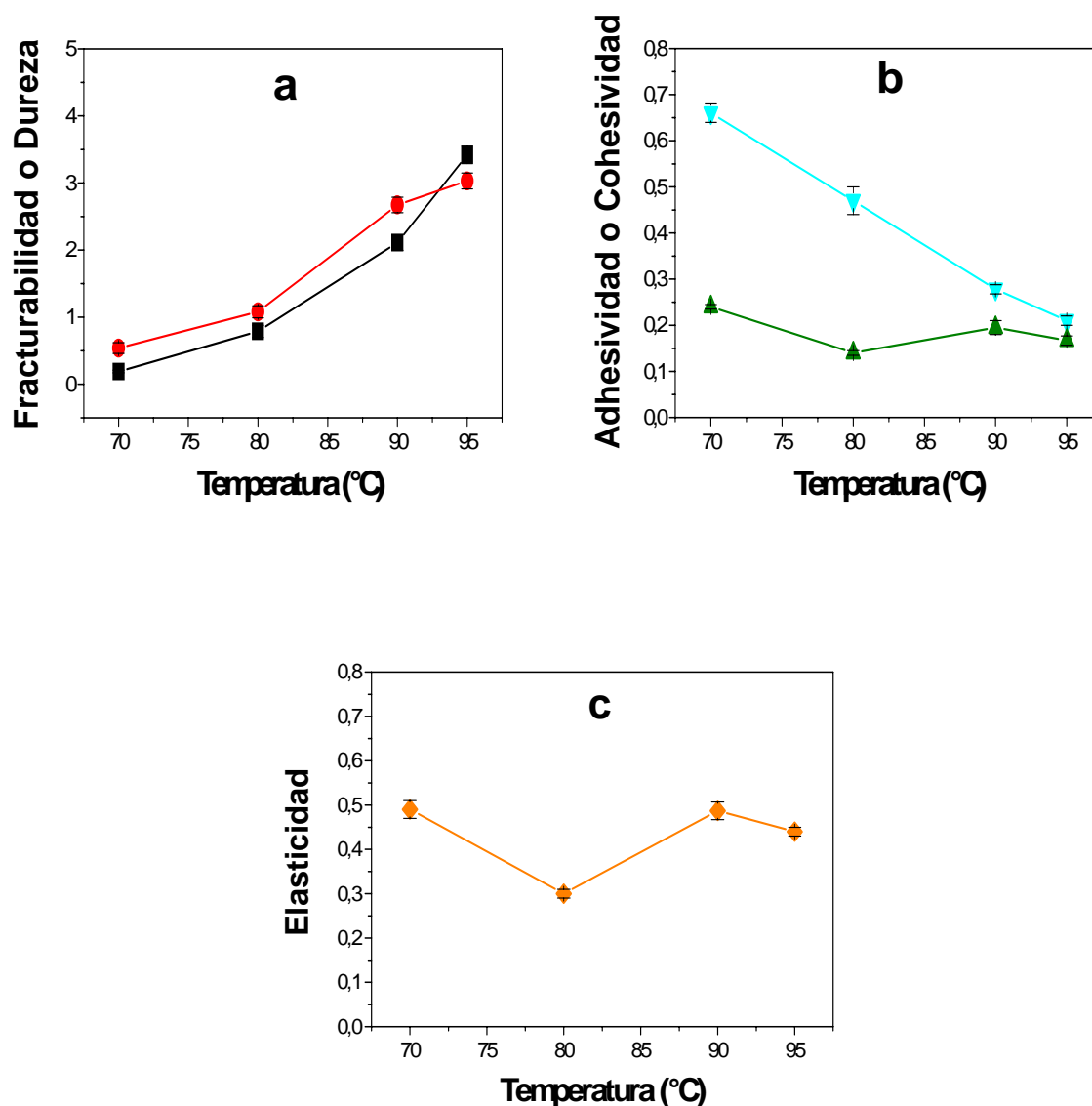


Figura 48. Parámetros de perfil de textura (TPA) en función de la temperatura de gelificación de geles del aislado A9 de amaranto al 15 % p/v tratados durante 20 minutos de calentamiento. (a) dureza (●) y fracturabilidad (■); (b) cohesividad (▲) y adhesividad (▼); (c) elasticidad (◆).

A medida que aumentó el tiempo de calentamiento para la formación de geles del aislado A9 de amaranto, se produjo un incremento de la dureza y la fracturabilidad, en menor escala al observado al variar la concentración y la temperatura (figura 49 a). La adhesividad disminuyó en forma significativa ($p < 0,05$), después de los 20 minutos de tratamiento térmico, mientras que la cohesividad y la elasticidad no mostraron cambios apreciables con el tiempo de tratamiento ($p > 0,05$), (figura 49 b y c).

De los resultados anteriormente expuestos se deduce que las propiedades de textura de los geles del aislado A9 de amaranto, dependerían principalmente de la concentración proteica y de la temperatura de gelificación.

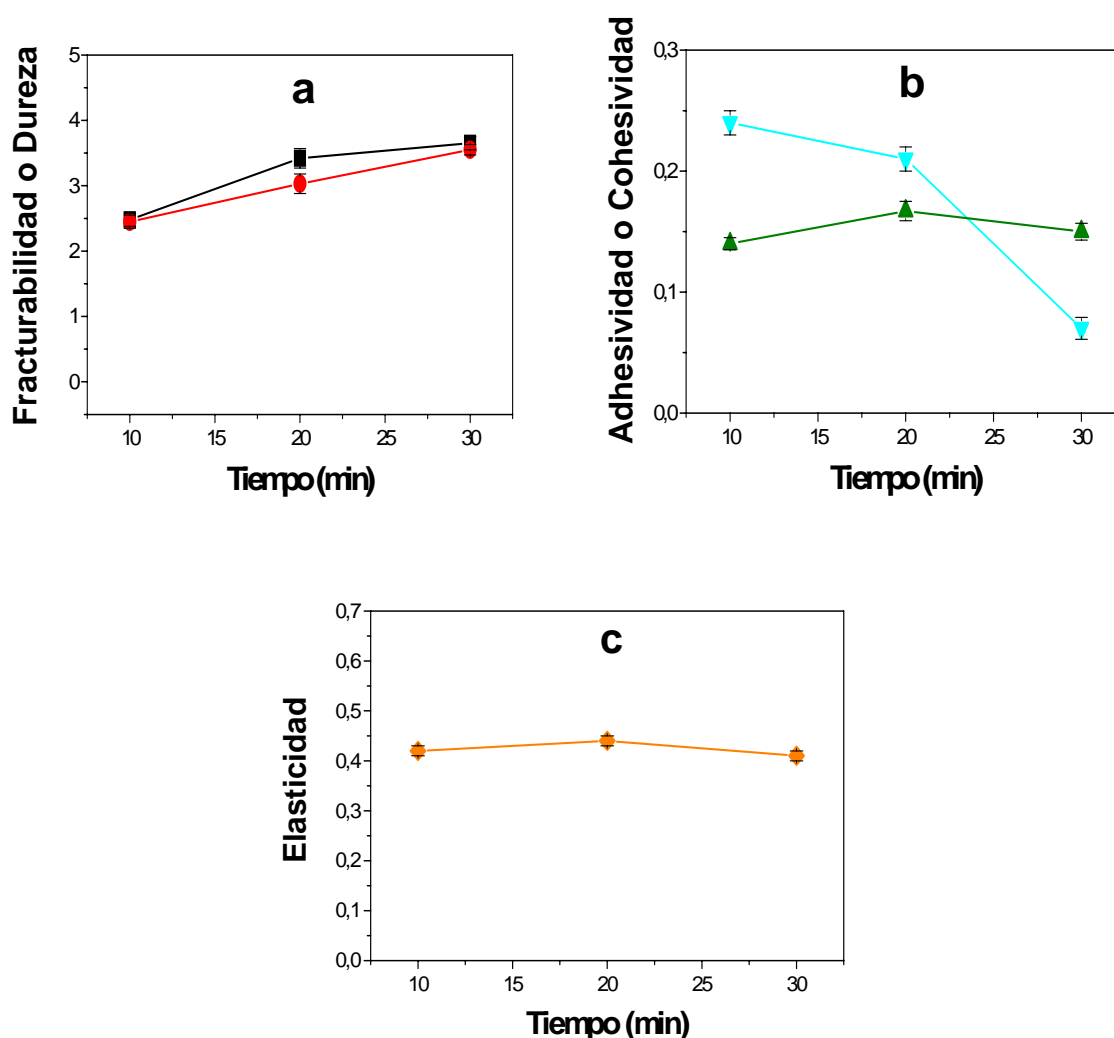


Figura 49. Parámetros de perfil de textura (TPA) en función del tiempo de calentamiento de geles del aislado A9 de amaranto al 15 % p/v preparados a 95 °C. (a) dureza (●) y fracturabilidad (■); (b) cohesividad (▲) y adhesividad (▼); (c) elasticidad (◆).

DISCUSSION

GENERAL

El tratamiento térmico de dispersiones en agua de los aislados proteicos de amaranto produjo cambios sustanciales en las propiedades de gelificación de los mismos dependiendo fundamentalmente del estado inicial de las proteínas.

Las proteínas presentes en dispersiones acuosas de los aislados A9 y A11 y de las fracciones globulina y albúmina de amaranto experimentaron un proceso de desnaturalización seguido por agregación cuando fueron tratadas térmicamente. El calentamiento provocó el desdoblamiento de la estructura secundaria y al mismo tiempo fenómenos de disociación y agregación a nivel de la estructura cuaternaria de las proteínas. En el caso de los aislados proteicos los cambios conformacionales fueron más evidentes en A9 tratado a 90 °C, lo cual concuerda con la alta estabilidad térmica de sus proteínas, evidenciada en los ensayos calorimétricos y espectroscópicos realizados. Las proteínas presentes en A11, al encontrarse parcialmente desnaturalizadas por efecto del pH de extracción, no sufrieron cambios significativos en su estructura con el tratamiento térmico.

Las globulinas experimentaron, como consecuencia del tratamiento térmico a alta temperatura, un mayor desplegamiento que las albúminas, a pesar de la menor estabilidad térmica de estas últimas. Este comportamiento fue atribuido al bajo contenido de estructura terciaria de las albúminas (Marcone y col., 1994a) y/o a la formación de agregados.

En el estado nativo, tanto las proteínas presentes en los aislados como las correspondientes a las fracciones albúmina y globulina, mostraron un predominio de estructura hoja plegada β . El contenido de esta estructura fue disminuyendo como consecuencia del tratamiento térmico dando lugar, a tiempos cortos de calentamiento, a la formación de una estructura más desordenada (random coil) y luego a una conformación β . Sobre la base de esto podríamos pensar que la formación de geles proteicos de amaranto se vería acompañada por la formación de una matriz integrada por proteínas altamente desnaturalizadas, en las que predominaría la conformación tipo hoja plegada β , estabilizada por uniones no covalentes (puente hidrógeno e interacciones hidrofóbicas) y covalentes (puentes disulfuro). Una transición estructural equivalente a la discutida ha sido observada en el proceso de gelificación de proteínas globulares, donde se ha detectado una disminución del contenido de α hélice y un aumento en la proporción de hoja plegada β (Clark, 1998). En el caso de proteínas de soja, Wang y Damodaran (1991) usando espectroscopia IR y Raman, mostraron que el tratamiento térmico de glicinina favorece la formación de una matriz proteica estabilizada por interacciones electrostáticas en la que se ha incrementado la estructura desordenada (random coil) de las proteínas a expensas de la

estructura hoja plegada β . Por el contrario, Ker y col., (1993) utilizando FT-IR en fase sólida, encontraron que el calentamiento de la misma proteína condujo a un aumento de una estructura más ordenada como consecuencia de un incremento de α hélice y una disminución del contenido del random coil. En el caso de proteínas de origen animal como las proteínas de suero lácteo se observó en la gelificación un incremento de la estructura hoja plegada β , variaciones de las bandas vibracionales de las uniones disulfuro, exposición de los residuos de triptofano y aumento de puentes hidrogeno de la tirosina (Nonaka y col., 1993).

En general, la desnaturalización de proteínas va acompañada de un descenso de la solubilidad, debido a la exposición de los grupos hidrófobos hacia la fase acuosa y a la agregación de las moléculas proteicas desplegadas (Cheftel y col., 1993). Las proteínas de amaranto siguieron este comportamiento. Se detectó una disminución de la solubilidad en agua la cual fue mayor para el aislado A9 y la fracción globulina, en particular a temperatura elevada y tiempos prolongados de tratamiento; y mínima para el aislado A11 y la fracción albúmina. En el caso de las dispersiones acuosas de los aislados A9, A11 y de la fracción globulina se detectó la formación de agregados insolubles y solubles de alta masa molecular, estabilizados por uniones covalentes y no-covalentes. En tanto que, la fracción albúminas mostró una menor formación de agregados encontrándose los mismos estabilizados por interacciones hidrofóbicas y puente hidrógeno.

A una concentración proteica superior a la C_{crit} de gelificación, los agregados de alta masa molecular interaccionaron entre sí formando la matriz de un gel. Estos agregados, al igual que los formados en las dispersiones de A9 tratadas térmicamente, estaban compuestos por globulina 11S (polipéptidos de 35 y 28 kDa) y globulina-P (monómeros de 56 kDa) agregadas y no agregadas. A alta concentración proteica y temperatura de tratamiento, los geles del aislado A9 de amaranto presentaron un comportamiento viscoelástico, no viéndose favorecida la elasticidad de la matriz por una etapa posterior de enfriamiento. La matriz de los geles preparados a concentraciones de aislado menores de 15 % p/v, temperaturas cercanas a 70 °C y tiempos de calentamiento menores de 15 minutos, presentaron una matriz más desordenada con predominio de interacciones covalentes pero con una importante proporción de interacciones hidrofóbicas y puentes hidrógeno. En cambio en los geles formados a mayor concentración de proteínas, elevada temperatura y tiempo de tratamiento, las uniones disulfuro fueron las que prevalecieron en la estabilización de la matriz.

Las transformaciones sufridas por las proteínas de amaranto durante el proceso de gelificación son equivalentes a las descritas para soja. El tratamiento térmico de proteínas de soja también induce su disociación, la formación de agregados solubles de alta masa molecular y a la asociación lineal entre las cadenas proteicas por medio de interacciones hidrofóbicas lo que conduce a la formación de un gel (Yamauchi y col., 1991). A pH neutro los geles obtenidos a partir de aislados proteicos presentan una matriz ordenada formada por las subunidades AB de glicinina y la subunidad β de β -conglucina, matriz en la que las uniones disulfuro juegan un rol importante (Renkena, 2001).

Los geles formados por el aislado A9 de amaranto fueron opacos, con alto grado de agregación y baja WHC, a diferencia de los geles preparados con aislados de soja que son transparentes y presentan altos valores de WHC (>90 %) (Puppo, 1997). Para ambos tipos de proteínas una mayor agregación de la matriz conduce a geles menos transparentes con menor WHC. A diferencia de las proteínas de amaranto, el incremento de la concentración proteica no modifica la WHC de los geles de soja (Puppo, 1997).

A mayor concentración proteica, temperatura y tiempo de tratamiento los geles de amaranto presentaron mayor dureza y fracturabilidad. La mayor interacción proteína-proteína, favoreció la formación de puentes disulfuro que contribuye a la dureza y fracturabilidad de los geles. Los geles de proteínas de soja también muestran alta fracturabilidad y elasticidad (Van Kleef, 1986), y su dureza varía con las condiciones de calentamiento, incrementándose a medida que aumenta la temperatura de tratamiento (Ker y col., 1993).

Resultados similares a los nuestros han sido obtenidos también para proteínas de origen animal como la ovoalbúmina y proteínas de suero lácteo, sometidas a un proceso de gelificación en frío inducido por tratamiento ácido (Alting y col., 2004). En estos casos la matriz proteica fue inicialmente estabilizada por interacciones físicas y subsiguientemente por la formación de uniones disulfuro los cuales determinan las propiedades mecánicas y estabilidad física de los geles.

CONCLUSIONES

FINALES

El presente trabajo hace aportes originales al conocimiento básico referente a las modificaciones sufridas por las proteínas de amaranto como consecuencia del tratamiento térmico, así como sobre su capacidad de formar geles. Asimismo sienta las bases para una posible aplicación tecnológica de estas proteínas en la formulación de alimentos que requieran de una matriz gelificada.

★ La modificación del pH en la etapa de extracción de las proteínas de amaranto permitió la obtención de aislados enriquecidos en diferentes fracciones proteicas; globulinas en el caso de pH 9 y glutelinas a pH 11. La diferencia en la composición de los aislados se manifestó en propiedades como la estabilidad de las proteínas frente al tratamiento térmico y el grado de conformación nativa que presentan.

★ El tratamiento térmico afectó las características estructurales y fisicoquímicas de las proteínas presentes en aislados y fracciones proteicas de amaranto. Dicho tratamiento condujo a una desnaturalización y agregación de las proteínas; efectos dependientes de las condiciones tiempo-temperatura empleadas y del tipo de fracciones proteicas presentes en cada aislado.

★ Como consecuencia del tratamiento térmico la solubilidad en agua del aislado A9, enriquecido en la fracción globulina, se redujo entre un 35 y un 50 % dependiendo de las condiciones de calentamiento. Esta pérdida de solubilidad fue atribuida a la formación de agregados proteicos, constituidos principalmente por polipéptidos de 52 y 56 kD pertenecientes a las globulinas tipo 11S como a globulina-P, siendo el polipéptido de 56 kD característico de esta última fracción (Castellani, 2000). Estos agregados estarían estabilizados por uniones no covalentes y disulfuro. Previo a la agregación se requirió de un desplegamiento de las proteínas tal como lo indicó la disminución de la entalpía de desnaturalización, el aumento de la absorbancia a 260 y 280 nm, y el incremento de la hidrofobicidad expuesta de las proteínas (H_o). El análisis térmico mostró un aumento de la estabilidad térmica de las especies proteicas nativas o parcialmente desnaturalizadas a la máxima temperatura y tiempo de tratamiento.

★ El aislado A11, se encuentra enriquecido en glutelinas las cuales, debido a las condiciones extremas de pH empleadas en la extracción, se encuentran parcialmente desplegadas. En este caso el tratamiento térmico incidió de forma leve en la solubilidad en agua de las proteínas, independientemente de las condiciones de tiempo y temperatura empleadas. Sin embargo el calentamiento provocó un incremento del grado de desplegamiento de las mismas, tal como lo sugiere la disminución de la entalpía de desnaturalización, y el aumento de la absorbancia a 260 y 280 nm, y de la hidrofobicidad expuesta (H_0). A su vez el calentamiento también provocó la formación de agregados, los cuales estarían constituidos por todas las especies polipeptídicas presentes en el aislado A11.

★ Las globulinas de reserva son las principales responsables de los cambios estructurales y funcionales detectados durante la gelificación de aislados proteicos de amaranto, y son las que imparten las características de la matriz de los geles obtenidos.

★ Las proteínas de amaranto extraídas a pH 9 y precipitadas en el PI -aislado A9-, son capaces de formar geles por tratamiento térmico, requiriendo de una concentración mínima del 7 % p/v y una temperatura de calentamiento de 70 °C:

La gelificación siguió una cinética de primer orden y fue gobernada por la desnaturalización de las especies proteicas de menor estabilidad térmica.

La matriz formada mostró un alto grado de entrecruzamiento; similar al observado en geles de proteínas de soja; lo cual fue atribuido a la gran cantidad de uniones disulfuro que estabilizan la red proteica, junto con uniones de tipo no-covalente. La proporción de las diferentes uniones que estabilizan el gel varió con las condiciones de preparación.

Las dispersiones proteicas calentadas y sus respectivos geles presentaron a valores altos de concentración proteica y temperatura de tratamiento un comportamiento viscoelástico, con reogramas característicos de geles fuertes; mientras que en condiciones por debajo de las críticas, los sistemas se comportaron como soluciones macromoleculares entrelazadas.

La elasticidad de las dispersiones calentadas y de los geles, aumentó con el incremento de la concentración proteica y de la temperatura de tratamiento, al igual que la fracturabilidad, dureza, y adhesividad determinadas mediante el análisis del perfil de textura. En tanto que la cohesividad y la elasticidad de la matriz sólo se modificó al variar la concentración de proteínas.

**REFERENCIAS
BIBLIOGRAFICAS**

- Abugoch, L. E.; Martínez, N. y Añón, M. C. 2003. Influence of the extracting solvent upon the structural properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) glutelin. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4060-4065.
- Aphalo, P.; Castellani, O. F.; Martínez, N. y Añón, M. C. 2004. Surface physicochemical properties of globulin-P amaranth protein. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 616-622.
- Agashe, V. R.; Shashtry, M. C. R. y Udgaonkar, J. B. 1995. Initial hydrophobic collapse in the folding of barstar. *Nature*, 377, 754-757.
- Alvarez, N. del V. y Genta, de Soria, N. L. 1993. Amaranthus: Desarrollo de productos alimenticios de alto valor nutricional. *La Alimentación Latinoamericana*, 197, 36-39.
- Añón, M. C.; Sorgentini, D. y Wagner, J. 2001. Relationships between different hydration properties of commercial and laboratory soybean isolates. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4852-4858.
- Almdal, K.; Dyre, J.; Hvidt, S. y Kramer, O. 1993. Towards a phenomenological definition of the term "gel". *Polym. Gels Netw.*, 1, 5-17.
- Alting, A.C; Weijers, M.; de Hoog, E. H. A.; van de Pijpekamp, A. M.; Cohen Stuart, M. A.; Hamer, R. J.; de Kruif y Visschersn. 2004. Acid induced cold gelation of globular proteins: Effects of protein aggregate characteristics and disulfide bonding on rheological properties. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 623-631.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis (methods N° 923.03; 920.87), Eds 15th. Association of Official Analytical Chemists, INC. Arlington, Virginia, USA. pp., 777-782.
- Arntfield, S. y Murray E. 1981. The influence of processing parameters on food protein functionality I. Differential scanning calorimetry as an indicator of protein denaturation. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 14, 289-294.
- Arntfield, S.; Ismond, M. y Murray E. 1990. Thermal analysis of food proteins in relation to processing effects. En "Thermal Analysis of Food" Editado por Elsevier Science Publishing Co., Inc. New York. Chaper 3, pp., 51-91.
- Babajimopoulos, M.; Damodaran, S.; Rizvi, S. S. H. y Kinsella, J. E. 1983. Effects of various anions on the rheological and gelling behavior of soy proteins: Thermodynamic observations. *J. Agric. Food Chem.*, 31, 1270-1275.
- Balny, C. y Masson, P. 1993. Effects of high pressure on proteins. *Food Res. Int.*, 9, 611-628.

- Barba de la Rosa, A. P.; Gueguen, J.; Paredes-López, O. y Viroben, G. 1992a. Fractionation procedures, electrophoretic characterization and amino acid composition of amaranth seed protein. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 931-936.
- Barba de la Rosa, A.; Paredes-López, O.; Gueguen, J. 1992b. Characterization of amaranth globulins by ultracentrifugation and chromatographic techniques. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 937-940.
- Barba de la Rosa, A.; Herrera-Estrella, A.; Utsumi, S. y Paredes-López, O. 1996. Molecular Characterization, cloning and structural analysis of a cDNA encoding an amaranth globulin. *J. Plant Physiol.*, 149, 527-532.
- Barbut, S. 1995. Effect of sodium levels on the microstructure and texture of whey protein isolate gels. *Food Res. Int.*, 28, 437-443.
- Barceló, F. 2003. Técnicas instrumentales en bioquímica y biología. Universidad de las Islas Baleares, Palma. Capítulo 4, 99-102.
- Bejosano, F. y Corke, H. 1998a. Protein quality evaluation of Amaranthus \whole meal flours and protein concentrates. *J. Sci. Food Agric.*, 76, 100-106.
- Bejosano, F. y Corke, H. 1998b. Effect of Amaranthus and Buckwheat proteins on wheat dough properties and noodle quality. *Cereal Chem.*, 75, 171-176.
- Becker, R.; Wheeler, E.; Lorenz, K.; Stafford, A.; Grosjean, O.; Betschart, A. y Saunders, R. A. 1981. Compositional study of amaranth grain. *J. Food Sci.*, 46, 1175-1180.
- Bikbov, T. M.; Grinberg V. Y; Schmandke, H; Caika, T. S.; Vaintraub, I. A. y Tolstoguzov, V. B. 1981. A study on gelation of soybean globulin solutions 2. Viscoelastic properties and structure of thermotropic gels of soybean globulins. *Colloid Polym. Sci.*, 259, 536-547.
- Boye, J. I.; Kalab, M.; Alli, I. y Ma, C. Y. 2000. Microstructural properties of heat-set whey protein gels effect of pH. *Lebensm Wiss Technol.*, 33, 165-172.
- Bourne, M. C. 1982a. Principles of objective texture measurement. En "Food Science and Tehnology A series of monographs. Food Texture and Viscosity: concept and measurement". Academic Press., N.Y. Chaper 3, pp., 114-117.
- Bowland, E. I. y Foegeding, E. A. 1995. Effects of anions on thermally induced whey protein isolate gels. *Food Hydrocoll.*, 9, 47-56.
- Bremen L. G. B.; Bijsterbosch, B. H.; Schrijvers, R.; Van Vliet, T. y Walstra, P. 1990. On the fractal nature of the structure of acid casein gels. *Colloid Surface*, 51, 159-170.

- Bremer, L. G. B.; Walstra, P. y Van Vliet, T. 1995. Estimations of the aggregation time of various colloidal systems. *Colloid Surface A.*, 99, 121-127.
- Bressani, R.; Gonzalez, J. M., Zuniga, J.; Breuner, M. y Elias, L. G. 1987. Yield selected chemical Composition and Nutritive value of 14 selections of amaranth grain representing four species. *J. Sci. Food Agric.*, 38, 347-356.
- Bressani, R. 1989. The protein of grain amaranth. *Food Rev. Interntl.*, 5, 13-18.
- Bressani, R. y García-Vela, L. A. 1990. Protein fractions in amaranth grain and their chemical characterization. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1205-1209.
- Bressani, R. 1994. Composition and nutritional properties of amaranth. In *Amaranth. Biology, Chemistry and Technology*. Ed. O. Paredes-López. CRC Press, Boca Ratón., Chapter 10, pp., 185-205.
- Calvo C. y Durán L. 2002. Propiedades Físicas II. Ópticas y color. Tecnología de alimentos. CYTED. Vol. 1, pp., 215.
- Cardamone, M. y Puri, K. 1992. Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. *J. Biochem.*, 282, 589-593.
- Castellani, O. F.; Martínez, E. N. y Añón, M. C. 1998. Structural modifications of an amaranth globulin induced by pH and NaCl. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4846-4853.
- Castellani, O. F.; Martínez, E. N. y Añón, M. C. 1999. Role of disulfide bonds upon structural stability of an amaranth globulin. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3001-3003.
- Castellani, O. F.; Martínez, E. N. y Añón, M. C. 2000. Globulin-P structure modifications induced by enzymatic proteolysis. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5624-5629.
- Castellani, O. F. 2000. Caracterización estructural y fisicoquímica de la globulina-P de amaranto. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Catsimpoolas, N. y Meyer, E. W. 1970. Gelation phenomena of soybean globulins. I. protein-protein interactions. *Cereal Chem.*, 47, 559-570.
- Chrastil, J. y Zarins, Z. 1992. Influence of storage on peptide subunit composition of rice oryzenin. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 927-930.
- Cheftel, J. C. 1976. Introducción a la Bioquímica y Tecnología de Alimentos. Editorial Acribia. Vol. 1. pp., 63-64.
- Cheftel, J. C. 1992. Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: An overview. In C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans y P. Masson. High pressure and biotechnology. Colloquia INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. Vol. 224, pp., 195-209.

- Cheftel, J. C.; Cuq, J. L. y Lorient, D. 1993. Aminoácidos péptidos y proteínas. "Química de los alimentos". Ed. Fenema. O. R. Acribia, 2^{da} edición. España. Capítulo 5, pp., 275-414.
- Chen, S. y Paredes-López, O. 1997. Isolation and characterization of the 11 S globulin from amaranth seeds. *J. Food Biochem.*, 21, 53-65.
- Christensern, H. y Pain, R. H. 1994. The contribution of the molten globule model. In *Mechanisms of Protein Folding*. Ed. R. H. Pain. Oxford University Press, pp., 55-79.
- Chronakis, I. S. 1996. Network formation and viscoelastic properties of commercial soy protein dispersions: effect of heat treatment, pH and calcium ions. *Food Rev. Interntl.*, 29, 123-134.
- Cid, H.; Bunster, M.; Arriagada, E. y Campos, M. 1982. Prediction of secondary structure of proteins by means of hydrophobicity profiles. *FEBS Lett.*, 10, 247-254.
- Clark, A. H.; Saunderson, D. H. P. y Suggett, A. 1981b. Infrared and laser-Raman spectroscopic studies of thermally-induced globular protein gels. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 17, 353-364.
- Clark, A. H.; Richardson, R. K.; Ross-Murphy, S. B. y Stubbs, J. M. 1983. Structural and mechanical properties of agar gelatin co-gels. Small-deformation studies. *Macromolecules*, 16, 1367-1374.
- Clark, A. H. y Lee-Tuffnell D. D. 1986. Gelation of globular protein, In *Functional Properties of Food Macromolecules*. Eds. J. R. Mitchell and D. A. Ledward. Elsevier Applied Science, pp., 203-272.
- Clark, A. H. y Ross-Murphy, S. B. 1987. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Adv. Polym. Sci.*, 83, 60-192.
- Clark, A. M.; Ross-Murphy, S. B.; Nishinari K. y Watase, M. 1990. Shear modulus-concentration relationships for biopolymer gels. Comparison of independent and cooperative crosslink descriptions. In W. Burchard y S. B. Ross-Murphy (Eds.), *Food polymers gels and colloids*. London: Elsevier. pp., 209-229.
- Clark, A. H. 1998. Gelation of globular proteins. In: Hill SE, Ledward DA, Mitchell JR, editors. *Functional Properties of Food Macromolecules*, 2nd ed. Gaithersburg, USA: Aspen Publishers, pp., 77-142.
- Clark, A. H.; Kavanagh, G. M. y Ross-Murphy, S. B. 2001. Globular protein gelation-theory and experiment. *Food Hydrocoll.*, 15, 383-400.
- Coimbra, S. y Salema, R. 1994. *Amaranthus hypochondriacus*. seed structure and localization of seed reserves. *Ann. Bot.*, 74, 373-378.

- Comfort, S. y Howell, N. K. 2002. Gelation properties of soya and whey protein isolate mixtures. *Food Hydrocoll.*, 16, 661-672.
- Cooney, M. J.; Rosenberg, M. y Shoemaker, C. F. 1993. Rheological properties of whey protein concentrate gels. *J. Text. Stud.*, 24, 325-334.
- Costell E.; Fiszman S. y Durán L. 2002. Propiedades Físicas I. Reología de sólidos y textura. Tecnología de alimentos. CYTED. Vol 1, 262.
- Damodaran, S. 1988. Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process: effect on gelation. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 262-269.
- Damodaran, S. 1989. Interrelationship of molecular and functional properties of food proteins. In Food Proteins. Editado por Kinsella, J.; Soucie, W. The American Oil Chemists' Society. Chapter 3, pp., 21-51.
- Davies, M. C.; Binns, J. S.; Melia, C. D. y Bourgeois, D. 1990. Fourier transform Raman spectroscopy of polymeric biomaterials and drug delivery systems. *Spectrochim. Acta*, 464, 277-283.
- Demchenko, A. P. y Sandroviski, A. K. 1979. Determination of tyrosine and tryptophan in proteins according to absorption spectra derivatives. *Ukr. Biokhim. Zh.* 51, 687.
- Doi, E.; Koseki, T. y Kitabatake, N. 1987. Effects of limited proteolysis on functional properties of ovalbumin. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 64, 1697-1703.
- Doi, E. y Itabatake, N. 1989. Structure of glycinin and ovalbumin gels. *Food Hydrocoll.*, 3 (4), 327-337.
- Domínguez H.; Núñez, M. J. y Lema, J. M. 1991. Factores antinutricionales de la proteína de soja. *Alimentación Equipos y Tecnología*, 1, 149-155.
- Donovan, J. W. 1969. Ultraviolet Absorption. In Physical Principle and Techniques of Proteins Chemistry. Eds., Part A; Leach, S. J., Academic: New York, pp., 101.
- Dumay, E. 1988. Denaturation thermique de β -lactoglobuline et propriétés gelifiantes des concentrés de lactosérum. In: Lorient D, Colas B, Le Meste M, editors. Propriétés fonctionnelles des macromolécules alimentaires. Paris: Technique et Documentation. pp., 67-87.
- Dyer, R. J. 1973. Aplicaciones de espectroscopía de absorción en compuestos orgánicos. Edt. Prentice-Hall. pp., 23-55.
- FAO/WHO. 1973. Ad Hoc Expert Committee. Energy and Protein Requirements. Tech. Report Series 522; FAO Nutrition Meetings Report Series N° 52. WHO, Genova, FAO, Rome.

- Ferry, J. 1948. Protein Gels. *Adv. Protein Chem.*, 4, 1-78.
- Foegeding E. A.; Bowland, E. L. y Hardin C. C. 1995. Factors that determine the fracture properties and microstructure of globular protein gels. *Food Hydrocoll.*, 9, 237-249.
- Furukawa, T. y Ohta, S. 1982. Mechanical and water-holding properties of heat-induced soy protein gel as related to their structural aspects. *J. Text. Stud.*, 13, 59-69.
- Galazka, V. B.; Ledward, D. A.; Dickinson, E. y Langley, K. R. 1995. High pressure effects on emulsifying behavior of whey protein concentrate. *J. Food Sci.*, 60, 1341-1343.
- Galazka, V. B.; Dickinson, E. y Ledward, D. A. 1996. Influence of high pressure on the emulsifying behavior of β -lactoglobulin. *Food Hydrocoll.*, 10, 213-219.
- Galazka, V. B.; Dickinson, E. y Ledward, D. A. 1999. Emulsifying behavior of 11S globulin Vicia faba in mixtures with sulphated polysaccharides: comparison of thermal and high-pressure treatments. *Food Hydrocoll.*, 13 (5), 425-435.
- German, B.; Damodaran, S. y Kinsella, J. E. 1982. Thermal dissociation and association behavior of soy proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 30, 807-812.
- Giboreau, A.; Cuvelier, G. y Launay, B. 1994. Rheological behavior of three biopolymer/water systems, with emphasis on yield stress and viscoelastic properties. *J. Text. Stud.*, 25, 119-137.
- Gorinstein, S.; Zemser, M.; Friedman, M. y Chang, Sh. M. 1995. Simultaneous differential scanning calorimetry, X-ray diffraction and FT-IR spectrometry in studies of ovalbumin denaturation. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 45, 248-256.
- Gorinstein, S.; Zemser, M.; Friedman, M.; Vasco-Mendez, N. y Paredes-López, O. 1996a. Denaturant-induced conformations of globulins. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 93-99.
- Gorinstein, S.; Zemser, M. y Paredes-López, O. 1996b. Structural stability of globulins. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 100-105.
- Gorinstein, S.; Zenser, M.; Fridman, M; Rodrigues, W. A; Martins, P. S.; Vello, N. A.; Tosello, G. A. y Paredes-López, O. 1996. Physicochemical characterization of the structural stability of some plant globulins. *Food Chem.*, 56, 2, 131-138.
- Gorinstein, S.; Zemser, M.; Fkiess, A. Shnitman, I.; Paredes-López, O.; Yamamoto, K.; Kobayashi, S. y Taniguchi, H. 1998. Computational analysis of the amino acid residue sequences of amaranth and some other proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62 (10), 1845-1851.

- Gorinstein, S.; Delgado Lincon E.; Pawelzik E.; Permady H.; Weisz M. y Trakhtenberg S. 2001. Characterization of Soluble Amaranth and Soybean Proteins Based on Fluorescence, Hidrophobicity, Electrophoresis, Amino Acid Analysis, Circular Dichroism, and Differential Scanning Calorimetry Measurements. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5595-5601.
- Gorinstein, S.; Pawelzik, E.; Delgado-Licon, E.; Haruenkit, R.; Weisz, M. y Trkhtenberg, S, 2002. Characterization of pseudocereal and cereal proteins by proteins and amino acid analyses. *J Sci. Food Agric.*, 82, 886-891.
- Grinberg, V. Ya.; Grinberg, N. V.; Bikbov, T. M. y Bronich, T. K. 1992. Thermotropic gelation of food proteins. *Food Hydrolocoll.*, 6 (1), 69-96.
- Gruener, L. y Ismond, M. A. H. 1997. Effects of acetylation and succinylation on the functional properties of the canola 12S globulin. *Food Chem.*, 60, (4), 513-520.
- Hamm, R. 1977. Change of muscle proteins during heat of meat. In Physical, chemical and biological changes in food caused by thermal processing. Ed. T. Hoyem y O. Kvlle. Applied Sci. Publ.; London. pp., 101.
- Halling, P. J. 1981. Protein-stabilized foams and emulsions. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 15, 155-203.
- Hamann, D. D. 1987. Methods for measurement of rheological changes during thermally induced gelation of proteins. *Food Technol.*, 41, (3), 100-108.
- Hayakawa, S. y Nakai, S. 1985. Relationship of hidrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. *J. Food Sci.*, 50, 486-491.
- Heertje, I. 1993. Structure and function of food products: a review. *Food Struct.*, 12, 343-364.
- Hermansson, A. 1978. Physicochemical aspects of soy proteins structure. *J. Text. Stud.*, 9, 33-58.
- Hermansson , A. M. y Lucisano, M. 1982. Gel characteristics-water binding properties of blood plasma gel and methodological aspects on the water binding of gel systems. *J. Food Sci.*, 47, 1955-1959.
- Hermansson, A. M. 1986. Soy protein gelation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 63, 658-666.
- Hermansson, A. M. 1994. Microstructure of protein gels related to functionality. In R. Y. Yada, R. L. Jackman and Smith, Protein structure-function relationships in foods. London. Blackie Academic and Professional, pp., 22-42.

- Jackson, W. y Brandts, J. 1970. Thermodynamics of protein denaturation. A calorimetric study of the reversible denaturation of chymotrypsinogen and conclusions regarding the accuracy of the two state approximations. *Biochem.*, 9, 2294-2301.
- Juaregui, J. M.; Regensten, J. M. y Baker, R. C. A. 1981. A simple centrifugal method for measuring expressible moisture. *J. Food Sci.*, 46, 1271-1273.
- Kang, I. J.; Matsumura, Y. y Mori, T. 1991. Characterization of texture and mechanical properties of heat-induced soy protein gels. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 68, 339-345.
- Kato, A. y Nakai, S. 1980. Hydrophobicity determined by fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochem. Biophys. Acta.*, 624, 13-20.
- Kato, A.; Osako, Y.; Matsudomi, N. y Kobayashi, K. 1983. Changes in the emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation. *Agric. Boil. Chem.*, 47, 33-38.
- Kato, K.; Matsui, T. y Tanaka, S. 1987. Quantitative estimation of α -helix coil content in bovine serum albumin by fourier transform-infrared spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, 41, 861-865.
- Katsuta, K. y Kinsella, J. 1990. Spontaneous gelation of whey protein in urea and guanidine hydrochloride. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2423-2424.
- Ker, Yi-Chang; Chen, Rong-Huci y Wu, Ching-Shyong. 1993. Relationships of secondary structure, microstructure and mechanical properties of heat-induced gel of soy 11S globulin. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 (4), 536-541.
- Khan, S. M.; Darnall, D. W. y Birnbaum, E. R. 1980. Tyrosine fluorescence as a measure of denaturation in thermolysin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 624, 1-12.
- Kinsella, J. E. 1976. Functional properties of proteins in foods: A Survey. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 23 (4), 323-395.
- Kinsella, J. E. 1979. Functional properties of soy proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56, 242-258.
- Kinsella, J. E. 1982. Relationships between structure and functional properties of food proteins In Food Proteins (P. F. Fox and J. J. Condon, eds.), Applied Science Publishing, London, pp., 51-103.
- Kinsella, J. E.; German. B. y Damodaran, S. 1985. Physicochemical and functional properties of oilseed proteins with emphasis on soy proteins. *New Prot. Food*; Academic Press: New York. Vol. 5, pp., 107-179.

- Kitagawa, T.; Azuma, T. y Hamarguchi, K. 1979. The Raman spectra of Bence-Jones proteins. Disulfide stretching frequencies and dependence of Raman intensity of tryptophan residues on their environments. *Biopolymers*, 18, 451-465.
- Kocher, P. M. y Foegeding, E. A. 1993. Microcentrifuge-based method for measuring water holding of protein gels. *J. Food Sci.*, 58, 1040-1046.
- Kohyama, K.; Yoshida, M. y Nishinari, K. 1992. Rheological study on gelation of soybean 11S protein by glucono- δ -lactone. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 8-14.
- Konishi, Y.; Fumita, Y.; Ikeda, K.; Okuno, K. y Fuwa, H. 1985. Isolation and characterization of globulin from seeds of *Amaranthus hypochondriacus*. *J. Agric. Biol. Chem.*, 49, 1453-1459.
- Konishi, Y. y Yoshimoto, N. 1989. Amaranth globulin as a heat-stable emulsifying agent. *Agric Biol. Chem.*, 53, 3327-3328.
- Konishi, Y.; Horikawa, K.; Oku, Y.; Azumaya, J. y Nakatani, N. 1991. Extraction of two albumin fractions from amaranth grains: comparison of some physicochemical properties and the putative localization in the grains. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1745-1750.
- Kronman, M. J. y Holmes, L. G. 1971. The fluorescence of native, denatured and reduced-denatured proteins. *Photochem. Photobiol.*, 14, 113.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lackowicz, J. R. 1983. Fluorescence of Protein. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Plenum Press, New York. pp., 341-379.
- Lakemond, C. M. M.; de Jongh, H. H. J.; Hessing, M.; Gruppen, H. y Voragen, A. G. J. 2000b. Heat denaturation of soy glycinin: influence of pH and ionic strength on molecular structure. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (6), 1991-1995.
- Leach, S. J. y Scheraga, H. A. 1960. Ultraviolet difference spectra and the internal structure of proteins. *J. Biol. Chem.*, 235, 2827-2829.
- Ledward, D. A. 1995. High pressure processing-the potential. In D. A. Ledward, D. E. Johnston, R. G. Earnshaw y A. P. M. Hasting, *High pressure processing of foods*. Nottingham University Press.
- Ledward, D. A. 1986. Gelation of gelatin. In *Functional properties of Food Macromolecules*. Eds., J. R. Michell and D. A. Ledward. Elsevier Amsterdam. pp., 171.

- Li-Chan, E.; Nakai, S. y Wood, D. F. 1984. Hydrophobicity and solubility of meat proteins and their relationship to emulsifying properties. *J. Food Sci.*, 49, 345-351.
- Li-Chan, E. C. Y.; Nakai, S. y Hirotsuka, M. 1994. Raman spectroscopy as a probe of protein structure in foos systems. In Protein Structure-Function Relationships in Food; Eds. Yada R. Y.; Jackson R. L. Smith, L. L.; Blackie Academic London, U. K.; pp., 163-197.
- Li-Chan, E. C. Y. 1996a. The applications of Raman spectroscopy in food science. *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 361-370.
- Li-Chan E. C. y Qin, L. 1998. The application of Raman spectroscopy to the structural analysis of food protein networks. In paradigm for successful utilization of renewable resource; Sessa, D. J., Willet, J. L., Eds.; AOCS Press: Champaign, IL. pp., 123-139.
- Lowe, L. L.; Foegeding E. A. y Daubert, C. R. 2003. Rheological properties of fine-stranded whey protein isolate gels. *Food Hydrocoll.*, 17, 515-522.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-267.
- Ma, C. Y. y Harwalkar, V. R. 1984. Chemical characterization and functionality assessment of oat protein fractions. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 144-149.
- Ma, C. Y. y Harwalkar, V. R. 1988. Studies of thermal denaturation of oat globulin by differential scanning calorimetry. *J. Food Sci.*, 53, 531-534.
- Ma, C. Y. y Ventktesh R. H. 1988. Study of thermal denaturation of oat globulin by ultraviolet and florescence spectrophotometry. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 155-160.
- Ma, C. Y.; Manoj, K. R.; Wing-Man, C. y Phillips D. L. 2000. Raman spectroscopic study of oat globulin conformation. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1542-1547.
- Ma, C. Y. y Phillips L. D. 2002. Ft-Raman spectroscopy and its applications. In Cereal Science *Cereal Chem.*, 79 (2), 171-177.
- Marcone, M. y Yada, R. 1991. Isolation, purification and characterization of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2281-2289.
- Marcone, M. y Yada, R. 1992. Study of the charge profile and covalent subunit association of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 385-389.
- Marcone, M. F.; Niekamp, F. K.; LeMaguer, M. y Yada, R. Y. 1994a. Purification and characterization of the physicochemical properties of the albumin fraction from the seeds of *Amaranthus hypochondriacus*. *Food Chem.*, 51, 287-294.

- Marcone, M.; Beniac, D.; Harauz; G. y Yada, R. 1994b. Quaternary structure and model for the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus* K343. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2675-2678.
- Marcone, M. y Yada, R. 1997a. Sulphydril and disulphide groups of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus* K343. *J. Food Biochem.*, 21, 255-272.
- Marcone, M. y Yada, R. 1997b. Evidence for the phosphorylation and glycosilation of the amaranth 11S globulin (amaranthin). *J. Food Biochem.*, 21, 341-369.
- Marcone, M. F.; Kakuda, Y. y Yada, R.Y. 1998a. Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants-I. Isolation/purification and characterization. *Food Chem.*, 62, 27-47.
- Marcone, M. F.; Kakuda, Y. y Yada, R. Y. 1998b. Salt-soluble seed globulins of dicotyledonous and monocotyledonous plants-II. Structural characterization. *Food Chem.*, 63, 265-274.
- Marcone, M. F. y Kakuda, Y. 1999. A comparative study of the functional properties of amaranth and soybean globulin isolates. *Nahrung*, 43, 368-373.
- Marcone, M. F. 1999a. Evidence confirming the existence of a 7S globulin-like storage protein in *Amaranthus Hypochondriacus*. *Seed Food Chem.*, 65, 533-542.
- Marcone, M. F. 2000. First report of the characterization of the threatened plant species *Amaranthus Pumilus* (Seabeach Amaranth). *J. Agric. Food Chem.*, 48, 378-382.
- Martínez, E. N. y Añón, M. C. 1996. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2523-2530.
- Martínez, E. N.; Castellani, O. F. y Añón, M. C. 1997. Common molecular features among amaranth storage proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4846-4853.
- Martínez, E. N. 1997. Tesis doctoral. Caracterización de proteínas de amaranto. Universidad Nacional de La Plata.
- Maruyama, N.; Katsube, T.; Wada, Y.; Oh, M. H.; Barba de la Rosa, A. P.; Okuda, E. y Nakagawa, S. y Utsumi, S. 1998. Nakagawa, S. 1998. The roles of the N-linked glycans and extension regions of soybean β -conglycinin in folding, assembly and structural features. *Eur. J. Biochem.*, 258 (2), 854-862.
- Maruyama, N.; Santo, R.; Wada, Y.; Matsumura, Y.; Goto, H.; Okuda, E.; Nakagawa, S. y Utsumi, S. 1999. Structure-physicochemical function relationships of soybean β -conglycinin constituent subunits. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (12), 5278-5284.

- Matsumura, Y. y Mori, T. 1996. Gelation. In *Methods of Testing Protein Functionality*. Ed. Hall, G.M. Blackie Academic & Professional, London, UK. Chaper, 4, pp., 76-109.
- Mellena, M.; van Opheusden, J. H. J. y van Vliet, T. 2002 Categorization of rheological scaling models for particle gels applied to casein gels. *J. Rheol.*, 46 (1), 11-29.
- Mendoza, C. y Bressani, R. 1987. Nutritional and functional characteristics of extrusion-cooked amaranth flour. *Cereal Chem.*, 64, 218-222.
- Meng, G. T.; Ching, K. M. y Ma, C. Y. 2002. Thermal aggregation of globulin from an indigenous Chinese legume, *Phaseolus angularis* (red bean). *Food Chem.*, 79, 93-103.
- Meng, G.; Ma, C. Y. y Phillips, D. L. 2003. Raman spectroscopic study of globulin from *Phaseolus angularis* (red bean). *Food Chem.*, 81, 411-420.
- Microcal Origin. 1997. Version 5.0. Microcal Software, Inc. USA.
- Mitchell, J. R. 1984. Rheological Techniques. *Food Analysis*, Vol 1. Ed. Gruenwedel, D. W. and Whitaker, J. R. Chaper 4, pp., 151-220.
- Molina, E.; Papadopouñou, A. y Ledward, D. A. 2001. Emulsifying properties of high-pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. *Food Hydrocoll.*, 15 (3), 49-55.
- Molina, E.; Defaye, A.B., y Ledward, D. A. 2002. Soy protein pressure-induced gels. *Food Hydrocoll.*, 16, 625-632.
- Molina, E. y Ledward, D. A. 2003. Effects of combined high-pressure and heat treatment on the textural properties of soya gels. *Food Chem.*, 80, 367-370.
- Montero, P.; Fernández-Díaz, M. D. y Gomez-Guillén M. C. 2002. Characterization of gelatin gels induced by high pressure. *Food Hydrocoll.*, 16, 197-205.
- Mora-Escobedo, R.; Paredes-Lopez, O. y Odorica-Falomir, C. 1990. Characterization of albumins and globulins from amaranth. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 23, 484-487.
- Nagano, T.; Akasaka, T. y Nishinari, K. 1994a. Dynamic viscoelastic properties of glycinin and β -conglycinin gels from soybeans. *Biopolymers*, 34 (10), 1303-1309.
- Nagano, T.; Mori, H. y Nishinari, K. 1994b. Effect of heating and cooling on the gelation kinetics of 7S globulin from soybeans. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1415-1419.
- Nagano, T.; Mori, H. y Nishinari, K. 1994c. Rheological properties and conformational states of β -conglycinin gels at acid pH. *Biopolymers*, 34 (2), 293-298.
- Nakai, S.; Li-Chan, E. y Hayakawa, S. 1986. Contribution of protein hydrophobicity to its functionality. *Nahrung*, 30, 327-336.
- Nakamura, T.; Utsumi, S. y Mori, T. 1986a. Mechanism of heat-induced gelation and gel properties of soybean 7S globulin. *Agric. Biol. Chem.*, 50, 1287-1293.

- Nakamura, R.; Konishi, Y.; Kojima, A. y Nakatani, N. 1998. Globulin and albumin-2 associated with protein bodies in *Amaranthus cruentus* seeds. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 62, 1231-1233.
- National Academy of Sciences. 1975. Under exploited tropical plants with promising economic value. Washitongton D. C.: Editado por National Academy of Sciences Press.
- National Research Council. 1984. Amaranth: Modern prospects for an ancient Crop. Washington DC.: Press.
- Nishinari, K.; Kohyama, K.; Zhang, Y.; Kitamura, K.; Sugimoto, T.; Saio, K. y Kawamura, Y. 1991. Rheological study on the effect of the A₅ subunit on the gelation characteristics of soybean proteins. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 351-355.
- Nonaka, M.; Li-Chan, E. y Nakai, S. 1993. Raman spectroscopic study of thermally induced gelation of whey proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1176-1181.
- Olsson, C.; Langton, M. y Hermansson A. M. 2002. Dynamic measurements of β -lactoglobulin structures during aggregation, gel formation and gel break-up in mixed biopolymer systems. *Food Hydrocoll.*, 16, 477488.
- Osaki, Y.; Cho, R., Ikegaya, K., Muraishi, S. y Kawauchi, K. 1992. Potential of near-infrared fourier transform raman spectroscopy in food analysis. *Appl. Spectrosc.*, 46, 1503-1507.
- Osborne, T. 1924. In *The Vegetable Proteins*. 2^{da} edición. Editado por Longmans y Green, New York.
- Paredes-López, O.; Mora-Escobedo, R. y Odorica-Falomir, C. 1988. Isolation of amaranth proteins. *Lebensm. Wiss.u.Technol.*, 21, 59-61.
- Paredes-López, O.; Guzmán-Maldonado, H. y Ordorica-Falomir, C. 1994. Food proteins from emerging seed sources. In *New and Developing Sources of Food proteins*. Hudson, B. J. F., Ed.; Chapman and Hall; pp., 240-279.
- Permyakov E. 1993. *Luminescent Spectroscopy of Protein*. CRC Press, Inc. Chaper, 3 y 4, pp., 35-63.
- Petrucelli, S. 1993. Modificaciones estructurales de aislados proteicos de soja producidas por tratamientos reductores y térmicos y su relación con propiedades funcionales. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Petrucelli, S. y Añón, M. C. 1994. Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. Part I: Structural and hydration properties. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2161-2169.

- Phillips, D. L.; Liu, H. J.; Pan, D. H. y Corke, H. 1999a. General application of raman spectroscopy for the determination of level of acetylation in modified starches. *Cereal Chem.*, 76, 439-443.
- Pilosof A. M. R. 2000. Gelificación. En caracterización funcional y estructural de proteínas. Eds. A. M. R. Pilosof y G. B. Bartholomai. CYTED-Eudeba. Buenos Aires. pp., 75-95.
- Ptitsyn, O. B. 1992. The molten globule state. In Protein Folding. Ed. T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company. pp., 243-300.
- Puppo, M. C.; Lupano, C. E. y Añón, M. C. 1995. Gelation of soybean protein isolates in acidic conditions. Effect of pH and protein concentration. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2356-2361.
- Puppo, M. C. 1997. Propiedades gelificantes de las proteínas de soja a pH ácido. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Puppo, M. C. y Añón, M. C. 1998a. Effect of pH and protein concentration on rheological behavior of acidic soybean protein gels. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3039-3046.
- Puppo, M. C. y Añón, M. C. 1998b. Structural properties of heat-induced soy-protein gels as affected by ionic strength and pH. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3583-3589.
- Puppo, M. C. y Añón, M. C. 1999a. Soybean protein dispersions at acid pH. Thermal and rheological properties. *J. Food Sci.* 64 (1), 50-56.
- Puppo, M. C. y Añón, M. C. 1999b. Rheological properties of gels of acidic soybean protein gels: salt addition effect. *Food Hydrocoll.*, 13, 167-176.
- Prakash, D.; Joshi, B. D. y Pal, M. 1995. Vitamin C in leaves and seed oil composition of the amaranthus species. *Intern. J. Food Sci. Nutr.*, 46, 47-51.
- Privalov, P. y Khechinashvili, N. N. A. 1974. Thermodynamic approach to the problem stabilization of globular protein structure: calorimetric study. *J. Mol. Biol.*, 86, 665-684.
- Relkin, P.; Meyheuc, T.; Launay, B. y Raynal, K. 1998. Heat-induced gelation of globular protein mixtures a DSC and scanning electron microscopic study. *J. Therm. Anal. Calorimetry*, 51, 747-755.
- Renkena, J. M. S.; Lakemond, C. M. M.; de Jongh, H. H. J., Gruppen, H. y van Vliet, T. 2000. The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins. *J. Biotechnol.*, 79 (3), 223-230.
- Renkema, J. M. S. 2001. Formation, structure and rheological properties of soy protein gels. Tesis doctoral. Wageningen University, The Netherlands.

- Renkema, J. M. S., Knabben, J. H. M. y van Vliet, T. 2001. Gel formation by β -conglycinin and glycinin and their mixtures. *Food Hydrocoll.*, 15, 407-414.
- Renkena, J. M. S. y van Vliet, T. 2002. Heat-induced gel formation by soy proteins at neutral pH. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 256-262.
- Renkena, J. M. S.; Gruppen, H. Y van Vliet, T. 2002a. The influence of pH and ionic strength on heat-induced formation and rheological properties of soy protein gels in relation to denaturation and their protein composition. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1569-1573.
- Renkena, J. M. S. y van Vliet, T. 2004. Concentration dependence of dynamic moduli of heat-induced soy protein gels. *Food Hydrocoll.*, 18, 483-487.
- Rhee, K. C. 1994. Functionality of soy proteins. In Protein Functionality in Food Systems; Hettiarachchy, N. S., Ziegler, G. R., Eds.; Dekker: New York. pp., 311-324.
- Rogers, N. 1999. High pressure processing: Its time for action. *Food Manuf.*, 74, 34-36.
- Romero-Zepeda, H. y Paredes-López, O. 1996. Isolation and characterization of amarantin, the 11S amaranth seed globulin. *J. Food Biochem.*, 19, 329-339.
- Rose, R.; Rose, C. L.; Omi, S. K.; Forry, K. F.; Durall, D. M. y Bigg, W. L. 1991. Starch determination by perchloric acid vs. Enzymes: evaluating the accuracy and precision of six colorimetric methods. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 2-11.
- Rossi, M. y Schiraldi, A. 1992. Thermal denaturation and aggregation of egg proteins. *Thermochim. Acta*, 199, 115-123.
- Ross-Murphy, S. B. 1995a. Rheological characterization of gels. *J. Text. Stud.*, 26, 391-400.
- Ross-Murphy, S. B. 1995b. Rheology of biopolymer solutions and gels. New Physicochemical techniques for the characterization of complex food systems. Ed. Dickinson, E. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK; Chaper 6, pp., 130-136.
- Royer, C. 1995. Fluorescence Spectroscopy. In Methods in Molecular Biology. Protein Stability and Fouling. Ed. Biet, A. S. Humana Press Inc. 3, 65-88.
- Sadeghi-Jorbachi, H.; Wilson, R. H.; Belton, P. S.; Edwards-Webb, J. D. y Cox, D. T. 1991. Quantitative analysis of oils and fats by Fourier Transform Raman spectroscopy. *Spectrochim. Acta*, 474, 1449-1458.
- Saio, K. y Watanabe, T. 1978. Differences in functional properties of 7S and 11S soybean proteins. *J. Text. Stud.*, 9, 135-157.

- Salgado J. M. y Takashima M. K. 1992. Chemical and biological characterization of meal and protein isolates from pumpkin seed (*Cucurbita moschata*). *Arch. Latinoam. Nutr.* 42, 443-450.
- Salnikow, J.; Zemser, M.; Gorinstein, S.; Friedman, M.; Scheler, Ch. y Paredes-López, O. 1998. Structure-function relationships of folded and unfolded amaranth proteins. *J. Prot. Chem.*, 17, 543-545.
- Saunders, R. y Becker, R. 1984. Amaranthus: a potential food and feed resource. En *Advance in Cereal Science and Technology*. Editado por Pomeranz, Y. American Association of Cereal Chemists, St. Paul. Chaper 6, pp., 357-397.
- Schrader, B.; Hoffman, A.; Simon, A. y Sawatzki, J. 1991. Can a Raman renaissance be expected via the near-infrared Fourier transform technique?. *Vib. Spectrosc.*, 1, 239-250.
- Scilingo, A. A.; Molina Ortiz, S. E.; Martínez, N. E. y Añón, M. C. 2002. Amaranth protein isolates modified by hydrolytic and thermal treatments. Relationship between structure and solubility. *Food Res. Int.*, 35, 855-862.
- Segura-Nieto, M.; Vazquez-Sanchez, N.; Rubio-Velazquez, H.; Olguin-Martín, L. E.; Rodriguez-Néster, C. E. y Herrera-Estrella, L. 1992. Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1553-1558.
- Segura-Nieto, M.; Barba de la Rosa, A. P. y Paredes-López, O. 1994. Biochemistry of amaranth proteins. In *Amaranth. Biology, Chemistry and Technology*. Ed. Paredes-López, O. CRC Press, Boca Ratón., Chapter 5, pp., 75-106.
- Singhal, R.S. y Kulkarni, P.R. 1991. Puffing effects on functional properties of *Amaranthus paniculatas* (Rajgeera) seed flour. *J. Food Sci.*, 56, 1121-1122.
- Singhal, R. S. y Kulkarni, P. R. 1988. Composition of the seeds of some amaranthus species. *J. Sci. Food Agric.*, 42, 325-331.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M., Olson, B. J. y Klenk, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150, 76-85.
- Solli, J. N. y Herskovits, T. T. 1973. Solvent Perturbation Studies and Analysis of Protein and Model Compound Data in Denaturing Organic Solvents. *Anal. Biochem.*, 74, 370.
- Sone, T.; Dosako, S. y Kimura, T. 1983. Microstructure of protein gels in relation to their rheological properties. En *Instrumental Analysis of Foods*. Chaper 2 , 209-217.

- Sorgentini, D. A.; Wagner, J. R. y Añón M. C. 1995. Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationship of soluble and insoluble fractions. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2471-2479.
- Soriano-Santos, J; Iwabuchi, S. y Fujimoto, K. 1992. Solubility of amaranth seed proteins in sodium sulphate and sodium chloride: the main factor in quantitative extraction for analysis. *Internatl. J. Food Sci. & Technol.*, 27, 337-346.
- Soriano-Santos, J. y Córdoba-Salgado, M. 1995. Evaluación de distintos métodos de solubilización de nitrógeno para la obtención de concentrados proteínicos de semillas de amaranto. *Rev. Esp. Cs. Tecnol. Alimen.*, 35, 161-177.
- Stading, M. y Hermansson, A. M. 1990. Viscoelastic behavior of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocoll.*, 4 (2), 121-136.
- Stading, M. y Hermansson, A. M. 1991. Large deformation properties of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocoll.*, 5, 339-352.
- Stading, M., Langton, M. y Hermansson, A. M. 1992. Inhomogeneous fine-stranded β -lactoglobulin gels. *Food Hydrocoll.*, 6, 455-470.
- Stading, M.; Langton M. y Hermansson, A. M. 1993. Microstructure and rheological behavior of particulate β -lactoglobulin gels. *Food Hydrocoll.*, 7, 195-212.
- Statistix. 1996. 1.0 Window 95. USA; Analytical Software.
- Steffe, J. F. 1996. Introduction to rheology. In J. F. Steffe (Ed.). *Rheological methods in food process engineering*. USA: Freeman Press. pp., 1-93.
- Stoschek, C. 1990. Quantitation of protein. In *Methods in Enzymology, Guide to protein purification* Academic Press Inc., San Diego, California, Section II. Vol. 182, pp., 50-68.
- Systat. 1990. V5.0 windows. SYSTAT, INC. Evanston, IL.
- Szczesniak, P. 1963. Classification of textural characteristics. *J. Food Sci.*, 28, 385-389.
- Teutónico, R. A. y Knorr, D. 1985. Amaranth: Composition, properties and applications of a rediscovered food crop. *Food Technol.*, 39 (4), 49-61.
- Tu, A. T. 1982. *Raman spectroscopy in biology: Principles and applications*. New York: Jhon Wilwy & Sons. pp., 173.
- Tu, A. T. 1986. Peptide backbone conformation and microenvironment of protein side chains. In *Spectroscopy of biological systems*. New York: Wiley. pp., 47-112.
- Umeya, J.; Yamauchi, F. y Shibasaki, K. 1980. Hardening and softening properties of soybean protein-water suspending systems. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1321-1326.

- Utsumi, S.; Inaba, H. y Mori, T. 1980. Formation of pseudo and hybrid-11S globulins from subunits of soybean and broad bean 11S globulins. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1891-1896.
- Utsumi, S.; Damodaran, S. y Kinsella, J. 1984. Heat induced interactions between soybean proteins: preferential association of 11S basic subunits and B-subunits of 7S. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 1406-1412.
- Utsumi, S. y Kinsella, J. E. 1985a. Forces involved in soy protein gelation: effects of various reagents on the formation, hardness and solubility of heat-induced gels made from 7S, 11S, and soy isolate. *J. Food Sci.*, 50, 1278-1282.
- Utsumi, S. y Kinsella, J. E. 1985b. Structure-function relationship in food proteins: subunit interactions in heat-induced gelation of 7S, 11S, and soy isolate. *J. Agric. Food Chem.*, 33, 297-303.
- Van Kleef, F. S. M. 1986. Thermally induced protein gelation: gelation and rheological characterization of highly concentrated ovalbumin and soybean protein gels. *Biopolymers*, 25, 31-59.
- Van Vliet, T.; Lucey, J. A.; Grolle, K. y Walstra, P. 1997. Rearrangements in GDL-induced casein gels during and after gel formation. In E. Dickinson and B. Bergenstahl, *Food Colloids. Proteins, Lipids and Polysaccharides*. Cambridge, Great Britain: Royal Society of Chemistry. pp., 335-345.
- Vasco-Méndez, N. L. y Paredes-López, O. 1995. Antigenic homology between amaranth glutelins and other storage proteins. *J. Food Chem.*, 18, 227-238.
- Verheul, M. y Roef, S. P. F. M. 1998a. Structure of whey protein gels, studied by permeability, scanning electron microscopy and rheology. *Food Hydrocoll.*, 12 (1), 17-24.
- Verheul, M. y Roef, S. P. F. M. 1998b. Structure of particulate whey protein gels: effect of NaCl concentration, pH, heating temperature, and protein composition. *J. Agric. Food Chem.*, 46 (12), 4909-4916.
- Von Hippel, P. H. y Schleich, T. 1969. The effect of neutral salts on the structure and conformational stability of macromolecules in solution. In S. N. Timesheff, y G. D. Fasman (Eds.), *Structure and stability of biological macromolecule*. New York: Marcel Dekker. Vol. 2. pp., 417-574.
- Wagner, J. R. y Añón M. C. 1990. Influence of denaturation, hidrophobicity and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolates. *J. Food Sci.*, 55, 765-770.

- Wagner, J. R.; Sorgentini, D. A. y Añón, M. C. 1996. Thermal and electrophoretic behavior, hydrophobicity and some functional properties of acid-treated soy isolates. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1881-1889.
- Walkenström, P.; Windhab, E. y Hermansson, A. M. 1998. Shear-induced structuring of particulate whey protein gels. *Food Hydrocoll.*, 12, 459-468.
- Wang, C. H. y Damodaran, S. 1991. Thermal gelation of globular proteins influence of protein conformation on gel strength. *J. Agric. Food Chem.*, 39 (3), 433-438.
- Wierbicki, E.; Kuncle, L. E. y Deatherage, F. E. 1956. Post mortem changes in meat and their possible relation to tenderness together with some comparisons of meat from heifers, bulls, steers and diethylstilbestrol treated bulls and steers. *Food Technol.*, 11, 69.
- Wolf, W. 1993. Sulfhydryl content of glycinin: effect of reducing agents. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 168-176.
- Yada, R. Y. 1984. A study of secondary structure predictive methods for proteins and the relationships between physical-chemical properties and enzymatic activity of some aspartyl proteinases, Ph.D. thesis, University of British Columbia.
- Yada, R. Y. y Nakai, S. 1986. Secondary structure of some aspartyl proteinases. *J. Food Biochem.*, 10, 155-183.
- Yamagishi, T.; Yamauchi, F. y Shibasaki, K. 1980. Isolation and partial characterization of heat-denatured products of soybean 11S globulin and their analysis of electrophoresis. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1575-1582.
- Yamagishi, T.; Yamauchi, F. y Shibasaki, K. 1981a. State of aromatic amino acid residues in soybean 11S globulin heated in the presence of N-Ethylmaleimide by derivative spectrophotometry. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 459.
- Yamagishi, T.; Yamauchi, F. y Shibasaki, K. 1981b. Electrophoretic and differential thermal analysis of soybean 11S globulin heated in the presence of N-ethylmaleimide. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 1661-1668.
- Yamagishi, T.; Miyakawa, A.; Noda, N. y Yamauchi, F. 1983. Isolation and electrophoretic analysis of heat-induced products of mixed soybean 7S and 11S globulins. *Agric. Biol. Chem.*, 47 (6), 1229-1237.
- Yamagishi, T.; Takahishi, N. y Yamauchi, F. 1987. Covalent polymerization of acidic subunits on heat-induced gelation of soybean glycinin. *Cereal Chem.*, 64, 207-212.
- Yamauchi, F.; Yamagishi, T. y Iwabuchi, S. 1991. Molecular understanding of heat-induced phenomena of soybean protein. *Food Rev. Internl.*, 7, 283-322.

- Yao, J. J.; Tanteeratarm, K. y Wei, L. S. 1990. Effects of maturation and storage on solubility, emulsion stability and gelation properties of isolated soy proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67, 974-979.
- Yoshida, M.; Kohyama, K. y Nishinari, K. 1992. Gelation properties of soymilk and soybean 11S globulin from Japanese-grown soybeans. *Biosci. Biotech.*, 56, 725-728.
- Yu, N. T.; Jo, B. H. y O'Shea, D. C. 1973. Laser Raman scattering of cobra mine B, a basic protein from cobra venom. *Arch Biochem Biophys*, 156 (1), 71-76.
- Yu, N.T.; Jo, B. H.; Chang, R. C. y Huber, J. D. 1974. Single-crystal Raman spectra of native insulin. Structures of insulin fibrils, glucagon fibrils, and intact calf lens. *Arch. Biochem. Biophys.*, 160, 614-622.
- Zdzislaw, E. 2001. Chemical and Functional Properties of Food Proteins. Technomic Publishing Company, Inc. Pennsylvania, U.S.A. Chaper 5, pp., 113-125.
- Zheng, B. A.; Matsumura, Y. y Mori, T. 1991. Thermal gelation mechanism of legumin from broad beans. *J. Food Sci.*, 56, 722-725.
- Zheng, B.; Matsumura, Y. y Mori, T. 1993a. Relationship between the thermal denaturation and gelling properties of legumin gels from broad beans. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1257-1260.
- Ziegler, G. y Foegeding, E. A. 1990. The gelation of proteins. *Adv. Food Nutr. Res.*, 34, 203-298.